

Інститут молекулярної біології і генетики  
Національної академії наук України

Кваліфікаційна наукова  
праця на правах рукопису

**ШУВАЛОВА НАДІЯ СЕРГІЇВНА**

УДК.576.533+57.085.23

ДИСЕРТАЦІЯ  
**ОПТИМІЗАЦІЯ КИСНЕВОГО СТАНУ ДЛЯ КУЛЬТИВУВАННЯ  
МЕЗЕНХІМАЛЬНИХ СТОВБУРОВИХ КЛІТИН З ПУПКОВОГО  
КАНАТИКА ЛЮДИНИ**

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

\_\_\_\_\_ Н.С. Шувалова.

Науковий керівник: Кордюм Віталій Арнольдович, доктор біологічних  
наук, професор, член-кореспондент НАН України

Київ - 2021

## АНОТАЦІЯ

**Шувалова Н.С. Оптимізація кисневого стану для культивування мезенхімальних стовбурових клітин з пупкового канатика людини.** - Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

*Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук (доктора філософії) за спеціальністю 03.00.20 «Біотехнологія». - Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, Київ, 2021.*

У дисертації обґрунтовано і доведено доцільність використання фізіологічних концентрацій кисню для культивування мезенхімальних стовбурових клітин (МСК) на прикладі МСК із Вартонового студню (МСК-ВС), оптимізовано методи отримання культур з Вартонового студню.

У результаті проведених досліджень розроблено дві схеми та системи створення газових сумішей зі зниженим вмістом кисню, на основі азоту та аргону, для ємностей невеликого об'єму, що має значення для практичного застосування в умовах дослідницьких лабораторій. Проведено досліди із застосування розроблених схем для культивування МСК-ВС. Оптимізовано методику обробки пупкового канатика для виділення первинних культур МСК-ВС, та розроблено схему порівняння вихідної збагаченості МСК тканини ВС, для отримання первинної культури неферментативними методами.

Перевірено ефективність отримання первинних культур МСК-ВС шляхом інкубування фрагментів тканини Вартонова студня у газових сумішах з фізіологічними концентраціями кисню (3%), на матеріалі, отриманому від різних донорів. Встановлено, що кількість МСК-ВС, отриманих при 3% кисню, була на 28% більшою, порівняно зі стандартними умовами CO<sub>2</sub>-інкубатора (в середньому, 175,31±21,34 тис. і 137,76±27,27 тис. на чашку Петрі діаметром 35 мм, відповідно). Дослідження метаболічної активності у первинних культурах виявили значну гетерогенність між популяціями, отриманими від різних донорів. Інтенсивність утворення формагану в МТТ-тесті, в середньому, була на 35% вищою при 3% кисню,

ніж в умовах CO<sub>2</sub>-інкубатора, що відповідало більшій кількості клітин.

Також вперше оцінено вплив газових сумішей, що містять 3% кисню, на основі азоту та аргону, на проліферативну активність МСК-ВС в процесі культивування. Вперше застосовано аргон як базовий компонент сумішей зі зниженим вмістом кисню для культивування МСК, та перевірено гіпотетичну цитопротективну активність зазначених сумішей. Встановлено, що на п'яти пасажах після семи днів культивування у двох газових сумішах, кількість МСК-ВС виявлялась більшою порівняно з контролем (умови CO<sub>2</sub>-інкубатора), навіть на фоні тенденції до зниження проліферативної активності після третього пасажу. На першому пасажі в групах із газових сумішей на основі азоту спостерігали збільшення кількості клітин в 6,8 разів, в газовій суміші на основі аргону - 6,4, у контролі - 6,1. На 2 пасажі в групах із газових сумішей на основі азоту спостерігалось збільшення кількості клітин в 6,9 разів, в газовій суміші на основі аргону - 6,8, в контролі - 6; на 3му пасажі у 6 разів, 6 разів та 4,1 раз, відповідно. У даній роботі вперше показано різницю в біологічних ефектах газових сумішей на основі азоту та аргону: спостерігались незначні, але достовірні відмінності у впливі на проліферацію МСК-ВС. Суміш на основі азоту у всіх варіантах виявилась більш ефективною.

У результаті проведеного вивчення культивування МСК-ВС за знижених концентрацій кисню, було розроблено метод отримання культур МСК-ВС шляхом відбору клітин, які спонтанно відкріпились, з кондиціонованого середовища, та їхньої подальшої мультиплікації. Було встановлено, що характер проліферації у «побічних» культурах МСК-ВС, отриманих згаданим способом з нульового і першого пасажів, в стандартних умовах CO<sub>2</sub>-інкубатора, загалом відповідав притаманному «основній» культурі, тоді як рівень проліферації «побічних» популяцій, отриманих з культур на другому пасажі, був суттєво нижчим. Дослідження морфологічних особливостей культур, отриманих зазначеним методом, виявило появу клітини розпластаної форми і різного ступеня вакуолізації, що з'являлись з і

4 пасажів, що вважається ознаками старіння культури. Для культур МСК-ВС "основної" та «побічних» ліній, отриманих з нульового та першого пасажів, ці явища проявлялись практично на одному рівні, тоді як кількість старіючих клітин у "побічній" лінії, отриманої з другого пасажу, була помітно більшою. Порівняння ефективності культивування МСК-ВС, отриманих згаданим методом, у газових сумішах на основі азоту та аргону, які містили 3% кисню показало, що кількість МСК-ВС в умовах помірної гіпоксії в усіх варіантах була вищою, ніж в стандартних умовах CO<sub>2</sub>-інкубатора. Варто зауважити, що для культур, отриманих за допомогою методу збереження клітин, які спонтанно відкріпились, позитивний ефект суміші на основі аргону був більш вираженим: кількість клітин в суміші на основі аргону в "побічних" лініях, на четвертому пасажі була більшою, ніж в стандартних умовах і в суміші на основі азоту (наприклад, для культур, отриманих з нульового пасажу кількість клітин в середньому була 338,3±3,3 тис. в суміші на основі аргону, 324,7±8,0 тис. в суміші на основі азоту, 239,9±16,7 тис. в умовах CO<sub>2</sub>-інкубатора). Отримані результати свідчать про те, що запропонований підхід доцільно застосовувати для постійного підтримання популяції МСК, які уникли впливу на поверхневий апарат клітини.

У ході досліджень проведено аналіз морфології МСК-ВС, культивованих за стандартних умов та в сумішах на основі азоту та аргону за фізіологічних концентрацій кисню (3%). Встановлено, що ступінь гетерогенності в культурах відрізнявся по морфометричних показниках ядро-цитоплазматичного співвідношення та співвідношення «ширина\довжина». Виявлено відмінності як між МСК-ВС на різних пасажах, культивованих за однакових умов, так і між популяціями одного і того ж пасажу, культивованих в різних газових сумішах. Для всіх груп найвищий рівень морфологічної гомогенності можна було спостерігати на другому пасажі. Також оцінено активність асоційованої зі старінням бета-галактозидази (SA-β-gal) у культурах МСК-ВС на третьому пасажі, в стандартних умовах CO<sub>2</sub>-інкубатора, та описаних вище газових сумішах, що

містять 3% кисню. Показано значну гетерогенність у активності SA- $\beta$ -gal. У групах, культивованих при 3% кисню в суміші на основі азоту, рівень активності SA- $\beta$ -gal був найнижчим, і розбіжність між показниками всередині одного варіанту була найменш вираженою (в середньому по дослідах,  $5,02 \pm 1,58$  %). У групах, культивованих у суміші на основі аргону, рівень активності був меншим, ніж в контрольній групі: в середньому по дослідах,  $7,95 \pm 1,73$  % в групах із суміші на основі аргону і  $11,43 \pm 4,18$  % в стандартних умовах CO<sub>2</sub>-інкубатора. Також, було встановлено, що відсоток МСК-BC, у яких спостерігали високу активність SA- $\beta$ -gal, у всіх варіантах був вищим за відсоток клітин з "розпластаною" формою. Отримані результати свідчать про те, що умови помірної гіпоксії запобігають масовій появі МСК-BC з фенотипом, притаманним старіючим клітинам. Встановлено, що ефекти сумішей дещо відрізнялись: найбільш вираженим був ефект суміші на основі азоту.

Вперше застосовано метод оптимізації невірусної трансфекції МСК в умовах фізіологічних концентрацій кисню. Встановлено, що за проведення процедури трансфекції за допомогою нанорозмірних поліплексів (розгалужений поліетиленімін (ПЕІ, 25кДа) і комерційного препарату TurboFect), що містили плазмідну ДНК з маркерним геном зеленого флуоресцентного білка (enhanced green fluorescent protein - eGFP) у газових сумішах при 3% кисню, процент МСК, які експресують трансгенний білок, є значно вищим, ніж в контрольній групі, для якої всі процедури було проведено за стандартних умов CO<sub>2</sub>-інкубатора. Також показано, що ефекти сумішей відрізнялись. Відсоток eGFP-позитивних клітин, був більшим в середньому у 2,58 в суміші на основі азоту, та 1,37 рази в суміші на основі аргону.

**Ключові слова:** мезенхімальні стовбурові клітини, Вартонів студень, клітинні культури, культивування стовбурових клітин, гіпоксія, фізіологічні концентрації кисню, морфологія клітинних культур, отримання первинних

культур, трансфекція клітинних культур, невірусна трансфекція.

#### Список публікацій здобувача

1. **Shuvalova N.**, Kordium V. Comparison of proliferative activity of Wharton jelly mesenchymal stem cells in cultures under various gas conditions // *Biopolym. Cell.* - 2015. - Vol. 31, №3. - P. 233–239. *(Особистий внесок здобувача: аналіз літературних джерел, проведення отримання, культивування та дослідження проліферації МСК-ВС, аналіз результатів, підготовка роботи до публікації).*

2. **Shuvalova N.**, Kordium V. Proliferation of Wharton jelly mesenchymal stem cells, derived by preserving the cells with reduced attachment rate, under various gas conditions // *Biopolym. Cell.* - 2015. - Vol. 31, №6. - P. 447 - 454. *(Особистий внесок здобувача: аналіз літературних джерел, проведення отримання, культивування та дослідження проліферації та морфології ліній МСК-ВС, аналіз результатів, підготовка роботи до публікації).*

3. **Shuvalova N.**, Kordium V. Morphological characteristics of mesenchymal stem cells from Wharton jelly, cultivated under physiological oxygen tensions, in various gas mixtures // *Biopolym. Cell.* - 2016. - Vol. 32. №4. - P. 262–270 *(Особистий внесок здобувача: аналіз літературних джерел, отримання, культивування та аналіз морфології МСК-ВС, підготовка роботи до публікації).*

4. Lykhmus O., Koval L., Voytenko L., Uspenska K., Komisarenko S., Deryabina O., **Shuvalova N.**, Kordium V., Ustylenko A., Kyryk V., Skok M. Intravenously Injected Mesenchymal Stem Cells Penetrate the Brain and Treat Inflammation-Induced Brain Damage and Memory Impairment in Mice // *Front Pharmacol.* 2019. - Vol 10. - P. 355 *(Особистий внесок здобувача: аналіз літературних джерел, отримання та культивування МСК-ВС).*

5. **Shuvalova N. S.**, Toporova E. K., Kordium V. A. Transfection of

mesenchymal stem cells at physiological oxygen concentrations // *Biopolym. Cell.* - 2020. - Vol.36 №6. - P. 433 - 445 (*Особистий внесок здобувача: аналіз літературних джерел, проведено отримання, культивування та дослідження морфології МСК-ВС, аналіз результатів, підготовка роботи до публікації*).

6. **Шувалова Н.С.,** Дерябіна О.Г., Жукова С.М., Сорока М.П. Культивування мезенхімальних стовбурових клітин пуповинного канатика людини при знижених концентраціях кисню // Науково-практична конференція з міжнародною участю "Генетична і регенеративна медицина: проблеми та перспективи" *Журнал академії медичних наук України*, том 16, додаток, 2010 — с.191. (*Особистий внесок здобувача: отримання, культивування та дослідження проліферації та морфології МСК-ВС, аналіз результатів*).

7. **Shuvalova N.,** Deryabina O., Kordium V. Cultivation of human mesenchymal stem cells under low oxygen tensions // *Materials of International Life Sciences Students' Conference, Netherlands, Nijmegen, Nov.2010 - Abstract book*, P. 80. (*Особистий внесок здобувача: отримання, культивування та дослідження проліферації та морфології МСК-ВС, аналіз результатів*).

8. **Shuvalova N.,** Deryabina O., Kordium V. Cultivation of human mesenchymal stem cells from umbilical cord matrix under physiological oxygen tensions *The 4th international IMBG conference for young scientists "Molecular biology: advances and perspectives" abstract book* – 2011. - P. - 176 (*Особистий внесок здобувача: отримання, культивування та дослідження проліферації та морфології МСК-ВС, аналіз результатів*).

9. **Шувалова Н.С.,** Дерябіна О.Г., Маслова О.О., Жукова С.М., Сорока М.П., Кордюм В.А. Культивування мезенхімальних стовбурових клітин пупкового канатика людини в газових сумішах із фізіологічними концентраціями кисню на основі азоту та аргону // Науково-практична конференція з міжнародною участю "Актуальні проблеми регенеративної медицини", Київ 2012. - *Журнал академії медичних наук України*, том 18, додаток - с.167-168 (*Особистий внесок здобувача: отримання, культивування*

*та дослідження проліферації та морфології МСК-ВС, аналіз результатів).*

10. **Shuvalova Nadiia**, Deryabina Olena, Kordium Vitalii. Cultivation of human MSC from umbilical cord using various gas mixtures // Materials of 7th Annual Congress of the German Society for Stem Cell Research, associated with Fraunhofer Life Sciences Symposium Abstract book. - Germany, Leipzig, Nov 2012. - P. 112 (*Особистий внесок здобувача: отримання, культивування та дослідження проліферації та морфології МСК-ВС, аналіз результатів*).

11. **Шувалова Н.С.**, Топорова О.К. Біологічні властивості мезенхімальних стовбурових клітин Вартонового студня при культивуванні в газових сумішах з фізіологічними концентраціями кисню // Тези науково-практичної конференції з міжнародною участю «Інноваційні напрями в генетичній та регенеративній медицині» 9-10 листопада 2017 р., м. Київ, Україна. - Клітинна та органна трансплантологія. 2017, Том 5. №2. Додаток. - С. 258. (*Особистий внесок здобувача: отримання, культивування та проведення процедури трансфекції, аналіз результатів*).



## Summary

**Shuvalova N.S. Optimizing the oxygen concentration for cultivation of mesenchymal stem cells from umbilical cord. - On the rights of the manuscript.**

Thesis for obtaining the scientific degree Doctor of Philosophy (PhD) in speciality 03.00.20 - "Biotechnology" (*09 - biological sciences*). - Institute of Molecular biology and genetics of NAS of Ukraine. Kyiv 2021.

The present PhD thesis is dedicated to the study of cultivation of mesenchymal stem cells (MSC) under physiologic oxygen concentrations, on the example of MSC derived from Wharton jelly (WJ-MSC). The present work also describes the optimization for the methods of obtainment WJ -MSC primary cultures.

In present work, we developed two systems that can be used for composing the gas mixtures with low oxygen concentrations, in small volumes and designed two protocols for gas mixture creation, based either on nitrogen or argon. These developments can be applied in laboratory practice. The developed schemes were checked and used for cultivation of primary cultures and non-immortalized cell lines.

In the present thesis, we optimized the method of umbilical cord processing for explant obtaining and developed the scheme that allows comparing the initial number of MSC in tissue of Wharton jelly. We also optimized the explant method of WJ-MSC primary cultures obtaining, by maintaining the dishes with fragments of WJ tissue in gas mixtures with physiologic oxygen concentrations (3%). We checked the effectiveness of the optimization protocol scheme on samples from different donors. Developed optimization of explant method appeared to be helpful to increase the number and size of WJ-MSC colonies in primary cultures (the number of cells in primary cultures was  $137,76 \times 10^3 + 27,27 \times 10^3$  and  $175,31 \times 10^3 + 21,34 \times 10^3$  in 3% oxygen and standard conditions of CO<sub>2</sub>-incubator, respectively). On average, the number of WJ-MSC in conditions of mild hypoxia was 1,27 fold higher. The study of metabolic activity of primary WJ-MSC cultures

showed the high level of heterogeneity between populations, obtained from different donors. On average, the level of formasan formation in MTT-test was 1,35 fold higher under 3% oxygen, comparing to standard CO<sub>2</sub>-incubator conditions.

In present work, we also checked the effectiveness of use of gas mixtures, based on nitrogen and argon (both containing 3% oxygen) and compared their impact on proliferative activity of MSC-WJ cultures. We studied the use of argon as novel main component of gas mixture for cultivation of primary cultures and non-immortalized lines of MSC, and its cytoprotective effects. We showed, that after 7 days of cultivation, at passages 1 to 5, the numbers of cells in WJ-MS-C cultures maintained in 3% oxygen gas mixtures were larger, than in control group (from standard CO<sub>2</sub>-incubator conditions), even after slight decrease in proliferative activity at passage 3 (in all groups). At passage 1, in groups from nitrogen-based gas mixtures, we observed 6,8-fold multiplication in cell number, in argon-based mixture - 6,4, and 6,1 in control group. At passage 2, the cell number has grown 6,9 times in nitrogen-based mixture, 6,8 times in argon-based mixture, in control group - 6 times. At passage 3 we observed 6,6, and 4,1 fold multiplication respectively. Analysis of the literature showed, that present work is the first to reveal the difference in biological effects of gas mixtures, having nitrogen and argon as "base" component. The nitrogen-based gas mixture appeared to be the most effective in all variants.

In present work, we also developed the method of multiplication of cells, that detached spontaneously during cultivation, presumably, because of losing the attachment to substrate during division. The developed technique was, on probation, called "self-replating". The morphological and proliferative peculiarities of WJ-MS-C cultures, obtained by abovementioned method at passages 0 to 2 (called "side lines"), were studied. The study revealed that the proliferative activity in "side lines", obtained from spontaneously detached cells (SDC) at passage 0 and 1, was nearly similar to one of cultures, passed by standard method (using trypsin-EDTA solution, "main line"). But the proliferation level in cultures, obtained from

SDC on passage 2, appeared to be significantly lower, than that in the trypsin-EDTA passed line. Morphology of "self-replated" cultures was also studied and described. During culture maintenance period, at passages 1-4, the morphology changed in all groups. At passages 3 and 4, the cells with altered morphology could be noticed: with flattened shape and different degree of vacuolization, which are considered to be signs of senescence in culture. For MSC cultures of "main" and "side" lines, obtained from 0 and 1 passage, these features were expressed at the same level, while the number of cells with typically senescent phenotype in "side line", obtained from passage 2, was significantly higher. The study showed, that the number of MSC-WJ in all groups, maintained in hypoxic conditions, was higher comparing to the standard CO<sub>2</sub> incubator conditions. It should be noted, that the effect of argon-based gas mixture was slightly more pronounced: the numbers of cells from groups obtained by "self-replating" from 0 and 1 passage, at passage 4 was larger, than in nitrogen-based gas mixture and standard CO<sub>2</sub>-incubator conditions ( $338,3 \times 10^3 \pm 3,3 \times 10^3$ ,  $324,7 \times 10^3 \pm 8,0 \times 10^3$  and  $239,9 \times 10^3 \pm 16,7 \times 10^3$  respectively).

The analysis of WJ-MSC cultures morphology, cultured in standard CO<sub>2</sub>-incubator conditions, and under conditions of mild hypoxia, revealed that the degree of heterogeneity in nuclear-cytoplasmic ratio and "width\length ratio" differed between variants. We detected the differences both between WJ-MSC at different passages in the same conditions, and between the populations at the same passage maintained in different gas mixtures. For all groups, the highest level of homogeneity was observed at passage 2. We also showed the heterogeneity in the activity of senescence-associated - $\beta$ -galactosidase at passage 3 in all conditions. The lowest level of SA- $\beta$ -gal activity was detected in nitrogen-based gas mixture, containing 3% oxygen. For the WJ-MSC, cultivated in argon-based mixture, and CO<sub>2</sub>-incubator conditions the levels were  $7,95 \pm 1,73\%$  and  $11,43 \pm 4,18\%$  respectively. We also showed that the number of SA- $\beta$ -gal was on average, greater, than the number of cells with flattened shape. In general, we found that the conditions of mild hypoxia had positive impact on MSC cultures by preventing the appearance of cells with senescent phenotype. It was found that effects of gas

mixtures slightly differed: the most pronounced effect was observed in nitrogen-based gas mixture.

In this study, we also developed the novel optimization for methods of non-viral MSC transfection, by conducting all the stages of transfection procedure under physiological oxygen tensions. The study showed, that transfection with nano-sized polyplexes containing plasmid DNA with marker gene (enhanced green fluorescent protein – eGFP) in gas mixtures with 3% oxygen, was effective. The percent of GFP-expressing cells was significantly higher, than in control group, maintained in standard CO<sub>2</sub>-incubator conditions.

It was also detected, that the effects of nitrogen-based and argon-based gas mixtures were different. We showed, that, on average, the number of eGFP-positive cells was 2,58-time increase in nitrogen-based mixture, and 1,37 in argon-based mixture.

*Keywords:* mesenchymal stem cells, Wharton jelly, stem cell cultivation, hypoxia, physiologic oxygen tensions, cell culture morphology, primary cultures, non-viral transfection

List of scientific publications published on the topic of the dissertation:

1. **Shuvalova N.**, Kordium V. Comparison of proliferative activity of Wharton jelly mesenchymal stem cells in cultures under various gas conditions // Biopolym. Cell. - 2015. - Vol. 31, №3. - P. 233–239.

2. **Shuvalova N.**, Kordium V. Proliferation of Wharton jelly mesenchymal stem cells, derived by preserving the cells with reduced attachment rate, under various gas conditions // Biopolym. Cell. - 2015. -Vol. 31, №6. - P. 447 - 454.

3. **Shuvalova N.**, Kordium V. Morphological characteristics of mesenchymal stem cells from Wharton jelly, cultivated under physiological oxygen tensions, in various gas mixtures // Biopolym. Cell. - 2016. - Vol. 32. №4. - P. 262–270

4. Lykhmus O., Koval L., Voytenko L., Uspenska K., Komisarenko S., Deryabina O., **Shuvalova N.**, Kordium V., Ustymenko A., Kyryk V., Skok M.

Intravenously Injected Mesenchymal Stem Cells Penetrate the Brain and Treat Inflammation-Induced Brain Damage and Memory Impairment in Mice // *Front Pharmacol.* 2019. - Vol 10. - P. 355

5. **Shuvalova N. S.**, Toporova E. K., Kordium V. A. Transfection of mesenchymal stem cells at physiological oxygen concentrations // *Biopolym. Cell.* - 2020. - Vol.36 №6. - P. 433 – 445.

6. **Shuvalova N.S.**, Deryabina O.G, Zhukova S.M., Soroka M.P. Cultivation of human mesenchymal stem cells under low oxygen tensions // Abstracts of International conference “ Geneic and Regenerative Medicine: Problems and Perspectives” . Journal of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine, 2010. Vol 16. - P. 191.

7. **Shuvalova N.**, Deryabina O., Kordium V. Cultivation of human mesenchymal stem cells under low oxygen tensions // Materials of International Life Sciences Students` Conference, Netherlands, Nijmegen, Nov.2010 - *Abstract book*, P. 80.

8. **Shuvalova N.**, Deryabina O., Kordium V. Cultivation of human mesenchymal stem cells from umbilical cord matrix under physiological oxygen tensions // *The 4th international IMBG conference for young scientists “Molecular biology: advances and perspectives” abstract book* – 2011. - P. - 176

9. **Shuvalova N.S.**, Deryabina O.G, Maslova O.O., Zhukova S.M., Soroka M.P., Kordium V.A. Cultivation of human umbilical cord mesenchymal stem cells in gas mixtures with physiological oxygen tensions, based on nitrogen and argon // Abstracts of International conference “ Regenerative Medicine: Topical Issues” . Journal of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine, 2012. Vol 18., supplement - P. 167-168.

10. **Shuvalova Nadiia**, Deryabina Olena, Kordium Vitalii. Cultivation of human MSC from umbilical cord using various gas mixtures // Materials of 7th Annual Congress of the German Society for Stem Cell Research, associated with Fraunhofer Life Sciences Symposium. Abstract book. - Germany, Leipzig, Nov 2012. - P. 112

11. **Shuvalova N. S.**, Toporova E. K. Biological properties of Wharton jelly mesenchymal stem cells, cultivated in gas mixtures with physiological oxygen concentrations // Abstracts of International conference “Innovative trends in genetic and regenerative medicine” 9-10 November 2017 p., Kyiv, Ukraine. - Cell and organ transplantology. 2017, Vol 5. №2.supplement. - P. 258

## ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ.....	18
ВСТУП.....	20
РОЗДІЛ 1	
ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....	27
1.1. Мезенхімальні стовбурові клітини - субпопуляція стовбурових клітин дорослого організму.	
1.1.1 МСК з пупкового канатика людини.....	28
1.2.Осоливості та проблеми культивування МСК.....	30
1.2.1 Проблема деградації культури при мультиплікації в умовах <i>in vitro</i> .....	32
1.3. Концентрація кисню в тканинах організму ссавців.....	32
1.3.1. Молекулярні механізми чутливості до концентрації кисню.....	34
1.3.2.Кисень як регулятор життєдіяльності ніші стовбурових клітини.....	37
1.3.3. Фізіологічні концентрації кисню як сучасний підхід до збереження терапевтичних властивостей МСК.....	40
1.4. Деякі аспекти культивування МСК за фізіологічних концентрацій кисню .....	40
1.4.1. Вплив умов помірної гіпоксії на проліферацію МСК.....	40
1.4.2.Вплив на морфологію, диференціацію та старіння.....	42
1.4.3. Вплив умов помірної гіпоксії на здатність до міграції та особливості експресії молекулярних факторів.....	45
1.5. Біологічні ефекти інертних газів.....	46
РОЗДІЛ 2.	
МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ.....	50
2.1. Опис біологічних, хімічних агентів та обладнання що використовувались у роботі.....	50
2.1.1. Біологічні матеріали.....	50
2.1.2. Хімічні агенти.....	50

2.1.3. Обладнання.....	51
2.2. Отримання та характеристика первинної культури МСК-ВС.....	52
2.2.1. Отримання первинної культури МСК-ВС.....	52
2.2.2. Характеристика поверхневих маркерних білків.....	52
2.2.3. Аналіз здатності до диференціації.....	53
2.2.4. Оцінка метаболічної активності культури МСК-ВС.....	53
2.2.5. Морфологічний аналіз клонів в первинній культурі МСК-ВС.....	53
2.3. Гістологічне дослідження тканини ВС.....	54
2.4. Створення газових сумішей із заданими характеристиками та культивування МСК-ВС в умовах помірної гіпоксії.....	55
2.4.1. Дослідження проліферативних характеристик МСК-ВС за умов помірної гіпоксії.....	56
2.5. Отримання субпопуляцій МСК шляхом збереження клітин, що спонтанно відкріпились.....	57
2.6. Аналіз морфології культур МСК-ВС.....	57
2.6.1. Фіксація та забарвлення культур МСК-ВС (виготовлення препаратів МСК-ВС).....	58
2.6.2. Морфометричний аналіз препаратів культур МСК-ВС.....	58
2.6.3. Оцінка активності бета-галактозидази, асоційованої зі старінням.....	59
2.7. Трансфекція МСК-ВС.....	60
2.7.1. Виділення ДНК лужною методикою.....	60
2.7.2. Приготування препарату для трансфекції.....	60
2.7.3. Трансфекція МСК-ВС при фізіологічних концентраціях кисню.....	61
2.8. Статистична обробка даних.....	61
<b>РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ</b> .....	<b>63</b>
3.1. Розробка системи створення газових сумішей.....	63
3.1.1. Схема приладу для створення газових сумішей.....	63
3.2. Оптимізація методу отримання культури МСК-ВС.....	71
3.2.1. Оптимізація введення МСК-ВС у культуру за стандартних умов.....	71



3.2.2. Отримання культур МСК-ВС за умов помірної гіпоксії.....	78
3.3. Аналіз проліферації культур МСК-ВС при фізіологічних концентраціях кисню.....	83
3.3.1. Дослідження проліферації неіморталізованих ліній МСК-ВС, пасованих за стандартними методиками.....	84
3.3.2. Дослідження експресії поверхневих маркерних білків при культивуванні в умовах помірної гіпоксії.....	87
3.3.3. Дослідження проліферації МСК-ВС, отриманих за допомогою збереження клітин, які спонтанно відкріпились.....	89
3.3.3.1. Характеристика методу отримання культур МСК-ВС за допомогою збереження клітин, що спонтанно відкріпились.....	90
3.3.3.2. Дослідження проліферації культур МСК-ВС, отриманих за допомогою збереження спонтанно відкріплених клітин, в умовах фізіологічних концентрацій кисню.....	93
3.4. Дослідження морфологічних особливостей культур МСК-ВС, культивованих при фізіологічних концентраціях кисню.....	97
3.4.1. Морфометричні дослідження культур МСК-ВС на різних пасажах, при фізіологічних концентраціях кисню.....	97
3.4.2. Оцінка процесів старіння у культурах МСК-ВС.....	101
3.5. Оптимізація трансфекції МСК за допомогою культивування в умовах помірної гіпоксії.....	105
<b>РОЗДІЛ 4. УЗАГАЛЬНЕННЯ ТА АНАЛІЗ</b>	
<b>ОТРИМАНИХ РЕЗУЛЬТАТІВ.....</b>	<b>112</b>
<b>ВИСНОВКИ.....</b>	<b>126</b>
<b>СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....</b>	<b>128</b>
<b>ДОДАТОК А.....</b>	<b>149</b>

## ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКРОЧЕНЬ

МСК – мезенхімальні стовбурові клітини

КМ – кістковий мозок

ВС — Вартонів студень

МСК-ВС – мезенхімальні стовбурові клітини з Вартонова студню

СК – стовбурові клітини

РФК — реактивні форми кисню

ш/д – коефіцієнт «ширина/довжина»

ЯЦС — ядро-цитоплазмаичне співвідношення

ПТК – парціальний тиск кисню

ЖМСК - МСК жирової тканини

ПЕІ – поліетиленімін

ПК - пупковий канатик

ДМСО - диметилсульфоксид

МТТ – 3-(4,5-диметилгіазол-2-іл)-2,5-дифеніл-2Н-тетразолій бромід

ДНК – дезоксирибонуклеїнова кислота

РНК – рибонуклеїнова кислота

ЕТС – ембріональна теляча сироватка

ЕДТА – динатрієва сіль етилендіамінтетраоцтової кислоти

SA- $\beta$ -gal - бета-галактозидаза, асоційована зі старінням

EGFP - enhanced green fluorescent protein

HIF — hypoxia inducible factor

HIF-1 $\alpha$  - hypoxia inducible factor,  $\alpha$ -subunit

HIF-1 $\beta$  - hypoxia inducible factor,  $\beta$ -subunit

pVHL - Von Hippel–Lindau tumor suppressor protein

PHD - prolyl hydroxylase domain enzymes

HRE - hypoxia-response element

VEGF - vascular endothelial growth factor

FGF-2 - basic fibroblast growth factor

SDF-1 - stromal cell-derived factor 1

PBS - phosphate-buffered saline

aMEM — Minimum Essential Medium Eagle - alpha modification ( мінімальне середовище Ігла, альфа-модифікація)

DMEM – Dulbecco`s modified Eagle Medium (мінімальне середовище Ігла в модифікації Дюльбеко)

## ВСТУП

**Актуальність теми.** Мезенхімальні стовбурові клітини (МСК) визнано одним з найбільш перспективних для використання у регенеративній медицині типів стовбурових клітин [1, 2]. Завдяки своїм унікальним біологічним властивостям та відсутності етичних протиріч для використання, особливу увагу привертають так звані перинатальні МСК, отримані з провізорних органів. Серед них одними з найбільш перспективних для використання у клітинній терапії, визнано МСК з Вартонова студня пупкового кантика (МСК-ВС), що виявляють унікальні секреторні та імуносупресивні властивості [3,4]. Проте через недостатню кількість МСК у тканині-джерелі (ВС) перспектива їхнього використання залежить від розробки методів виділення та культивування клітин, що можуть забезпечити мультиплікацію в умовах *in vitro* зі збереженням їхніх терапевтичних характеристик. При цьому МСК, отримані від різних донорів, можуть розрізнятися за проліферативним потенціалом [5]. Тому пошук універсальних методів оптимізації умов культивування залишається актуальним.

Відомо, що культивування МСК, отриманих з різних джерел у стандартних умовах CO<sub>2</sub>-інкубатора супроводжується старінням культури та втратою регенеративного потенціалу [6,7]. Це обмежує довготривале культивування МСК. Показано, що довготривале пасування неіморталізованих ліній МСК призводить до генетичної нестабільності клітин [8], зменшення їхньої проліферативної активності та потенціалу диференціації, імунорегуляторних та секреторних властивостей [9].

Як відомо, концентрація кисню у тканинах організму, знаходиться в межах 2-9% відсотків [10], тобто, умови CO<sub>2</sub>-інкубатора, де концентрація кисню майже дорівнює атмосферній, фактично, є "гіпероксичним" для клітинних культур. Однією з основних причин передчасного старіння

культур в умовах *in vitro* є пошкодження ДНК реактивними формами кисню (РФК) [11,12]. Численні дослідження показали, що рівень кисню у культуральних умовах здатний модулювати продукцію реактивних форм кисню: внутрішньоклітинний рівень РФК і пошкодження ДНК при атмосферній концентрації кисню виявлявся вищим, ніж за умов помірної гіпоксії [10,13], тоді як культивування за помірної гіпоксії здатне подовжувати час проліферації різноманітних культур клітин гризунів та людини, в тому числі і ембріональних [14]. Особливо важливими ці дані є для культивування МСК, оскільки відомо, що природні сайти локалізації МСК є віддаленими від судин, і можуть вважатися "гіпоксичними" у порівнянні до інших ділянок тканини-джерела [15].

Тому на сьогоднішній день перспективним методом збереження унікальних нативних властивостей МСК з різних джерел вважається культивування за умов знижених концентрацій кисню, близьких до фізіологічних. Це було підтверджено низкою досліджень, які показали позитивний вплив культивування у фізіологічних концентраціях кисню на проліферацію МСК [16,17] та їхню секреторну активність [18].

Найчастіше об'єктом досліджень ефектів культивування у гіпоксії є МСК, отримані з кісткового мозку [19] та інших тканин дорослого організму [17]. Питання впливу концентрацій кисню на життєдіяльність МСК-ВС є недостатньо висвітленим. Наприклад, існують відомості щодо особливостей мультиплікації в умовах *in vitro* [20], секреторної активності тощо [21]. Проте дані щодо одного параметру, зокрема, проліферативної активності, у різних авторів можуть суттєво відрізняються [22, 23]. Крім того, питання сумісного впливу умов помірної гіпоксії на інші методи посилення терапевтичного потенціалу, як, наприклад, трансфекцію цільовими генами, є недослідженим. Окремим цікавим завданням також є пошук додаткових шляхів оптимізації методів культивування за фізіологічних концентрацій кисню. Існують дані щодо цитопротективного впливу інертних газів, зокрема аргону, на культури нейтрального походження [24], але відсутня інформація про біологічні

ефекти інертних газів у культурах стовбурових клітин. Тому перспективними видається застосування та перевірка ефективності газової суміші зі зниженим вмістом кисню, в якій «основним» компонентом можуть бути інертні гази (зокрема, аргон), для культивування МСК.

Дане дисертаційне дослідження присвячене актуальній задачі клітинної біології та біотехнології, а саме - дослідженню фізіологічних концентрацій кисню при культивуванні МСК-ВС, з метою збереження і посилення регенеративного потенціалу МСК-ВС.

### **Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами**

Дослідження проведені в рамках науково-дослідних робіт відділу регуляторних механізмів клітини Інституту молекулярної біології і генетики НАН України за темами «Перетворювальний потенціал нативних та модифікованих стовбурових клітин і його реалізація *in vitro* і *in vivo*» (реєстраційний номер 0112U007302, 2009-2013 р.р.) та «Вивчення сигнальних міжклітинних взаємодій в культурі та організмі мишей» (реєстраційний номер 0112U004218, 2013-2017 р.р.).

**Мета і завдання дослідження.** Метою роботи було оптимізувати метод отримання первинних культур та культивування МСК з Вартонова студня людини шляхом застосування умов фізіологічних концентрацій кисню.

Для досягнення поставленої мети було поставлено наступні завдання:

1. Розробити метод створення сумішей зі зниженим вмістом кисню на основі аргону та азоту та спосіб культивування МСК-ВС в таких умовах.
2. Оптимізувати отримання первинних культур МСК-ВС методом експлантів, шляхом культивування за фізіологічних концентрацій кисню та оцінити його ефективність.
3. Дослідити вплив газових сумішей із зниженим вмістом кисню, на основі аргону та азоту, на проліферативну активність МСК-ВС в процесі пасування культури.
4. Оптимізувати метод оцінювання морфологічних особливостей культури МСК-ВС та перевірити наявність та характер змін морфології в

процесі культивування.

5. Дослідити вплив умов помірної гіпоксії на генетичну модифікацію культур МСК-ВС (невірусний метод трансфекції, за допомогою поліплексів).

6. Порівняти біологічні ефекти газових сумішей, створені на основі азоту і аргону.

**Об'єкт дослідження:** біологічні ефекти концентрацій кисню при культивуванні стовбурових клітин.

**Предмет дослідження:** методи отримання, проліферативні, морфологічні особливості, методи генетичної модифікації культури МСК-ВС *in vitro* при фізіологічних концентраціях кисню.

**Методи дослідження:** в роботі використовували біотехнологічні методи (отримання первинних культур, культивування клітин), цитологічні методи (підрахунок кількості клітин, поточна цитофлюорометрія, мікроскопія, фіксація та забарвлення культур специфічними барвниками, морфометричні вимірювання на фотографіях культур), молекулярно-біологічні методи (трансфекція за допомогою поліплексів), статистичні методи (розрахунок достовірності різниці між групами, дисперсії та коефіцієнту варіації за морфометричними показниками).

**Наукова новизна одержаних результатів.** У результаті проведеної роботи із застосуванням методів клітинної біології та біотехнології було розроблено різні схеми газових сумішей для культивування клітин *in vitro*, зі зниженим вмістом кисню, на основі азоту та аргону, і протестовано культивування МСК-ВС. Вперше було оптимізовано методику отримання первинних культур МСК-ВС методом експлантів, за фізіологічних концентрацій кисню, показано позитивний вплив таких умов на кількість отриманих первинних культур МСК-ВС. Вперше визначено та оцінено проліферативну активність культур МСК-ВС за 3% кисню, в газових сумішах на основі азоту і аргону, і порівняно біологічні ефекти таких сумішей. Встановлено, що обидва склади виявляють позитивний вплив на біологічні характеристики МСК-ВС, але в суміші на основі азоту ці ефекти є більш

вираженими. Завдяки розробленому та оптимізованому методу отримання культур МСК-ВС шляхом збереження та мультиплікації клітин, що спонтанно відкріпились, виявлено позитивний вплив фізіологічних концентрацій кисню, а саме збереження проліферативного потенціалу, при довготривалому культивуванні МСК-ВС. Вперше охарактеризовано морфологічні зміни МСК за умов культивування у різних газових сумішах, і встановлено, що умови помірної гіпоксії знижують кількість клітин з атипичним фенотипом при довготривалому культивуванні. Вперше культивування при фізіологічних концентраціях кисню застосовано як метод оптимізації невірусної трансфекції МСК-ВС, і показано підвищення ефективності трансфекції у таких умовах. Вперше виявлено різницю у біологічних ефектах сумішей зі зниженим вмістом кисню, створених на основі азоту і аргону.

**Теоретичне значення отриманих результатів.** В результаті проведеної роботи отримано низку фундаментальних даних, які доповнюють та розширюють існуючі знання про біологію МСК та вплив фізіологічних концентрацій кисню на виживаність і проліферацію МСК. Запропоновано нові методики для оцінки різних аспектів життєдіяльності клітинних культур: ефективності отримання первинних культур, морфологічної оцінки МСК-ВС в процесі культивування. Показано вплив умов помірної гіпоксії на ефективність трансфекції, що є підґрунтям для виявлення механізмів цього феномену.

**Практичне значення отриманих результатів.** Отримані дані свідчать про критичне значення вмісту кисню для проліферації та морфологічної стабільності МСК. У результаті досліджень оптимізовано відомі методики виділення МСК-ВС з тканини Вартонова студня методом експлантів, розроблено універсальний протокол, який можна застосовувати для отримання первинних культур МСК-ВС з тканини ВС, незалежно від донорських особливостей. Розроблено спосіб введення в культуру та мультиплікації МСК-ВС при фізіологічних концентраціях кисню. Результати



поведеної оптимізації методу виділення МСК-ВС можуть бути застосовані при проведенні досліджень із використанням МСК. Розроблені газові суміші можуть бути рекомендованими для рутинного культивування МСК з метою покращення введення в культуру та мультиплікації клітин, як для наукових так і клінічних цілей. Оптимізований метод трансфекції за допомогою нанорозмірних поліплексів за умов помірної гіпоксії може бути застосований у лабораторних дослідженнях для інших клітинних культур.

**Особистий внесок здобувача.** Результати досліджень, викладені в дисертації, отримані автором самостійно, або за її безпосередньої участі. Спільно з науковим керівником, д.б.н. В.А Кордюмом, проведено планування основних напрямків роботи, обговорення результатів, підготовка публікацій за результатами досліджень. Здобувачем особисто проведено всі роботи з отримання і культивування МСК-ВС, аналіз проліферації МСК-ВС, оптимізацію методу оцінки морфологічної гетерогенності культури, отримання фіксованих препаратів культур МСК-ВС і морфометричний аналіз. Автором самостійно здійснено аналіз вітчизняної та зарубіжної літератури за темою, проаналізовано результати та зроблено висновки.

Розробка систем для культивування МСК-ВС зі зниженим вмістом кисню, у газових сумішах на основі азоту та аргону, була проведена автором сумісно зі співробітником Інституту молекулярної біології і генетики М.П. Сорокою, дослідження характеристик поверхневих маркерів МСК проведено сумісно з В.М. Кириком, співробітником ДУ "Інститут генетичної та регенеративної медицини НАМНУ", розробку методу невірусної трансфекції культур МСК-ВС в умовах помірної гіпоксії проведено разом із співробітником ІМБіГ НАНУ О.К. Топоровою, гістологічні препарати тканини ВС виготовлено на кафедрі цитології, гістології та репродуктивної медицини, ННЦ "Інститут біології та медицини" А.С. Пустоваловим, яким автор висловлює щире подяку.

**Апробація матеріалів дисертації.** Результати досліджень доповідалися і були представлені на 6 українських і міжнародних фахових конференціях:

на науково-практичній конференції з міжнародною участю "Генетична і регенеративна медицина: проблеми та перспективи" (Київ, Україна, 2010); на міжнародній конференції «International Life Sciences Students` Conference» (Неймеген, Нідерланди, 2010); на міжнародній конференції «The 4th international IMBG conference for young scientists “Molecular biology: advances and perspectives”» (Київ, Україна, 2011); на науково-практичній конференції з міжнародною участю "Актуальні проблеми регенеративної медицини", (Київ, Україна, 2012); на науково-практичній конференції з міжнародною участю «Fraunhofer Life Sciences Symposium» (Лейпциг, Федеративна Республіка Німеччина 2012); на науково-практичній конференції з міжнародною участю «Інноваційні напрями в генетичній та регенеративній медицині» (Україна, Київ, 2017).

**Публікації.** Матеріали дисертації опубліковано у 5 наукових статтях у фахових наукових журналах та тезах 6 доповідей на наукових конференціях.

**Структура та обсяг дисертації.** Дисертація викладена українською мовою на 150 сторінках комп'ютерного набору. Робота складається з чотирьох розділів (огляд літератури, матеріали та методи, результати, обговорення і узагальнення результатів). Дисертація ілюстрована 28 рисунками, 8 таблицями. Список літератури містить 194 джерела, серед яких 190 зарубіжних авторів.

## РОЗДІЛ 1

### ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

#### **1.1. Мезенхімальні стовбурові клітини - субпопуляція стовбурових клітин дорослого організма**

Мезенхімальні стовбурові клітини (МСК), які також називають мультипотентними стромальними клітинами, є популяцією мультипотентних (за деякими джерелами - плюрипотентних) стовбурових клітин [25], що характеризуються здатністю диференціюватись в напрямку соматичних клітинних ліній, а саме остеогенної, хондрогенної та адипогенної [26, 27]. МСК були вперше ідентифіковані в кістковому мозку А.Я. Фріденштейном [28,29] і охарактеризовані як популяція не-гемопоетичних мультипотентних клітин.

Показано, що МСК в організмі відіграють роль "тканинного резерва" і є необхідними для підтримання гомеостазу [30]. Вони беруть участь в фізіологічній та репаративній регенерації шляхом диференціювання в різні типи клітин мезенхімального походження. МСК можуть продукувати паракринні фактори, які сприяють підвищенню виживання пошкоджених клітин, і активують пул клітин-попередників тканини [31-37]. Подальше вивчення біологічних властивостей МСК зробило їх привабливим об'єктом для створення різних підходів клітинної терапії. Численні дослідження показали, що трансплантація МСК є ефективною для терапії широкого спектру патологій [38-49].

В 2006 році Міжнародне товариство Клітинної терапії визначило

критерії, за якими виділену з тканини та культивовану *ex vivo* популяцію клітин можна віднести до МСК [26]: адгезія до пластику, наявність поверхневих маркерних білків CD90, CD73 та CD 105, відсутність білків CD34 та CD45, а також здатність до остеогенної, адипогенної та хондрогенної диференціації під впливом відповідних умов культивування.

Першою тканиною, в якій було показано існування клітин з властивостями МСК, був кістковий мозок [28]. Однак за останніми даними клітини з властивостями МСК можуть бути виділені з широкого спектру органів і тканин [15,25].

В сучасній науковій літературі виділяють дорослі і неонатальні тканини-джерела МСК [50,51]. До перших, наприклад, відносять кістковий мозок (КМ) [52], периферичну кров [53], жирову тканину [54]. Фактично, МСК виділяються з усіх джерел, які мають сполучнотканинний компонент [55]. До неонатальних джерел МСК відносять пуповинну кров, амніотичну рідину [56], плаценту, плодові оболонки [57,58], пупковий канатик [59].

**1.1.1 МСК з пупкового канатика людини.** У літературі МСК неонатальних тканин часто виділяють в особливу групу «перинатальних» МСК, які мають властивості як ембріональних, так і стовбурових клітин дорослого організму [60]. Особливий інтерес становлять МСК матриксу пупкового канатика - Вартонова студню (МСК-ВС). Це обумовлено не тільки етичними причинами, але і комплексом їх біологічних властивостей. Порівняно з МСК, отриманих з інших джерел, МСК-ВС можуть бути особливо перспективними для використання у клітинній терапії, внаслідок не тільки їхнього потенціалу диференціації [61] і особливих імунологічних властивостей [62], але і високої паракринної активності [63]. Подібні властивості, як вважають, зумовлені формуванням популяції на ранній стадії ембріогенезу [64,65], що дозволяє МСК-ВС зберігати подібність з ембріональними стовбуровими клітинами [66,67].

Джерелом розвитку власне Вартонового студню (ВС) є поза-зародкова

мезодерма ембріобласта. ВС, як вважають, захищає судини пупкового канатика (дві артерії і одну вену), забезпечуючи його пружність [55]. Основна речовина тканини містить значну кількість глікозаміногліканів, особливо гіалуронової кислоти і хондроїтинсульфату. Фібрилярний компонент представлено колагеновими волокнами, еластичні волокна відсутні. Клітинний компонент ВС представлений похідними мезенхіми (крім МСК - фібробластами, міофібробластами, гладкими міоцитами) [68].

Стосовно МСК, найпоширенішою версією їхньої появи у ВС є запропонована в роботі Wang та колег. Показано, що гемопоетичні клітини і МСК з жовткового мішка і області "аорти-гонад-мезонефроса" мігрують з пупкового канатика в область плаценти, а потім назад в печінку та кістковий мозок зародка. Під час цих двох хвиль міграції частина клітин "затримується" в Вартоновом студні і залишається в ньому протягом всього терміну гестації. При цьому нове мікрооточення змінює властивості мігруючих клітин, що, можливо, і пояснює їх відмінності від інших популяцій МСК [64].

МСК-ВС мають також риси соматичних мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин кісткового мозку дорослого організму [66], які визначені Міжнародним товариством клітинної терапії [50]: при введенні в культуру, вони адгезують до культурального пластику, є позитивними за поверхневими маркерними білками CD105, CD73, CD90, та негативними за CD45, CD34, та здатні до диференціації у остеогенному, адипогенному та хондрогенному напрямках [60,66]. Окрім того, вони мають риси подібності до ембріональних стовбурових клітин, зокрема, експресують маркери ембріональних клітин Tra-1-60, Tra-1-81, SSEA-1 (stagespecific embryonic antigen-1), SSEA-4, лужну фосфатазу [60], та маркери плюрипотентності Oct-4, Sox-2, і Nanog, хоча і на нижчому рівні, ніж ембріональні стовбурові клітини. Крім того, є данні, що, окрім мезодермальних ліній диференціації, "класичних" для МСК-КМ, МСК-ВС можуть також диференціюватись у нейральну лінію клітин [60].

## 1.2. Особливості та проблеми культивування МСК

Для наукових досліджень та застосування в клінічній практиці необхідним етапом роботи з культурами МСК, незалежно від джерела одержання, є їхня мультиплікація *ex vivo*. Обумовлено це недостатньою для практичного використання початковою кількістю клітин в тканинах організму. Наприклад, кількість МСК в найбільш дослідженому джерелі - кістковому мозку, у новонародженого становить 0,01% від загальної клітинної популяції, знижуючись з віком до 0,001-0,005% [69]. Згідно з літературними даними, в клінічних дослідженнях 2 фази при терапії гострої реакції "трансплантат проти господаря", для отримання ефекту, має бути трансплантовано  $2 \times 10^6 - 8 \times 10^6$  клітин на 1 кілограм маси тіла [70]. Тому, для отримання терапевтичної дози, необхідна розробка протоколів культивування, які сприяли б максимальній мультиплікації клітин без втрати їхніх терапевтичних властивостей.

Низка досліджень останніх років, присвячені МСК, що виділені з різних джерел, показали, що умови культивування можуть значно впливати на властивості МСК та їхню "поведінку" в культурі, а також збереження терапевтично значущих рис [71]. На жаль, формат даної роботи не може повноцінно охопити всі виявлені особливості культивування, тому зупинимось лише на деяких. Серед основних параметрів, починаючи з етапу отримання первинної культури, слід враховувати особливості складу поживного середовища, субстрат та особливості "посіву" МСК, як, наприклад, конфлюентність культури [72].

Щодо поживного середовища, вперше процес культивування МСК на прикладі популяції МСК кісткового мозку описав ще А. Я. Фріденштейн. Класичний метод культивування МСК полягає в інкубуванні адгезивної культури клітин в середовищі MEM з додаванням ембріональної телячої

сироватки (ЕТС), що в подальших роботах різних дослідників може варіювати від 2 до 20% [55]. В якості альтернативи деякі автори пропонують використовувати сироватку крові та тромбоцитарні продукти людини [73, 74]. Залежно від вибору поживного середовища, ростові процеси в культурах з одного джерела можуть відрізнятися [75]. Однозначної думки щодо доцільності використання тих чи інших середовищ та їх компонентів до цього часу не існує, через індивідуальні особливості МСК з різних джерел, та у випадку МСК людини - індивідуальні особливості донорів [76]. Отже, при виборі оптимального способу культивування для певної популяції МСК, слід враховувати численні вихідні параметри штучного середовища.

Стосовно особливостей субстрату: хоча адгезія до культурального пластику є однією з характеристик МСК, показано культивування МСК на альтернативних субстратах - наприклад, фібронектину або колагену [77], що може значним чином впливати на проліферативні характеристик культур. Цікавим є факт, що початкова щільність моношару МСК може мати вплив на їх проліферативні характеристики [78] та потенціал диференціації [79,80]. Особливу увагу варто звернути на процедури, пов'язані з пасуванням клітин. Відкріплення їх від субстрату пов'язане з можливим пошкодженням клітинної поверхні [81,82]. Тому вибір засобу відкріплення клітин від субстрату може вплинути на збереження терапевтичних властивостей культури.

Головною проблемою культивування МСК (та ускладнень, пов'язаних з цим) є те, що загальноприйняті умови культивування *in vitro* значно відрізняються від природніх місць локалізації МСК, як мікрооточенням, так і ключовими факторами, що регулюють життєдіяльність МСК (наприклад, просторова організація та концентрація кисню) [10,15]. Подібні відмінності є основною причиною пошкодження клітин в процесі культивування. Тому, оптимізація за цими двома параметрами може відігравати значну роль у збереженні терапевтично значущих рис МСК.

**1.2.1 Проблема деградації культури при мультиплікації в умовах *in vitro*.** Оскільки загальноприйняті умови культивування *in vitro* відрізняються від таких в організмі, мультиплікація культур МСК *ex vivo*, яка є необхідним етапом роботи, пов'язана з ризиком втрати клітинами терапевтично значущих властивостей. Показано, що культивування МСК протягом тривалих періодів є небезпечним через ризик виникнення генетичних порушень [5,71]. Термін отримання необхідної для клінічного використання кількості МСК кісткового мозку може досягати 3-5 тижнів, що, при необхідності їх швидкого використання, може виявитися занадто довгим [83]. Таким чином, існує завдання отримання максимальної кількості клітин та скорочення часу їхнього перебування у культурі.

При тривалому пасуванні клітин в культурі йде прогресивне накопичення пошкоджень макромолекул, що призводить до порушень життєдіяльності клітини [11,83]. Наприклад, відомо, що, починаючи з другого пасажу, у МСК можуть накопичуватися пошкодження генетичного апарату та припиняється синтез певних регуляторних факторів [82].

Показано, що однією з основних причин старіння будь-яких клітин в культурі *in vitro* є оксидативний стрес [84]. Одним з основних джерел пошкодження ДНК є реактивні форми кисню [85]. Тому існує думка, що причиною деградації клітинних культур, особливо, стовбурових клітин, є підвищена, порівняно з тканинною, концентрація кисню. Потенційним рішенням такої проблеми називають культивування при знижених концентраціях кисню, що дає змогу пом'якшити пошкоджуючий вплив умов культивування.

### **1.3. Концентрація кисню в тканинах організму ссавців**

Дихання є складним багаторівневим процесом. У організмі людини, доставка кисню з атмосфери до клітин включає в себе проходження кисню (у



складі атмосферного повітря) по альвеолах, пасивну дифузію в легеневі капіляри, зв'язування з гемоглобіном, рух по судинах, дифузію з мікроциркуляторного русла через міжклітинний матрикс мембрани клітин. Всередині клітин залучення кисню у метаболічні процеси пов'язане з його надходженням до мітохондрій. Значення парціального тиску кисню (ПТК) поступально падає спочатку в легенях, потім, при проходженні крові по альвеолярним капілярам, знижується до 104 мм рт.ст. (приблизно 15%), усереднене в судинах тканин сягає 20 мм. рт.ст., і вже в капілярах залишається на рівні (в середньому) 3%. Різниця між вмістом кисню по різні боки артеріальної стінки є незначною [86]. У тканинах концентрація кисню може коливатися від 1% до 5%, в залежності від щільності розташування капілярів, рівня функціональної активності клітин, тощо [87].

Вміст кисню у різних тканинах істотно розрізняється. Наприклад, у сітківці – 25 мм. рт.ст., в селезінці щурів вона становить 16 мм. рт.ст. (приблизно 2% кисню), в тимусі – 10 мм. рт.ст. (приблизно 1,3% кисню) [88]. Тканини мозку щура характеризуються ще більш низькими значеннями – 4-8 мм. рт.ст. і т. д. На відстані 100-150 мкм від поверхні капіляра концентрація кисню падає до нуля [89]. Також концентрація залежить від місця виміру. Всередині тканин відбувається подальший перерозподіл між клітинами і, в свою чергу, зумовлюється структурною організацією тканини. Відстань в тканині між капілярами, за даними різних авторів коливається в межах від 200 до 300 мкм. З урахуванням (дуже умовно і дуже усереднено) розподілу клітин (діаметра, поперечника осі між сусідніми капілярами і т. д.) в зоні від стінки одного капіляра до сусіднього знаходиться  $\approx$  10-15 шарів клітин.

У цитоплазмі клітин, як вважають, концентрація кисню коливається в межах 2,5-0,5%. В результаті в мітохондріях (тобто там, де відбувається 90% споживання всього кисню, засвоюваного організмом) вміст кисню становить  $\approx$  0,15%. До того ж, на характер розподілу кисню в ділянці тканини впливає багато інших чинників: стан і функціонування легенів; кількість еритроцитів та вмісту у них гемоглобіну, «архітектура» шарів клітин та міжклітинної

речовини в даній ділянці. Варіювати можуть також процеси звільнення кисню з гемоглобіну, через особливості стану мембрани еритроцитів, рідкої фази крові, стінки капіляра.

### 1.3.1. Молекулярні механізми чутливості до концентрації кисню.

Центральним сигнальним каскадом адаптації до зменшення концентрації кисню визнано шлях HIF (hypoxia-inducible factor - фактор, індукований гіпоксією), який був відкритий і вперше описаний як транскрипційний фактор гена еритропоетину [90]. HIF-1 - гетеродимер, що складається з субодиниць HIF-1 $\alpha$  і HIF-1 $\beta$ , остання також відома як ARNT (aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator) [91]. HIF-1 може взаємодіяти з HIF-1 $\beta$  і формувати транскрипційно активні комплекси. HIF-1 $\alpha$  і HIF-1 $\beta$  постійно синтезуються в клітині. Вважається, що на цей процес концентрація кисню не впливає. HIF-1 $\alpha$  має, короткий період напіввиведення - менше ніж 5 хвилин, а HIF-1 $\beta$  стабільний [92]. В умовах нормального для клітини рівня в ній вільного кисню пролілгидроксилаза PHD гідроксильє HIF-1 $\alpha$ . Після реакції з PHD, гідроксильована HIF-1 $\alpha$  набуває здатності зв'язуватися з убіквітин-лігазним комплексом E3 з допомогою його компонента, білка pVHL (von Hippel-Lindau tumour suppressor protein). Комплекс, крім pVHL містить елонгін, Cul2 і Rbx 1. Комплекс E3 «мітить» гідроксильований HIF-1 $\alpha$  поліубіквітиновим хвостом, після чого HIF-1 $\alpha$  руйнується у протеосомі. HIF-1 $\beta$  не є субстратом для PHD, і постійно знаходиться в клітині, локалізуючись в ядрі [93].

За гіпоксії PHD не гідроксильє HIF-1 $\alpha$  на достатньому рівні, і субодиниця HIF-1 $\alpha$  транслокується в ядро, димеризується з HIF-1 $\beta$  та зв'язується з елементами, чутливими до гіпоксії, так званими HRE, регуляторними ділянками цільових генів [94].

Відомо більше 200 ймовірних генів-мішеней HIF, експресія котрих так чи інакше спрямована на виживання клітини в умовах пониженого вмісту кисню. Ці гени регулюють ангиогенез, тонус судин, еритропоез, контроль

позаклітинного рН, енергетичний метаболізм (надходження глюкози в клітину), виживання і проліферацію і ін. Генами-мішенями HIF є VEGF, транспортер глюкози (GLUT-1), ферменти гліколізу, альдолаза А, енолаза 1, лактатдегідрогеназа а, фосфогліцераткінази 1, iNOS (індуцібельна NO-синтаза) фактори ангіогенезу, PDGF, TGF $\alpha$ , еритропоетин, SDF-1, а також гени факторів міграції клітин, сигнальні молекули клітинного циклу (c-Met, TGF $\beta$ , CXCR4 (рецептор SDF-1), матриксних металопротеїназ [95]. Вважають, що на рівні транскрипції до 1-1,5% генома може регулюватися факторами HIF.

Згідно із літературними даними, ізоформа HIF-1 $\alpha$  є «основною» в клітині. HIF-2 $\alpha$  – тканинспецифічний фактор. Ізоформу HIF-2 $\alpha$  також називають «ендотеліальний білок з PAS-доменом» (EPAS1), HIF-1 – подібний фактор (HLF) і HIF-1 – родинний фактор (HRF). HIF-2 $\alpha$  також димеризується з HIF-1 $\beta$  і може зв'язуватися з HRE. Є низка генів, які активуються і HIF-1 $\alpha$  і HIF і HIF-2 $\alpha$  [96]. Оскільки миші, дефектні за HIF-1 $\alpha$  і HIF-2 $\alpha$ , мають різні фенотипи, існує припущення, що роль факторів не ідентична. Показано, що існує різниця на рівні молекулярних взаємодій лізоформ з іншими факторами. Наприклад, HIF-2 $\alpha$  може зв'язуватися з NEMO (NF-kappaB essential modulator) і іншими генами-мішенями. За деякими даними HIF-2 $\alpha$  регулює експресію Oct-4, одного із центральних маркерних генів стовбурових клітин [97]. Для HIF-3 $\alpha$  не описана функція транскрипційного фактора, хоча він може димеризуватися з HIF-1 $\beta$  і зв'язуватися з HRE. Його вважають негативним регулятором HIF – опосередкованої транскрипції. Продукт альтернативного сплайсингу гена, що кодує HIF-3 $\alpha$ , так званий IPAS (інгібіторний білок з PAS-доменом), димеризується з HIF-1 $\beta$  (з аміно-термінальним кінцем) та інгібує транскрипцію генів мішеней «відбираючи» HIF-1 $\beta$  від HIF-1 $\alpha$  (або запобігаючи його зв'язуванню з ДНК). Рівень IPAS також залежить від концентрації кисню. Він індукується при гіпоксії в печінці та легенях і таким чином виступає в ролі негативного зворотного регулятора для HIF-1 $\alpha$ . Його

експресія реєструється також в клітинах Пуркінє і епітелії рогівки [98].

У клітинах ссавців центральним і основним безпосереднім «сенсором», чутливим до концентрації кисню елементом, є фермент, який отримав назву «пролілгідроксілазний домен» - PHD. За нормальних умов, при достатній для функціонування клітин концентрації кисню, PHD окислює HIF-1 $\alpha$ . Відомі три його ізоформи: PHD1, PHD2, PHD3. Хоча PHD1-3 мають загальні риси, вони відрізняються профілем експресії в тканинах [100], субклітинною локалізацією [99], взаємодією з іншими білками, чутливістю до гіпоксії. PHD1 (44 kDa) експресується конститутивно. Існує 2 варіанти ізоформи PHD1 (40-43 kDa), які є результатом альтернативної ініціації трансляції. PHD2 (46 kDa) у багатьох типах клітин - головна ізоформа, яка опосередковує деградацію HIF $\alpha$ . В умовах гіпоксії спостерігається посилення транскрипції PHD2 і PHD3 [101]. Всі три ізоформи можуть гідроксилувати HIF1 $\alpha$  *in vitro*. Їх активність розташовується в такій послідовності: PHD2 >> PHD3 > PHD1 [102]. PHD2 найбільш поширена в цитоплазмі і, як вважають, контролює постійну концентрацію HIF1 $\alpha$ . При достатній концентрації кисню внутрішньоклітинні рівні PHD1 і PHD3 дуже низькі. PHD1 ідентифіковано виключно в ядрі, PHD3 стохастично розподілена між ядром і цитоплазмою, більшість PHD2 міститься в цитоплазмі, хоча для PHD2 і PHD3 показано істотне присутність в ядрі як нормальних, так і неопластичних клітин. Гіпоксія не впливає на локалізацію ферментів. Експресуючись в різних тканинах, ізоформи PHD відрізняються кількістю транскрибованої мРНК в залежності від типу клітини. Наприклад, експресія генів PHD2 і PHD3 підвищується при гіпоксії, тоді як загальний синтез білка зменшується [102].

Регуляція стабільності HIF також опосередковується кисень-незалежним шляхом. У цитоплазмі HIF-1 $\alpha$  зв'язується з білком теплового шоку Hsp90, і ця асоціація підвищує стабільність субодиниці. Вірогідно, це має значення при різних стресових ситуаціях. Вплив інгібіторів Hsp90 (наприклад RACK1, рецептор активованої протеїн С-кінази), здатний викликати зв'язування HIF-1 $\alpha$  з убіквітином, активацію убіквітин-лігазної системи і стимулювати

деградацію HIF-1 $\alpha$ - субодиниці [94]. Існують дані, що баланс між внутрішньоклітинною концентрацією HIF-1 $\alpha$  та PHD впливає на кінцевий результат регуляції генів, пов'язаних з гіпоксією [103]. Крім HIF, у якості інших сенсорів кисню розглядають НАДФН-окисдазу і гем-вмісні білки.

Як приклад функціонування каскаду, можна навести один з елементів адаптації ембріональних фібробластів миші до гіпоксичних умов. Для адаптації до умов хронічної гіпоксії їм необхідна активність HIF, яка полягає у наступному: HIF-1 активує ген кінази піруватдегідрогенази 1 (який інактивує каталітичну субодиницю піруватдегідрогенази і заважає входу пірувату в цикл трикарбонових кислот), і ген, який кодує BNIP3 (білок мітохондріальної аутофагії), таким чином зменшуючи транспорт електронів по ЕТЦ, що запобігає збільшенню продукції РФК [104].

**1.3.2. Кисень як регулятор життєдіяльності ніші стовбурових клітини.** Численні дослідження показали, що через свою пластичність СК, та особливо МСК, дуже чутливі до середовища, що оточує їх в даний момент, і їхня життєдіяльність суттєво залежить від регуляції позаклітинними факторами. Тому за весь час вивчення біології МСК в науковій спільноті виникла концепція „ніші” – базової одиниці тканинної архітектури, усередині якої існують молекулярні і клітинні фактори, які регулюють поведінку клітин-компонентів ніші [105].

У сучасній науковій літературі визначено сукупність рис, притаманних всім гіпотетичним нішам СК тканин дорослого організму. По-перше, вважається, що ніша СК складається з групи клітин в певному місці, що функціонують для забезпечення стовбурового стану клітин. По-друге, молекули адгезії у такій ділянці беруть участь у взаємодії між СК і нішею, та між СК та міжклітинним матриксом. Також, ніша продукує фактори, що контролюють чисельність СК, їх проліферацію та детермінаційне майбутнє, і контролює асиметричний поділ СК, що сприяє виникненню двох різних дочірніх клітин: СК та клітину - прогенітор, комітовану до певного

диференціювання.

Отже, саме ніша СК підтримує мультипотентні та плюрипотентні риси клітин, що входять до неї, і це справедливо не лише для КМ. Як вже зазначалось, СК можуть перебувати у відносно різних на перший погляд мікрооточеннях і мати різні шляхи диференціації [10]. Тому відтворення певних особливостей мікрооточення в умовах культивування може бути ключовим для культури МСК.

Історично першим джерелом, з якого були отримані МСК, був кістковий мозок (КМ) [28]. Нині він залишається одним з найбільш вивчених джерел МСК. За роки досліджень популяцій клітин кісткомозкового походження із стовбуровими властивостями, були також отримані і данні про структуру КМ, особливості його формування та підтримання життєдіяльності в онтогенезі. Стосовно особливостей розміщення СК з КМ, було показано, що популяції мультипотентних клітин, які здатні проліферувати та диференціюватися, підтримуються судинними структурами і клітинами строми (адвентиційні ретикулярні клітини, клітини ендотелію). За роки досліджень з'явилися докази, що найменш диференційовані СК та прогенітори розташовуються в місцях, найбільш віддалених від синусів, в процесі диференціювання просуваються до меж синусу [105].

Разом з виявленими особливостями, з'явилась концепція, згідно якої концентрація кисню в ніші є не лише фізіологічним фоном, а одним з ключових факторів регуляції її життєдіяльності, тому на питання вмісту кисню в природніх сайтах локалізації МСК продовжують звертати увагу. Наприклад, визначити ПТК в КМ експериментальними методами доволі складно, тому до цього часу не припиняються спроби його визначення інвазивними методами та методами математичними, за допомогою модифікованих моделей Крога. Варто зауважити, оригінальна модель Крога (1918 року) була винайдена для м'язової тканини навколо капіляра. Тканина в цій моделі зображується циліндром з певним діаметром, всередині якого проходить капіляр. М'язова тканина є доволі однорідною, тоді як КМ має

складну архітектуру, тому і застосовуються модифіковані розрахунки, іноді комбіновані з експериментальним дослідженням. Вимірювання показали, що КМ в основному є середовищем гіпоксичним, в деяких місцях вміст кисню може бути приблизно 1-2%. Результати недавніх досліджень показали, за допомогою математичних моделей та вимірювань, що ГСК розміщуються в районах з суворою гіпоксією [106]. Місця локалізації МСК та ГСК співпадають, отже, таке твердження справедливе і для МСК.

Вивчення мікрооточення МСК з інших тканинних джерел показало, що ніші МСК взагалі характеризуються зниженим, навіть у порівнянні з оточуючими ділянками тканини, вмістом кисню [105]. Так, останнім часом науковий інтерес викликають також МСК жирової тканини, через їхню відносну доступність. Жирова тканина взагалі має добру васкуляризацію і є джерелом МСК (ЖМСК), здатних диференціюватись у адипогенну, остеогенну, хондрогенну, міогенну, ендотеліальну і нейрональну лінії. ЖМСК отримують з аспірованих жирових тканин, а саме їхніх стромально-васкулярних фракцій; однак, структурне розташування ЖМСК відносно інших типів клітин (адипоцитів, преадипоцитів) невідоме. Незважаючи на високий рівень васкуляризації, концентрація кисню в жировій тканині приблизно відповідає 3%. Існування за відносно низьких концентрацій кисню притаманне і іншим стовбуровим популяціям дорослого організму. Існують данні, що стовбурові елементи головного мозку – нейральні прогенітори локалізуються в ділянках з дуже низьким вмістом кисню [107]. Мозок, як вже згадувалось, є тканиною, в якій ПТК балансує на межі між таким, при якому пошкодження мінімальне і низьким до створення ішемії.

Згідно із сучасними концепціями, кисень є не лише метаболічним субстратом, фізіологічним фоном, але також і важливою сигнальною молекулою, що регулює проліферацію та диференціацію клітин. Так, проліферація клітини залежить від динамічного сигналізування ніші. Забезпечення балансу між стимулюючими та пригнічуючими сигналами є ключовою для забезпечення гомеостазу СК [108]. Роль гіпоксії у долі

гемопоетичних СК давно є предметом досліджень. Показано, що низькі рівні кисню (між 3% та 5%) є критичною умовою для інгібування диференціації *in vitro* і підтриманні стовбурового стану, наприклад, одного з різновидів МСК КМ людини (MIAMI) [109].

**1.3.3. Фізіологічні концентрації кисню як сучасний підхід до збереження терапевтичних властивостей МСК.** Загальноприйняті умови культивування клітин в CO<sub>2</sub>-інкубаторі, де концентрація кисню близька атмосферній, для МСК є вираженою "гіпероксією", що призводить до оксидативного стресу. При тривалому пасуванні в культурі спостерігається накопичення різних молекулярних пошкоджень [71]. З огляду на це, перспективним підходом до культивування МСК вважається зниження концентрації кисню до рівня, близького до фізіологічних концентрацій в нішах [110,111].

Дослідження показали, що фізіологічні умови для МСК включають істотно знижений порівняно з атмосферним вміст кисню (1-7%). Передбачається, що культивування МСК в умовах гіпоксії призводить до активації механізмів, залежних від фактора HIF-1, що впливають на ріст і диференціювання клітин. Наприклад, гіпоксія викликає збільшення експресії низки факторів адгезії і міграції МСК [112], а також цитокінів, і, що важливо, про-ангіогенних факторів [113]. Показано, що культивування в умовах гіпоксії здатне підвищити ефективність культивування МСК, отриманих з матеріалу донорів віком до 58 років [69].

#### **1.4. Деякі аспекти культивування МСК за фізіологічних концентрацій кисню**

**1.4.1. Вплив умов помірної гіпоксії на проліферацію МСК.** Показано, що культивування МСК при концентрації кисню від 1,5 до 10 % в атмосфері значно підвищує їхній проліферативний потенціал, незалежно від джерела



отримання. Це було показано для популяцій МСК з КМ [16,19], жирової тканини [17], неонатальних тканин [20,111]. Кількісні дані у відомих з літератури експериментах, отримані різними дослідниками, не співпадають навіть для клітин з однакових джерел, але факт підвищення проліферативної здатності культури був неодноразово підтверджений [114]. Деякі дослідники називають сумарну цифру збільшення кінцевої кількості клітин у 30 разів [115]. Варто зауважити, що для досягнення такого ефекту використовують як відносно довгочасове культивування [116], так і "прекондиціонування" – вплив гіпоксичних умов впродовж короткого, до 48 годин, часу [117].

Подібна тенденція притаманна як адегизивним культурам МСК, культивованим за допомогою поширених методик, де клітини прикріплюються до дна культурального посуду, так і 3D-культурам, на різноманітних носіях [118]. Наприклад, в роботі Grayson та колег, було показано, що МСК людини, культивовані при 2% кисню в 3D конструкціях мають зміни в метаболізмі і підвищений проліферативний потенціал порівняно з такими, що культивувались за стандартних умов [119]. МСК, як правило, в таких культурах мають подібну ростову криву: лаг-фаза, фаза лінійного росту, потім число клітин залишається постійним (після 24-25 днів), коли чисельність клітин сягає приблизно  $2 \times 10^6$ . Зменшення концентрації кисню впливало на ростову кінетику МСК: показано, що клітини більш тривалий час заходяться в лаг-фазі [119]. Питання щодо молекулярних механізмів, які забезпечують подібний ефект, залишається відкритим. Встановлено, що МСК людини не мають особливих змін у експресії p21 та p53 на ранніх стадіях культури порівняно з популяціями із стандартних умов, а на більш пізніх пасажах, рівні експресії p21 та p53 у МСК в гіпоксії (2%) навіть були нижчими [115].

Більшість робіт, присвячених культивуванню МСК з різних джерел, використовують концентрацію кисню, що не перевищує 5% [20, 120, 121]. Показано, що при перевищенні концентрації  $O_2$  5%, HIF-1a деградує у протеосомі за 5 хвилин. У випадку МСК з КМ, функціонування каскаду HIF1

є одним з ключових факторів переходу від окисного фосфорилювання на гліколіз, який, в свою чергу, є важливим регулятором для шляхів диференціації та виходу з дормантного стану [122]. Тому, постає цікаве питання, чи є дана концентрація "пороговою" для спостереження біологічних ефектів при культивуванні МСК.

Варто зауважити, що умови так званої суворої гіпоксії (менше 0,5%), можуть викликати зупинку клітинного циклу в багатьох типах клітин. Наприклад, культивування ембріональних фібробластів миші в умовах гіпоксії інгібувало їх проходження G1 фази клітинного циклу [123]. Для МСК "пороговим" значенням, що може пригнічувати їх проліферативні властивості, деякі дослідники називають 1% кисню [124].

До теперішнього часу відомо не багато робіт, присвячених питанню впливу низьких концентрацій кисню на проліферацію МСК з пупкового канатика, а особливо ВС [20, 22]. Втім, результати свідчать про значно більшу кількість клітин, яку вдається отримати при мультиплікації МСК в умовах помірної гіпоксії. Наприклад, у дослідженні Drela та колег вдалось підвищити життєздатність популяції МСК-ВС майже на 100% [23], що свідчить про перспективність методу.

Питання оптимізації концентрації кисню, за якої проліферативний потенціал певної популяції буде максимальним, залишається відкритим, що обумовлено особливостями МСК з різних джерел та від різних донорів.

**1.4.2. Вплив на морфологію, диференціацію та старіння.** Показниками, які свідчать про стан МСК в культурі є не лише проліферація, а й морфологія клітин та їхня синтетична і секреторна активність.

Вплив гіпоксичних умов культивування на морфологічні особливості культур МСК часто лишається поза увагою дослідників. Втім більшість літературних джерел свідчать про те, що гіпоксія не викликає збільшення числа клітин з атиповою морфологією, що могло б свідчити про деструктивні процеси в культурах. Лише в роботі Ren et al. [125] спостерігались

морфологічні прояви старіння в культурі, що дослідники пов'язують з великою кількістю подвоєнь.

Подібні спостереження, в комплексі з даними щодо проліферації, є ознаками того, що культивування при фізіологічних концентраціях кисню сприяє підтриманню властивості популяції до самооновлення - та збереженню якостей "стовбуровості", що є особливо важливим при тривалій експансії. Це підтверджено роботами в двох напрямках: дослідженням проліферації та особливостей експресії маркерних генів. Щодо проліферації, показано, що під час довготривалого культивування МСК, підвищується рівень маркерів, що характеризують термінальну зупинку росту, як, наприклад, циклін-залежні кінази p15, p16 і p21, і, на додачу, збільшується число клітин з високим рівнем асоційованої зі старінням  $\beta$ -галактозидази (маркер процесів старіння клітин) [126]. Показано, що в культурах за атмосферної концентрації кисню на 25 поділі більшість клітин були позитивні за  $\beta$ -галактозидазою, асоційованою зі старінням, тоді як в культурах з умов гіпоксії - лише в деяких на 28 поділі, що свідчить про те, що гіпоксія захищала культуру від старіння, що може бути причиною підвищеної тривалості життя культури *in vitro* [127].

В той же час, стимуляція диференціації МСК в умовах знижених концентрацій кисню є неефективною. Умови знижених концентрацій кисню, наприклад, гальмували адипогенез МСК-КМ [128, 129] та остеогенез [109,121]. При цьому клітини не втрачали маркерних характеристик та хромосомної стабільності [124] і в цілому не мали деструктивних змін.

Існують дані, що пригнічення диференціювання може залежати від концентрації кисню. Якщо в середовищі, що містить 5% кисню, спостерігалось невелике зниження здатності МСК до мінералізації позаклітинного матриксу і накопичення ліпідних крапель у порівнянні з такими при 20% кисню, то в умовах 1% кисню МСК практично повністю втрачали здатність до мінералізації матриксу і не могли диференціюватися в адипоцитарному напрямку [121].

Показано, що за гіпоксії підвищується експресія генів, які відповідають за підтримання стовбурового стану [127]. Зниження концентрації кисню змінює характер експресії Oct-4, транскрипційного фактора, необхідного для підтримання ембріональних стовбурових клітин в недиференційованому стані, що також присутній у популяціях дорослих СК, мультипотентних прогеніторів та гемопоетичних СК. На мишиних моделях було продемонстровано, що прямим регулятором Oct-4 є HIF-2 $\alpha$ . МСК-КМ при 2% кисню, виявляють покращену колонієформуєчу здатність, і, крім Oct-4, мають вищий рівень експресії ембріональних генів стовбуровості Rex-1 та SSEA-4 [97].

Є інші данні, які свідчать на користь того, що гіпоксія підтримує стовбуровий стан МСК. Наприклад, відомо пригнічення експресії генів PPAR $\gamma$ 2 і C/EBP $\alpha$ , критичних при адипогенній диференціації, в умовах знижених концентрацій кисню [130]. В стромальних клітинах КМ (до яких входять також МСК), гіпоксія може активувати сигнальний шлях TGF  $\beta$ -Smad, підвищуючи рівні фосфорильованого Smad 2/3, що також призводить до інгібування адипогенної диференціації [128]. Також зниженні концентрації кисню інгібують міогенну диференціацію, при чому; найсильніший ефект проявляється в майже безкисневому середовищі. Це може відбуватись шляхом інгібування ключового фактору міогенної диференціації MyoD, чи транскрипційним коактиватором E2A [131]. Також подібний ефект може досягатись Notch-залежним шляхом. Показано, що гіпоксія викликає збільшення тривалості періоду напіврозпаду Notch; цей ефект потребує наявності HIF-1 $\alpha$ . Існує неканонічна модель дії HIF-1 $\alpha$  в умовах гіпоксії, згідно якої HIF-1 $\alpha$ , стабілізований гіпоксією, взаємодіє з Notch 1 ICD (внутрішньоклітинний домен Notch, що при активації рецептора відрізається і транспортується в ядро) і є активним компонентом транскрипційного комплексу Notch 1 ICD/ CSL. HIF-1 $\alpha$  стабілізує Notch 1 ICD і підвищує транскрипційну активність комплексу, залучаючи коактиватори CBP/p300 [132].

Варто зауважити, що в деяких випадках при наявності морфологічних ознак диференціації факт диференціювання не був підтверджений молекулярними маркерами. Fink і співавт. при вивченні адипогенного фенотипу МСК людини в умовах низького вмісту кисню (1-2% кисню) встановили, що, незважаючи на накопичення ліпідів у внутрішньоклітинному просторі, процеси, що свідчать про набуття клітинами адипогенного фенотипу, не супроводжувалися підвищенням транскрипції специфічних для адипоцитів факторів, таких як ADD1/SREBP1, PPAR- $\gamma$ 2, аP2. Автори також зауважують, що при певних гіпоксичних умовах МСК здатні набувати адипоцито-подібної морфології за відсутності справжньої адипогенної диференціації [129].

Існують данні про можливу диференціацію МСК в ендотеліальному напрямку. Показано, що в умовах помірної гіпоксії МСК-КМ можуть формувати капілярподібні структури [121]. Згідно інших досліджень, гіпоксія підвищує експресію судинного ендотеліального фактора росту (VEGF) [133,134].

Таким чином, умови помірної гіпоксії можуть змінювати характер процесів диференціації в культурах МСК. Вплив умов фізіологічних концентрацій кисню на морфологію культур при цьому залишається практично недослідженим.

**1.4.3. Вплив умов помірної гіпоксії на здатність до міграції та особливості експресії молекулярних факторів.** Мішенями фактора HIF-1 є більш ніж 200 генів, що не тільки відповідають за здатність клітини до перенесення гіпоксичних умов, а й регулюють відновлення кисневого гомеостазу на рівні тканини. HIF-1 було відкрито як транскрипційний фактор гена еритропоетину. Можливо, саме тому численні дослідження показали підвищену в гіпоксичних умовах здатність МСК до продукції VEGF [133]. Крім нього, підвищується експресія інших ростових факторів, як, наприклад, FGF-2, SDF-1, IGF-1, HGF[135]. Показано підвищену продукцію

рецепторів ростових факторів, наприклад, епідермального фактору росту в умовах помірної гіпоксії [136].

Варто окремо зауважити, що умови фізіологічних концентрацій кисню підвищують рівень експресії генів білків клітинної поверхні, що пов'язані з міграційними властивостями клітин. Серед них - конексини та рецептори хемокінів. Показано, що гіпоксичні умови підвищують рівень експресії CXCR4 та CXCR7 - рецепторів SDF-1, хемокіну, що приймає участь у процесі хомінгу МСК [137]. За умов знижених концентрацій кисню МСК-КМ виявляли підвищену здатність до міграції в скретч-тесті [138]. Припускають, що міграція стовбурових елементів організму може залежати від градієнтів концентрації кисню, через вплив HIF-1 [139].

Отже, можна припустити, що культивування МСК за умов помірної гіпоксії може посилити їх синтез ростових факторів та покращити міграційну здатність при веденні в організм, що є важливим для підвищення ефективності клітинної терапії.

### **1.5. Біологічні ефекти інертних газів**

Інертні гази - гелій, неон, аргон, криптон, ксенон - є моноатомними газами з низькою хімічною реактивністю [140]. Їх біологічні ефекти вперше показано в 30х роках 20 сторіччя. Виявилось, що азот, як основний компонент дихальної суміші для глибоководного занурення, має наркотичний ефект, що проявляється при зануренні на значні глибини (починаючи з 30 метрів). Behnke and Yarbrough в 1938 показали, що дихальна суміш, що містить гелій замість азоту, подібних ефектів не викликає. Пізніше було виявлено, що більш "важкі" інертні гази, а саме аргон, криптон та ксенон мають анестетичну дію при нормальному тиску [141].

На сьогоднішній день, найбільш вивченим з інертних газів є ксенон.

Показано його анестетичні та органопротекторні властивості [24]. Хоча про анестетичну дію ксенону відомо ще з 50х років 20 сторіччя, молекулярні механізми його дії були виявлені лише нещодавно. Вважають, що основною його мішенню є *N*-methyl-d-aspartate (NMDA) - рецептор. Встановлено, що ксенон конкурує за місце зв'язування ко-агоністу, гліцину, у NMDA-рецепторі, таким чином, діючи, як інгібітор. Надмірна активація рецепторів глутамату спричиняє надмірне поступання іонів кальцію і запускає ряд каскадів, що можуть призвести до загибелі нейрона. Подібний процес супроводжує численні патологічні стани, наприклад, інсульт та травматичне пошкодження мозку. Тому, інгібіторний вплив ксенону на NMDA-рецептор пояснює його анестетичні ефекти, та дозволяє припустити його нейропротекторні властивості. Це було підтверджено у дослідженнях на тваринних моделях *in vitro* та *in vivo*. Однак, при клінічних дослідженнях дії ксенону було отримано дещо суперечливі дані [141].

Іншим перспективним для використання інертним газом видається аргон, оскільки, при нормальному тиску він не має наркотичного ефекту [142]. Нечисленні дані про ефективність аргону при травматичних ураженнях та механізми його дії мають відривчастий та несистематизований характер [143].

В роботі Loetscher et al. було показано значний цитопротекторний ефект аргону, на моделі травматичного ураження та глюкозної депривації органотипової культури зрізу гіпокампа. Після ураження зрізи було оброблено газовими сумішами, що містили атмосферну концентрацію кисню, і 25%, 50% та 74% аргону. Виявлено зменшення рівня загибелі клітин для уражень обох типів. Найбільш ефективною при глюкозно-кисневій депривації виявилась концентрація 74%, втім, 25% також суттєво зменшувала рівень ушкоджень. Для травми, найбільш ефективною була концентрація 50%. Що цікаво, суміші, що містили аргон, виявляли цитопротективний вплив, навіть при застосуванні їх через дві-три години після ураження [24].

Цитопротекторні ефекти аргону також виявлено на моделі гіпоксичного та ішемічного ураження культур фетальних нейронів миші, тоді як аналогічні концентрації криптону та неону такого ефекту не виявляли [144]. На органотиповій культурі гіпокампу щура *in vitro* показано протекторний вплив аргону при пошкодженні, спричиненому гіпоксією, дією цисплатину та гентаміцину [145].

Першим поясненням нейропротективного ефекту аргону було припущення про активацію нейротрансмісії шляхом залучення GABA - рецепторів [146]. З часом, Fahlenkamp та колегами було показано активацію кінази ERK 1/2 на первинних культурах нейронів, астроглії, та мікрогліальної лінії BV-2, при дії газової суміші, що містила 50% аргону [147]. Подібні данні також були отримані Ulbrich та колегами. На моделі ішемії/реперфузії сітківки щурів, їм вдалось встановити, що інгаляція аргону по-різному стимулює кінази, асоційовані зі стресом, суттєво збільшуючи експресію і фосфорилування ERK-1/2 і фосфорилування p38. Також, показано ERK-1/2-залежне зменшення рівня HSP 70, HSP 90 та HO-1 (гемоксигенази), що запобігає стресу для клітин у фазу реперфузії [148].

Існують дані про залучення інших сигнальних шляхів при дії аргону на клітини. Zhao та колеги показали, що при культивуванні у газовій суміші, що містить 75 % аргону, в первинних культурах нейронів щурів зростає експресія PI3K, Erk1/2 and p-mTOR, як в інтактних клітинах, так і в тих, що знаходились в умовах киснево-глюкозної депривації. Виявлено підвищення експресії та транслокації транскрипційного фактору NF-E2-related factor 2 (Nrf2) в ядро, який вважають ключовим цитопротекторним фактором, що підвищує експресію багатьох антиоксидантних ензимів при оксидативному стресі. Це свідчить про активацію антиоксидантної системи клітин. Також встановлено, що при ішемії/реперфузії у корі головного мозку щурів, при інгаляції газової суміші, що містила 70% аргону, зростає рівень експресії антиоксидантних ензимів NAD(P)H dehydrogenase (quinone 1) (NQO1) і супероксиддисмутази 1(SOD1) [150].



Втім більшість робіт, присвячених біологічним ефектам аргону, проводиться на клітинах нейрального походження. Спираючись на відомі дані, можна зробити висновок, що актуальним питанням є дослідження впливу аргону на клітини, що походять з інших тканин, та можливості його застосування для оптимізації культивування широкого спектру клітинних культур.

Тож метою даної дисертаційної роботи була оптимізація культивування МСК Вартонового студню людини при фізіологічних концентраціях кисню в газових сумішах, створених на основі азоту, а також перевірка ефективності застосування інертного газу аргону як основи для суміші зі знизеним вмістом кисню. Основними завданнями досліджень були також перевірка ефективності застосування умов помірної гіпоксії як методу оптимізації отримання первинної культури МСК-ВС, та порівняльна оцінка їх впливу на процес проліферації, морфології культур, і деяких інших аспектів життєдіяльності клітин.

## РОЗДІЛ 2.

### МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

#### 2.1. Опис біологічних, хімічних агентів та обладнання що використовувались у роботі

**2.1.1. Біологічні матеріали.** В роботі використовували ембріональну телячу сироватку (ЕТС) (РАА, Австрія, та HyClone), первинні антитіла проти білків CD90, CD73, CD105 (UsBiological, США) та CD 34 та 45 (UsBiological, США), ліофілізований порошок трипсину (ПанЕко, РФ), FGF2 (ліофілізований порошок, препарат «Рефіброл» ("Інтерфармбіотек", Україна), гепарин ("Фармекс", Україна).

**2.1.2. Хімічні агенти.** В роботі використовували наступні хімічні агенти: мінімальне середовище Ігла в альфа-модифікації (РАА, Австрія; Sigma,; BioWest), L-глутамін порошок сухий (Sigma-Aldrich, США), PBS, 10x розчин (BioWest), ЕДТА (порошок та 0,02% розчин), гематоксилін (квасцовий гематоксилін за Бемером ) (Sigma-Aldrich), гематоксилін Караччі (Sigma-Aldrich), еозин (водний розчин, 1%) (Sigma-Aldrich), фуксин основний (спиртовий розчин, 0,4%), альціановий синій (1% в glacial acid solution)(Sigma-Aldrich), алізариновий червоний С (Sigma-Aldrich), Oil Red O (Sigma-Aldrich), StemPro (R) differentiation kits (Gibco), 3-4,5-диметилтіазол-2,5-діфенілтетразоліум бромід (МТТ-реагент ), ДМСО (диметилсульфоксид ) (США), розчин формаліну 10% (4% розчину формальдегіду) (RAL Diagnostics, Франція), бензилпеніцилін (порошок для приготування розчину для інекцій, 500 000 ОД або 1 000 000 ОД) (Артеріум, Україна), стрептоміцин (порошок для приготування розчину для ін'єкцій, у перерахуванні на

стрептоміцин 0,5 або 1 г) ("Артеріум", Україна), трипановий синій (водний розчин 0,4%), метиленовий синій (водно-спиртовий розчин, 0,1 %) (ВАТ "Монфарм", Україна), етанол (70% та 96%), ксилол, парафін, Crystal mount (Sigma-Aldrich, США), середовище LB (Sigma-Aldrich), TE (буфер), SDS (1% розчин), NaOH, ацетат натрію, ізопропанол, ПЕІ розгалужений (25 кДА, Sigma-Aldrich, США), TurboFect (ThermoFisher Scientific).

**2.1.3. Обладнання.** Було використано наступне обладнання: мікроскоп Leica DM IL (Leica, Федеративна Республіка Німеччина), камера (Cannon PowerShot 640A), центрифуга (Liston C 2204 Classic, Російська Федерація), міні-центрифуга, CO<sub>2</sub>-інкубатор New Brunswick Galaxy 170s (Eppendorf, Федеративна Республіка Німеччина), мікро-фотоколориметр (Epsilon Research Limited MCC/340), автоматичні піпетки (2-20, 20-200 та 100-1000 мкл) (Eppendorf), ваги (OHAUS Adventurer), одноразові мікроцентрифужні пробірки об'ємом 2 і 1,5 мл (Eppendorf), пробірки центрифужні 15 та 50 мл (Bioswisstec, Швейцарія), одноразові наконечники для автоматичних піпеток (TRP), пластикові планшети на 12 та 96 лунок (Cellstar), пластикові флакони на 25 і 75 см<sup>2</sup> (Sarstedt, Федеративна Республіка Німеччина; TRP, Швейцарія; SPL, Республіка Корея), пластикові чашки Петрі, d=35 мм (TRP, Швейцарія), Cellstar, 50 мм (Cellstar), пластикові піпетки 10 мл (LP Italiana, Італія), пластикові піпетки 5 та 2 мл (Jet Biofil, Китайська Народна Республіка), скляні чашки Петрі (d=35 мм, 10 см) (Anumbra), ножиці хірургічні тупокінцеві, пінцет анатомічний, пінцет хірургічний, гемоцитометр (камера Горяєва), газовий аналізатор ПГА-200 (АТ "НВО Електронстандарт", Російська Федерація), вакуумні контейнери (Scarlet), пакети герметичні із застібкою (ТОВ "ТЕСС", Україна), вуглекислий газ у балоні (ПАТ "Лінде газ Україна", Україна), азот очищений у балоні (ПАТ "Лінде газ Україна", Україна), аргон у балоні (ПАТ "Лінде газ Україна", Україна), проточний цитофлюориметр BD FACsAria (BD Biosciences, США).

Також, було використано програмне забезпечення Image J, Microsoft Excel та “BD FACSDiva” у відділі клітинних та тканинних технологій Інституту генетичної та регенеративної медицини НАМН України.

## **2.2. Отримання та характеристика первинної культури МСК-ВС**

**2.2.1. Отримання первинної культури МСК-ВС.** Первинні культури МСК-ВС отримували з Вартонового студню (ВС) пупкового канатика людини методом експлантів.

Пупкові канатики (ПК) були отримані при нормальних пологах від клінічно здорових жінок з фізіологічним перебігом вагітності, на 39-40 тижні гестації, в пологовому будинку №5, м.Київ, з добровільної (інформованої) згоди пацієнток.

Фрагмент ПК (5-10 см) відмивали PBS, після чого механічно видаляли судини. ВС розділяли на фрагменти розміром приблизно 5x5 мм, переносили в культуральний флакон, 75 см<sup>2</sup> (РАА, Австрія), з поживним середовищем DMEM с низьким вмістом глюкози (РАА, Австрія), із додаванням бензилпеніциліна (2 ед/мл (ВАТ "Артеріум", Україна)), стрептоміцина (2 мкг/мл (ВАТ "Артеріум", Україна)), 2 mM L-глутаміна (Sigma-Aldrich, США), FGF2 (0,005 мкг на 100 мл середовища) «Рефіброл», (Інтерфармбіотек, Україна), та 10 % ембріональної телячої сироватки (РАА, Австрія). Перші мігруючі клітини із експланта спостерігали вже на 5-7 день, через 14 днів культивування отримували кількість клітин, достатню для пасування.

**2.2.2. Характеристика поверхневих маркерних білків.** Після першого пасування культури за допомогою забарвлення антитілами з флуоресцентними мітками (UsBiological, США) та проточного

цитофлюориметра “BD FACSAria” аналізували рівні експресії поверхневих маркерних білків CD90, CD73, CD105, CD34 та CD45. Суспензію клітин перносили у мікропробірку у крижаний PBS ( $2 \times 10^5$  клітин в 0,5 мл) з додаванням 1% натрію азиду. Додавали 0,1–10 мкг/мл первинних мічених антитіл, розчинених у 3% BSA/PBS та інкубували протягом 30 хв при кімнатній температурі, після чого клітини тричі відмивали PBS, центрифугували при 400 g протягом 5 хв та ресуспендували у 500 мкл крижаного PBS і аналізували у проточному цитометрі.

Кількісний аналіз даних проводили із застосуванням програмного забезпечення “BD FACSDiva”. Цю серію досліджень проводили у відділі клітинних та тканинних технологій Інституту генетичної та регенеративної медицини НАМН України.

**2.2.3. Аналіз здатності до диференціації.** Після першого пасування культури проводили аналіз диференціального потенціалу отриманих клітин, а саме, досліджували їхню диференціацію у остеогенному, адипогенному та хондрогенному напрямку. Для індукції диференціації клітин застосовували комерційне середовище StemPro (R) differentiation kits (Gibco). Для оцінки ефективності диференціювання хондрогенною лінією використовували забарвлення альціановим синім (1% в glacial acid solution) (Sigma-Aldrich). Для оцінки остеогенної диференціації, клітини були забарвлені Alizarin red S (Sigma-Aldrich), що специфічно забарвлює позаклітинний кальцій у жовно – червоний колір. Для оцінки адипогенної диференціації, культури були забарвлені Oil Red O (Sigma-Aldrich) котрий реагує із нейтральними жирами, та забарвлює їх у червоний колір.

**2.2.4. Оцінка метаболічної активності культури МСК-ВС.** У чашку Петрі (d=35mm) з клонами первинної культури МСК у середовище об’ємом 2,5 мл додавали 375 мкл розчину МТТ (концентрація 5 мг/мл) і інкубували 4 години. Після чого середовище аспірували, додавали 1 мл ДМСО до

розчинення кристалів. ДМСО з розчиненими кристалами переносили в 96-лунковий планшет, по 100 мкл в лунку. За допомогою аналізатора Epsilon Research Limited MCC/ 340 визначали оптичну густину, при довжині хвилі 540 нм, використовуючи ДМСО у якості контролю.

**2.2.5. Морфологічний аналіз колоній (клонів) в первинній культурі МСК-ВС.** Чашки Петрі (d=35mm) з клонами первинної культури МСК відмивали 3 рази PBS (за кімнатної температури), фіксували за допомогою 4% розчину формальдегіду (10 хв). Після чого клітини забарвлювали 0,1% розчином метиленового синього, та підраховували кількість та розмір колоній.

### **2.3. Гістологічне дослідження тканини ВС**

Гістологічні дослідження провели на кафедрі цитології, гістології та біології розвитку (Навчально-науковий центр "Інститут біології та медицини" Київського національного університету імені Тараса Шевченка), за стандартними гістологічними методиками.

Для перевірки наявності і розташування клітин у тканині ВС після інкубування (в культуральних умовах), фрагменти ВС (на 30 й день інкубування в культуральних умовах ) відмивали у холодному PBS, і фіксували у 4% розчині параформальдегіду (впродовж 1 доби). Після фіксації, фрагменти проводили через серію спиртів:

70% етанол (24 год.)

80% етанол (24 год.)

90% етанол (24 год.)

96% етанол (24 год.)

етанол ксилол ( 2 год)

ксилол (2 год.)

парафін (2 год. при 56 С).

Після чого готували парафінові блоки згідно стандартної процедури. Отримані зразки, залиті в парафін, нарізали на ротаційному мікротомі, в результаті чого були отримані зрізи товщиною 7 мкм.

Зрізи депарафінізували за наступною схемою;

ксилол (10 хв.)

96% етанол (2 по 1 хв.)

80% етанол (1 хв.)

70% етанол ( 1 хв.)

дистильована вода ( 2 по 30 с.)

Після промивки зрізів водою проводили забарвлення гематоксиліном Бемера та еозином [150], за наступною схемою:

гематоксилін – 1 хв.

- проточна вода – 1 хв.

- еозин – 15 с.

- дистильована вода - 30 с

Депарафінізовані зрізи заключали у середовища для покриття (Crystal mount) та покривали покривними скельцями.

#### **2.4. Створення газових сумішей із заданими характеристиками та культивування МСК-ВС в умовах помірної гіпоксії**

За період досліджень було перевірено 2 принципи створення газових сумішей, кожен з яких було покладено в основу відповідної схеми.

Схема 1) Компоненти: 1) балон з основним наповнюючим газом (азот, або аргон), 2) балон з вуглекислим газом, 3) змішувач (ємність для змішування з ротаметрами для індикації подачі газу), 4) насос для подачі

атмосферного повітря, 5) пакет (герметичний, із застібкою), 6) контейнер контрольний для вимірювання вмісту газів у суміші, 7) газовий аналізатор ПГА-2000.

Схема 2) Компоненти: 1) балон з основним наповнюючим газом (азот, або аргон), 2) балон з вуглекислим газом, 3) змішувач (ємність для змішування з ротаметрами для індикації подачі газу), 4) пакет (герметичний, із застібкою), 5) контейнер контрольний для вимірювання вмісту газів у суміші, 6) газовий аналізатор ПГА-2000.

Культуральний посуд з клітинами поміщали в поліетиленові пакети з герметичною застібкою ZipLock (ТОВ "ТЕСС", Україна). За схемою 1, за допомогою розробленого приладу пакети "промивали" 3 рази газовою сумішшю, що містить 4%  $\text{CO}_2$  і 96% азоту або аргону (залежно від варіанту), і яка не містить кисню, і потім нагнітали газову суміш, необхідну для культивування. Пакети з культуральними посудинами поміщали в вакуумні контейнери (Scarlet).

Згідно схеми 2, в пакет із експериментально встановленим залишковим обсягом атмосферного повітря нагнітали безкисневу суміш, і, контролюючи швидкість подачі суміші, досягали необхідної концентрації  $\text{O}_2$  та  $\text{CO}_2$  в пакеті, постійно вимірюючи концентрацію газів в невеликому контрольному контейнері. У дослідах було використано пакети та контейнери розміром 1 л, 1,5 л та 2 л (залежно від досліду). Середовища для культивування перед використанням витримували в газовій суміші, що містила задану концентрацію кисню. Середовище об'ємом 5 мл витримували у культуральних флаконах площею 25  $\text{cm}^2$ , об'ємом 15 мл - 2 флаконах площею 75  $\text{cm}^2$  або чашках Петрі (діаметром 10 см) впродовж не менше як 1 години, періодично злегка збовтуючи.

**2.4.1. Дослідження проліферативних характеристик МСК-ВС за умов помірної гіпоксії.** Культури у всіх дослідах були поділені на 3 групи. Експериментальні групи МСК культивували в газових сумішах на основі



азоту (кисень - 3%, вуглекислий газ - 4%, азот - 93%) і аргону (кисень - 3%, вуглекислий газ - 4%, аргон - 93%). Контрольну групу клітин культивували в стандартних умовах CO<sub>2</sub> - інкубатора (атмосферна концентрація кисню, ≈20%, вуглекислий газ - 4%).

На кожному пасажі (починаючи з першого) МСК висівали в кількості  $75 \times 10^3$  на флакон, і культивували протягом 7 днів, після чого пасували за допомогою розчину ЕДТА (0,02%) і трипсину (0,1%) і підраховували в камері Горяєва. Для наступного пасажу процедуру повторювали.

Подвоєння популяції оцінювали за формулою:  $PD = \log(N_f / N_i) / \log 2$ , де  $N_f$  = кінцева кількість клітин;  $N_i$  = початкова кількість клітин [84].

## **2.5. Отримання субпопуляцій МСК шляхом збереження клітин, що спонтанно відкріпились**

Кондиціоноване середовище обсягом 6 мл з культур на 0-2 пасажах неіморталізованих ліній, пасованих за допомогою трипсину та ЕДТА, відбирали, центрифугували 10 хв при 1000 об/хв. Отриманий осад переносили у культуральні флакони площею 25 см<sup>2</sup>, додавали 6 мл ростового середовища. Після досягнення отриманими клонами розмірів, достатніх для пасування (до 14 днів культивування), культури пасували за стандартною методикою та проводили аналіз проліферації, як зазначено вище.

## **2.6. Аналіз морфології культур МСК-ВС**

Для аналізу морфології клітин, починаючи з 1-го пасажу (1-3 пасаж), МСК були посіяні на пластикові чашки Петрі, діаметром 35 мм (CELLSTAR)

у кількості  $5 \times 10^4$  на чашку, і культивовані протягом 3х днів у газових сумішах на основі азоту (кисень - 3%, вуглекислий газ - 4%, азот - 93%) і аргону (кисень - 3%, вуглекислий газ - 4%, аргон - 93%). Контрольну групу культивували в стандартних умовах CO<sub>2</sub>-інкубатора (атмосферна концентрація кисню,  $\approx 20\%$ , вуглекислий газ - 4%).

**2.6.1. Фіксація та забарвлення культур МСК-ВС (виготовлення препаратів МСК-ВС).** Для аналізу морфології культур МСК чашки Петрі (35 мм) із культурою МСК промивали PBS (кімнатної температури) і фіксували в парах формаліну впродовж 7 хв, після чого проводили забарвлення гематоксиліном та еозином за наступною схемою:

- гематоксилін Караччі – 1 хв.
- проточна вода – 1 хв.
- еозин (водний розчин) – 15 с.
- дистильована вода – 15 с.

Мікроскопічний аналіз препаратів проводили за допомогою інвертованого мікроскопа Leica DMIL. Мікрофотографії культур були зроблені за допомогою камери Cannon PowerShot 640A, x100, збільшення камери x1,4.

**2.6.2. Морфометричний аналіз препаратів культур МСК-ВС.** Морфометричний аналіз клітин проводили за допомогою програми Image J. На фотографіях мікропрепаратів вимірювали загальну площу клітини, площу ядра. Також, вимірювали довжину та ширину клітини. Довжину клітини вимірювали як довжину лінії, проведеної через три точки: крайні точки на "полюсах" та центр умовного кола, що вписувався в середину клітини, в районі ядра. Ширину клітини вимірювали як діаметр кола, "вписаного" в район знаходження ядра клітини (рис 2.1). Усі виміри було проведено в пікселях. Усього в одному варіанті було виміряно 100 клітин (30 клітин на 3

фотографіях). З отриманих даних розраховували ядерно-цитоплазматичне співвідношення (ЯЦС), як відношення площі ядра до площі клітини. З метою характеристики ступеня наближеності форми клітини до класичної веретеноподібної, також було визначали коефіцієнт «ширина / довжина», який розраховували як відношення ширини клітини до її довжини.

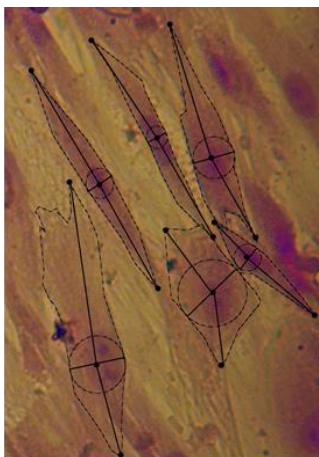


Рис. 2.1. Схема вимірювань морфометричних показників МСК-ВС для подальшого аналізу. Пунктирною лінією позначено межі клітини та межі умовної найширшої ділянки, що містить ядро. Прямими лініями позначено відрізки, за допомогою яких вимірювали: 1 — довжину клітини, 2 — ширину клітини.

**2.6.3. Оцінка активності бета-галактозидази, асоційованої зі старінням.** Оцінку активності бета-галактозидази, асоційованої зі старінням, виконували за допомогою Senescence Cells Histochemical Staining Kit (Sigma-Aldrich). Культури МСК-ВС було вирощено у 24 лунковому планшеті. Після 7 днів культивування, ростове середовище забирали, лунки промивали PBS. Додавали по 0,5 фіксуєчого буфера і інкубували при кімнатній температурі 7хв, після чого тричі промивали PBS, додавали фарбуючий розчин, і інкубували при 37С в термостаті. Після чого було зроблено мікрофотографії культур та підраховано кількість забарвлених клітин.

## 2.7. Трансфекція МСК-ВС

**2.7.1. Виділення ДНК лужною методикою.** В роботі було використано метод, модифікований за Sambrook et al [151]. Для отримання плазмідної ДНК було вирощено 50 мл культури, на середовищі LB. Після досягнення конфлюентності, культуру бактеріальних клітин осаджували центрифугуванням протягом 5 хв при швидкості 5000 об/хв. Отриманий осад ресуспендували в 5 мл TE (рН 7,5) буферу та перемішано. До отриманої суспензії додавали 5 мл розчину (SDS - 1%, NaOH - 0,2 М), та перемішували. Суміш інкубували при кімнатній температурі 15 хв, після чого додавали 5 мл 2М ацетату натрію (або ацетату калію) рН 5 (температура розчину 40С). Отриману суміш інкубували на льоду протягом 15 хв та осаджували центрифугуванням при 5000 об/хв 20 хв при кімнатній температурі. Супернатант переносили в нову пробірку, і додавали 0,7 об'єму ізопропанолу, після чого суміш перемішували і центрифугували 20 хв при 5000 об/хв. Супернатант виливали, отриману ДНК відмивали охолодженим 70% етанолом. Отриманий розчин центрифугували при 5000 об/хв, спирт зливали, осад висушували.

**2.7.2. Приготування препарату для трансфекції.** Як трансфікуючі реагенти було використано розгалужений поліетиленімін (ПЕІ, 25кДа) и комерційний препарат TurboFect (Thermo Fisher Scientific). Для трансфекції було використано нанорозмірні поліплекси (0.4 нм), що містили плазмідну ДНК pEGFP-C1 (Clontech, США), що кодує маркерний ген зеленого флюоресцентного білка (enhanced green fluorescent protein - EGFP). Для трансфекції використовували суміш, яка містила поліплекси ДНК/ПЕІ у ваговому співвідношенні 1:2, тобто 3 мкг та 6 мкг відповідно. Суміш готували *ex tempore* зі стокових розчинів. Стоковий розчин ПЕІ (1 мг/мл) готували на стерильній деіонізованій воді. Стоковий розчин плазмідної ДНК

готували в середовищі aMEM, без додавання антибіотиків. До стокового розчину плазмідної ДНК, додавали розчин PEI, пермішуючи та інкубували 7 хв. при кімнатній температурі [152].

Поліплекси, що містили TurboFect, готували відповідно до інструкцій фірми-виробника.

**2.7.3. Трансфекція МСК-ВС при фізіологічних концентраціях кисню.** Для трансфекції культури МСК були посіяні на пластикові чашки Петрі,  $d = 35$  мм (TPP, Швейцарія) в кількості  $9 \times 10^4$  клітин на чашку і культивовані протягом 48 годин в різних газових сумішах. Контрольні групи культивували в стандартних умовах CO<sub>2</sub>-інкубатора. Перед початком трансфекції чашки Петрі з культурою двічі промивали PBS, після чого наносили приготовану як зазначено в п. 2.7.3. трансфікуючу суміш в об'ємі 1 мл, по краплях. Культуру МСК-ВС витримували разом із трансфікуючою сумішшю в умовах CO<sub>2</sub>-інкубатора 1 годину. Після чого чашки Петрі з культурою МСК-ВС промивали PBS і наносили 2 мл ростового середовища (описаного вище). Ефективність трансфекції оцінювали за допомогою аналізу флюоресценції EGFP в трансфікованих клітинах через 48 годин на проточному цитофлюориметрі BD FACSAria (США).

## **2.8. Статистична обробка даних**

Дані експериментів подано у вигляді середнього арифметичного  $\pm$  стандартне відхилення, якщо не вказане інше. Кількість повторів незалежних експериментів вказана в тексті та під рисунками.

Для аналізу статистичної достовірності відмінності у кількості клітин між різними експериментальними групами в аналізах зростання культури використовували критерій Манна - Уїтні (при  $p < 0,05$ ). Для аналізу

морфометрії розраховували дисперсію та коефіцієнт варіації. Достовірність різниці по цих показниках визначали за допомогою критерію Манна - Уїтні (при  $p < 0,05$ ). Статистичний аналіз даних виконували за стандартними формулами та за допомогою програми Microsoft Excel.

## РОЗДІЛ 3

### РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ

#### 3.1. Розробка системи створення газових сумішей

У публікаціях, присвячених культивуванню МСК з різних джерел, в умовах помірної гіпоксії, зазвичай, не наводять детальний опис методики створення газової суміші для культивування [23], якщо дослідниками використовувалось неспеціальне обладнання (як, наприклад, CO<sub>2</sub> інкубатори, що мають функцію підтримання гіпоксичних умов) [20,111]. Тож для дослідження впливу умов помірної гіпоксії на життєдіяльність МСК-ВС в культурі виникла потреба розробки власних систем створення газових сумішей із заданим вмістом кисню, які були б доступними для збірки в лабораторних умовах, простими для налаштування і використання, і давали змогу створювати газові суміші не лише на основі азоту, а також інертних газів. Окремим завданням була розробка оптимального контейнеру для довгочасного культивування клітин у газових сумішах, який був би герметичним, доступним для розміщення у стандартних CO<sub>2</sub>-інкубаторах або термостатах, і водночас забезпечував нормальний газообмін між рідкою та газоподібною фазами в середині та забезпечував потрібну вологість. Даний розділ дисертації присвячено розробці системи створення газових сумішей для культивування клітин *in vitro*.

**3.1.1. Схема приладу для створення газових сумішей.** Співробітником ІМБіГу НАНУ Сорокою М.П. та автором дисертації за період досліджень було розроблено і перевірено два принципи створення газових сумішей. У результаті було створено та перевірено два варіанти системи створення умов

помірної гіпоксії, які використовували суміші не тільки на основі азоту, але і аргону (рис.3.1).

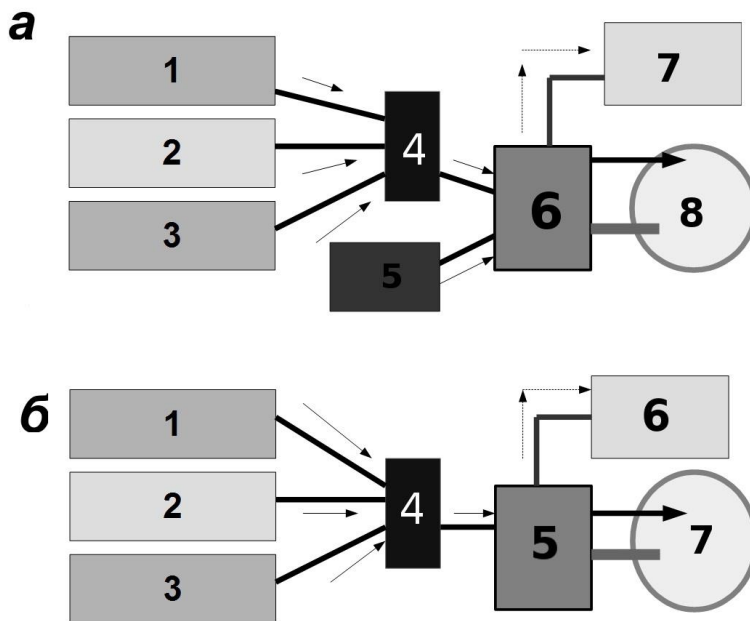


Рис 3.1. Системи створення газових сумішей зі зниженим вмістом кисню. Стрілками вказаний напрямок подачі газів: *а* - схема №1: 1- балон з азотом, 2- балон з вуглекислим газом, 3- балон з аргоном, 4- ємність з ротаметрами для індикації подачі газу і клапан-перемикач для вуглекислого газу, 5- насос для подачі атмосферного повітря, 6- контрольний контейнер для вимірювання концентрації кисню та  $\text{CO}_2$ , 7 - газовий аналізатор ПГА-200, 8- герметичний пакет із застібкою ZipLock; *б* - схема №2: 1- балон з азотом, 2- балон з вуглекислим газом, 3- балон з аргоном, 4- ємність з ротаметрами для індикації подачі газу і клапан-перемикач для вуглекислого газу, 5- контрольний контейнер для вимірювання концентрації кисню та  $\text{CO}_2$ , 6 - газовий аналізатор ПГА-200, 8- герметичний пакет із застібкою ZipLock

Кожна із згаданих схем складалась з двох "блоків": системи створення газової суміші, та контейнеру для культурального посуду. Джерелом кисню в обох системах було атмосферне повітря. Слід зазначити, оскільки системи не потребували балонів кисню (зберігання яких потребує особливої уваги),



використання їх в лабораторних умовах не потребувало особливих заходів безпеки.

Система №1, для створення газової суміші з потрібною концентрацією кисню, мала насос, який подавав атмосферне повітря у контейнер для створення газової суміші потрібного складу. Стосовно системи №2, газову суміш потрібної концентрації створювали шляхом повільної подачі азоту (або аргону) та вуглекислого газу у пакет з культуральним посудом, у якому було залишено невеликий об'єм атмосферного повітря, спостерігаючи за показниками на аналізаторі, приєднаному до "контрольного" контейнера.

Способи наповнення контейнерів для культивування також дещо відрізнялися. У обох випадках, культуральний посуд з клітинами поміщали в поліетиленові пакети з герметичною застібкою ZipLock (ТОВ "ТЕСС", Україна). За схемою №1, пакети "промивали" 3 рази безкисневою газовою сумішшю, що містить 4% CO<sub>2</sub> і 96% азоту або аргону (залежно від варіанту), після чого вмикали насос для атмосферного повітря, і спостерігаючи за показниками на газовому аналізаторі нагнітали газову суміш, необхідну для культивування, одночасно "виганяючи" безкисневу суміш з отвору у застібці. За схемою №2, в пакет із експериментально встановленим залишковим обсягом атмосферного повітря нагнітали згадану безкисневу суміш, і, контролюючи швидкість подачі суміші, досягали необхідної концентрації в пакеті.

Схема №2 складалась з меншої кількості компонентів: насос для повітря не використовувався. Хоча використання цієї системи, як виявилось, потребувало більш точних навичок виконавця, проте, вона потребувала менше часу для створення системи культивування. Тому початкові досліди були виконані із застосуванням схеми №1, а досліди, описані в даній дисертації, виконані із застосуванням схеми №2. Остаточний варіант системи наведено на рис 3.2.

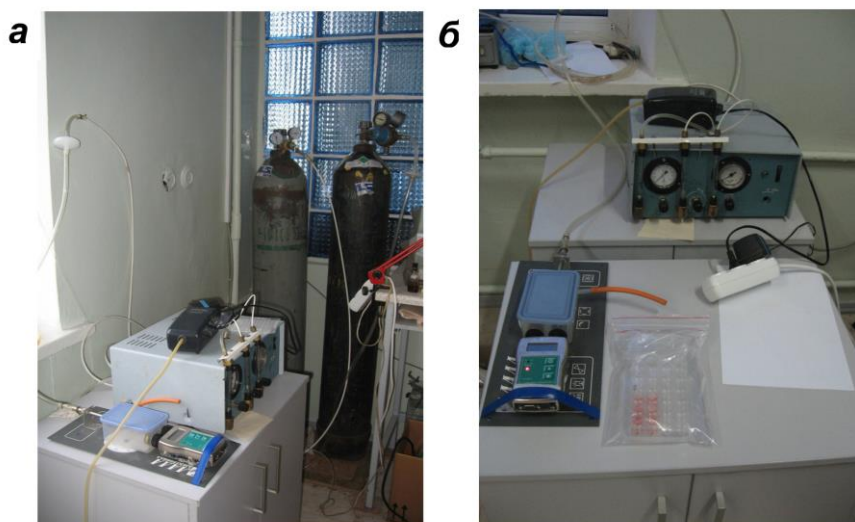


Рис 3.2. Загальний вигляд системи для створення газових сумішей: *а* - газовий аналізатор та система змішування, за схемою №1; *б* - газовий аналізатор та система змішування за схемою №2

В ході виконання експериментів було також оптимізовано "конструкцію" контейнера для вміщення культурального посуду. Оптимальною виявилась двокомпонентна система: посуд з культурою вміщували в пакет з герметичною застібкою, який, після наповнення вміщували у вакуумний контейнер (рис 3.3.).



Рис. 3.3. Наповнення герметичних пакетів газовою сумішшю (за схемами 1 і 2)

Використання пакету для наповнення дозволяло контролювати об'єм газу, що надходить. Процес наповнення пакетів газовою сумішшю представлено на рис 3.3. Розмір пакету підбирали залежно від кількості і виду

культурального посуду, який мали розміщувати в ньому. Для підтримання необхідної вологості разом із посудом з культурами у пакеті тримали чашку Петрі з невеликим об'ємом стерильної дистильованої води.

У процесі відпрацювання методики роботи з розробленими системами вдалось встановити, що концентрація азоту (або аргону) та CO<sub>2</sub> у газовій фазі, у такій системі, зберігалась протягом трьох днів. Результати вимірювань на третій день після наповнення системи “контейнер+пакет” сумішами на основі азоту та аргону, кожна з яких мала 3% кисню та 4% CO<sub>2</sub> наведено в таблиці 3.1 (табл. 3.1).

*Таблиця 3.1.*

**Концентрація кисню та вуглекислого газу у системі “герметичний пакет+контейнер” на третій день після наповнення**

	3% кисню, азот, %	3% кисню, аргон, %
Культуральне середовище	O <sub>2</sub> — 3,1±0,1	O <sub>2</sub> — 3,23±0,01
	CO <sub>2</sub> — 4,13±0,06	CO <sub>2</sub> — 4,17±0,12
Культури клітин	O <sub>2</sub> — 3,13±0,15	O <sub>2</sub> — 3,13±0,15
	CO <sub>2</sub> — 4,23±0,15	CO <sub>2</sub> — 4,2±0,1

Результат не залежав від того, знаходився у контейнерах посуд з культурами клітин, або лише з культуральним середовищем (табл. 3.1). Для проведення дослідів, описаних у даній роботі, цього було достатньо, оскільки, за загальноприйнятим методом, протягом експериментів проводили зміну середовища через 3 дні культивування. Разом зі зміною культурального середовища, проводили зміну і газової суміші.

Відомо, що співвідношення «рідке середовище/газ» для нормального обміну кисню між газовою фазою та культуральним середовищем має бути не менше 1:10 [153]. У досліді було використано контейнери розміром 1л, 1,5 л та 2 л, залежно від досліді. Згідно з відомими з літератури теоретичними розрахунками, концентрація газів у гіпоксичній суміші і культуральному

середовищі, за умови "висоти" стовпчика середовища 1.72 мм, приблизно через годину досягає стану рівноваги, залежно від концентрації кисню [154]. Тому середовища для культивування перед використанням витримували не менше 1 години в газовій суміші в культуральних флаконах або чашках Петрі (діаметром 10 см). Хоча висота стовпчика середовища за таких об'ємів сягала приблизно 4 мм, культуральний посуд в пакеті обережно збовтували раз на 15 хв. Також, вимірювання температури поживного середовища, витриманого за таких умов, сягало в середньому 37° С і не відрізнялось від такого у стандартних умовах CO<sub>2</sub>-інкубатора.

Отримані таким чином контейнери можна було поміщати навіть в термостат при 37°С.

### **Висновки до підрозділу 3.1.**

Було розроблено та перевірено різні варіанти систем створення газових сумішей зі зниженим вмістом кисню, та вибрано оптимальний варіант для подальших досліджень. Показано можливість створення простих та ефективних систем з мінімальною кількістю компонентів.

### **Результати, викладені у підрозділі, частково опубліковано у працях**

1. **Shuvalova N.**, Kordium V. Comparison of proliferative activity of Wharton jelly mesenchymal stem cells in cultures under various gas conditions // Biopolym. Cell. - 2015. - Vol. 31, №3. - P. 233–239.

2. **Shuvalova N.**, Kordium V. Proliferation of Wharton jelly mesenchymal stem cells, derived by preserving the cells with reduced attachment rate, under various gas conditions // Biopolym. Cell. - 2015. -Vol. 31, №6. - P. 447 - 454. (особисто дисертантом проведено отримання, культивування та аналіз проліферації та морфлогії ліній МСК-ВС)

3. **Шувалова Н.С.**, Дерябіна О.Г. ,Жукова С.М., Сорока М.П. Культивування мезенхімальних стовбурових клітин пуповинного канатика

людини при знижених концентраціях кисню // Науково-практична конференція з міжнародною участю "Генетична і регенеративна медицина: проблеми та перспективи" Журнал академії медичних наук України, том 16, додаток, 2010 - с.191

### 3.2. Оптимізація методу отримання культури МСК-ВС

Відомо, що виділення первинних культур МСК-ВС методом експлантів має низку переваг порівняно із ферментативними методами, дозволяючи краще зберегти нативний терапевтичний потенціал клітин (наприклад, рівень секреції терапевтично значущого фактору bFGF та експресію маркерів стовбуровості) [155], проте потребує оптимізації, через незначну кількість клітин, яку можна отримати в такий спосіб. Даний розділ дисертації присвячено дослідженню можливості застосування умов помірної гіпоксії для оптимізації отримання та мультиплікації первинних культур МСК-ВС.

**3.2.1. Оптимізація введення МСК-ВС у культуру за стандартних умов.** Спираючись на відомі літературні дані, ми оптимізували процедуру отримання МСК-ВС за допомогою методу експлантів.

Відомо, що будова ВС у різних донорів може суттєво відрізнятись [156]. Протягом проведення дисертаційного дослідження (2010-2019 рр) було оброблено більше 150 пупкових канатиків, і виявлено, що серед них спостерігалась значна морфологічна гетерогенність. Встановлено, що отримані зразки значно варіюють за діаметром поперечного перерізу канатика (від 1 см до 2,3 см), щільністю та кольором студня (наприклад, напіврідкий гелеподібний, щільний, або гетерогенний, який містив ділянки різної щільності тощо), особливостями судин (діаметром, механічною міцністю при видаленні, наявністю внутрішніх ушкоджень і крововиливів у ВС) та наявністю нетипових елементів будови - наприклад, "петель", утворених судинами, ділянок з надлишковою кількістю гелеподібного студню тощо (рис. 3.4).

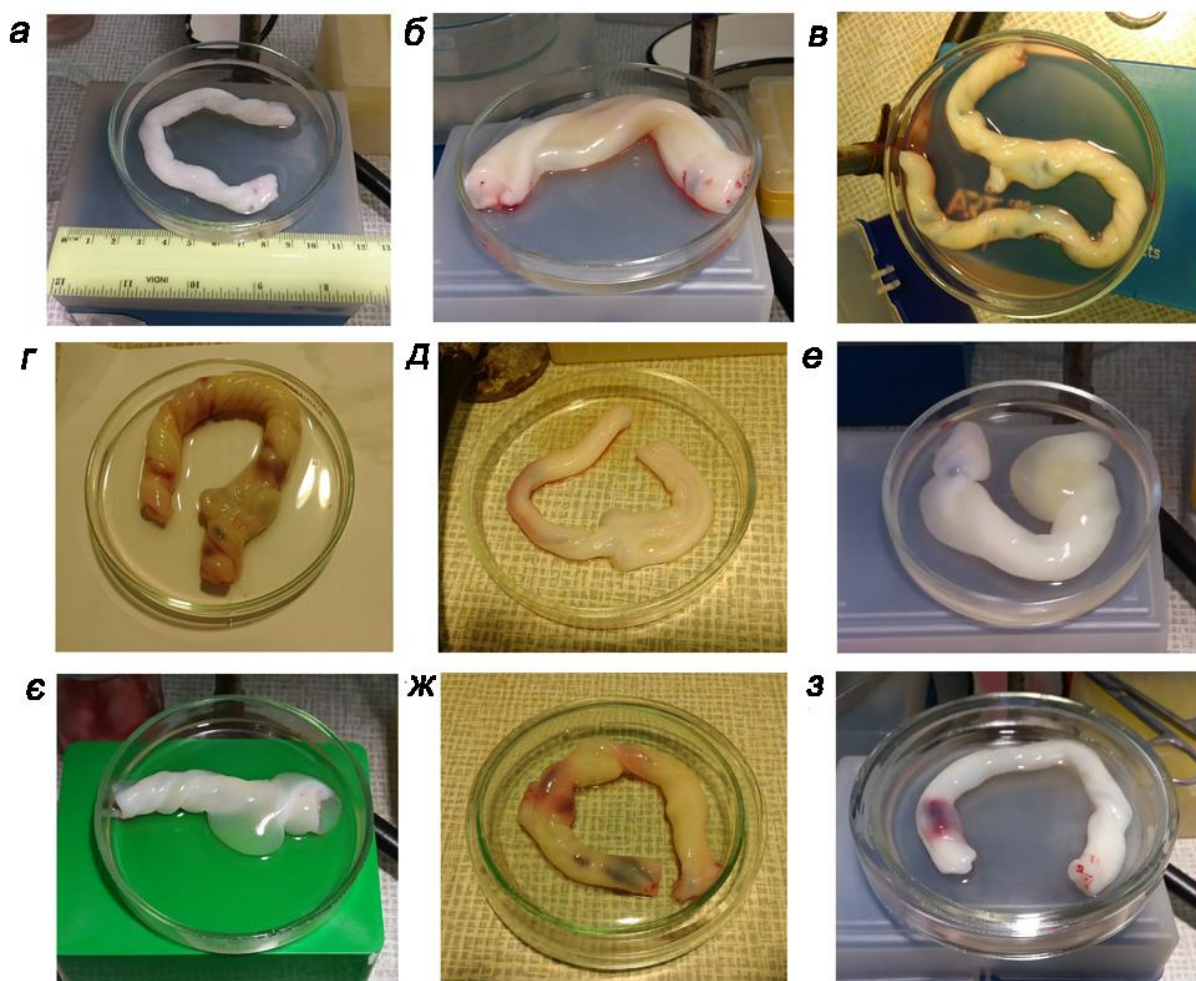


Рис.3.4. Пупкові кантики (ПК), зовнішній вигляд та особливості будови. а,б - ПК без особливостей будови; в,г,д - ПК із наявністю "петель", утворених судинами, біля поверхні. е,е - ПК із ділянками гелеподібної тканини ВС в надмірній кількості. ж,з - наявність крововиливів та інфільтрування тканини ВС еритроцитами

На рис 3.5. наведено дані щодо розподілення по діаметру, типу тканини Вартонова студня (який враховували при механічній обробці тканини), та наявності крововиливів і нетипових елементів будови, серед 54 оброблених досліджених зразків.

Зазвичай подібні деталі залишаються поза увагою навіть публікацій, що фокусуються на особливостях ВС, та їхніми можливими кореляціями з особливостями культури [156]. Але, наш досвід роботи з виділенням клітин з

BC вимагав звернути на них увагу.

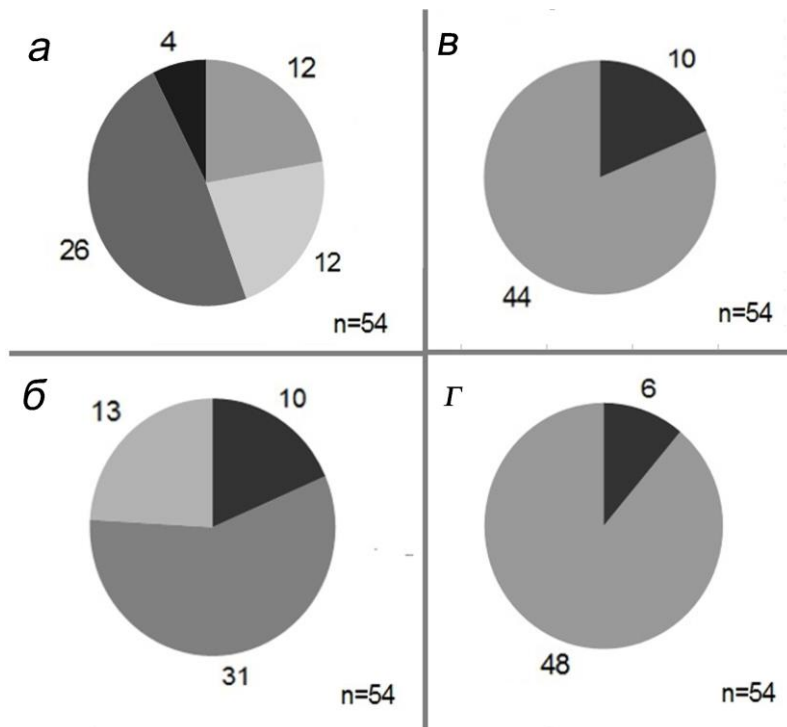


Рис. 3.5. *а* - розподіл особливостей типу тканини Вартонова студня серед оброблених зразків, кількість випадків серед досліджених (всього  $n=54$ ): ■ - желеподібний, ■ - помірний, ■ - гетерогенний, ■ - щільний; *б* - діаметри пупкових канатиків (всього  $n=54$ ): ■ - <1 см, ■ - 1-1,5 см, ■ - >1 см; *в* - ■ наявність крововиливу та інфільтрації тканини студню еритроцитами у тканині ВС, ■ - зразки ПК без особливостей; *г* - ■ - наявність особливостей будови ПК (аномалії судин та сполучної тканини студню) серед оброблених зразків, ■ - зразки ПК без особливостей,  $n=54$ .

Наявність подібних особливостей вимагала розробки підходів, що дали можливість оцінити вплив умов культивування незалежно від індивідуальних особливостей донора. Врахувавши виявлені особливості, вдалось оптимізувати відомі з літератури методи виділення МСК-ВС шляхом експлантів [157], і розробити універсальний протокол отримання МСК з ВС, який в подальшому було застосовано для отримання МСК-ВС для усіх наступних досліджень.

Згідно нього, наданий фрагмент ВС відмивали від згустків крові у PBS,



переносили на 40 хв в розчин антибіотиків (пеніциліна (“Артеріум”) і стрептоміцина (“Артеріум”) по 1 мг/мл). Після цього фрагмент три рази промивали PBS. В чашках Петрі (скляних),  $d=10$  см, в PBS починали обробку фрагменту (рис 3.6,а).



Рис. 3.6. Метод виділення МСК-ВС з тканини ВС: *а* - фрагменти пупкового канатика у чашці Петрі ( $d=10$  см); *б* - фрагменти ВС у чашці Петрі ( $d=10$  см); *в* - фрагменти ВС у чашці Петрі ( $d=4,5$  см)

Спершу пупковий канатик різали на фрагменти довжиною приблизно 1 см, після чого з них механічно видаляли судини з метою уникнення ризику контамінації клітинами ендотелію та ендотеліальними прогеніторами [158]. Після чого отримані фрагменти промивали PBS від залишків крові, з метою зниження кількості еритроцитів. Після видалення судин ВС механічно подрібнювали до фрагментів розміром 0,3-0,5 см (рис 3.6, б) і переносили в ростове поживне середовище.

Залежно від індивідуальних особливостей донорів, у більшості випадків приблизно на 5-14 добу від початку інкубування фрагментів, на дні обраного культурального посуду можна спостерігати окремі фібробластноподібні клітини, або групи кількістю до 10 клітин.

У деяких випадках клітини можна було побачити на 2 день. Наші спостереження показали, що час появи клітин та їх початкова кількість значно варіює, залежно від особливостей донора. Втім, варто зауважити, не вдалось виявити кореляцію між організацією студню та часом появи перших адгезивних клітин (ривс. 3.7.).

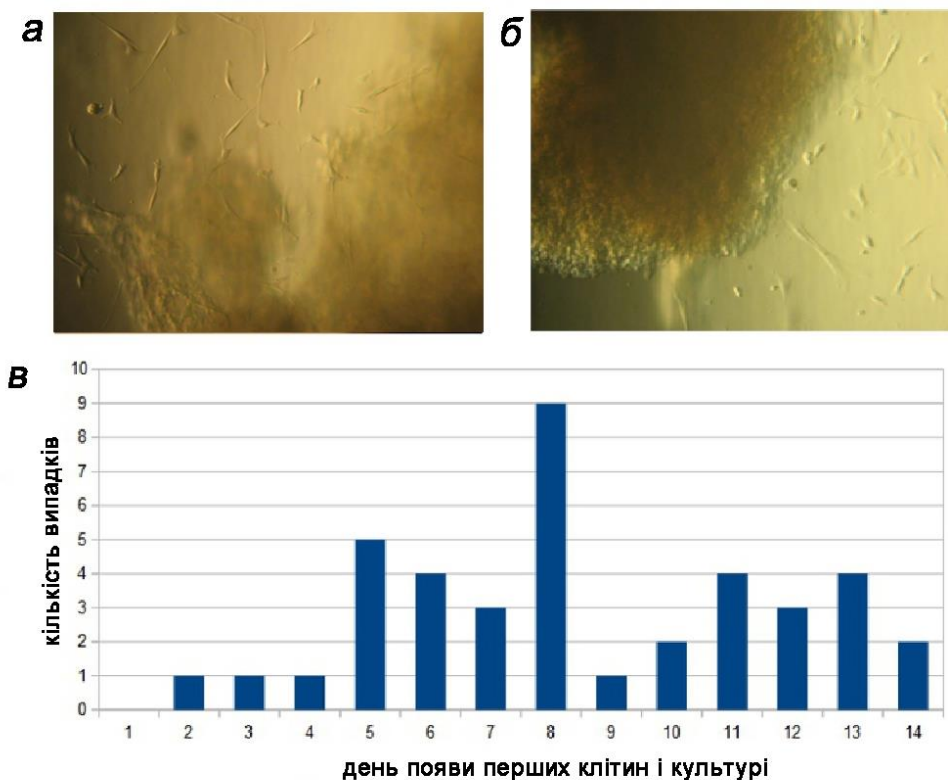


Рис 3.7. *а,б* - поодинокі клітини та фрагмент Вартонового студню (світлова мікроскопія  $\times 40$ , збільшення камери 1,4); *в* - день появи перших адгезивних клітин

Зазвичай, приблизно на п'ятий день після появи перших клонів можна було спостерігати клітини, що діляться (рис 3.8.). З цього часу отримані клони можна було вважати первинною культурою (або, так званим "нульовим пасажем"). У середньому, за 10-14 днів клітини в межах одного клону досягали конфлюентності 80%, що зумовлювало потребу починати пасування культури. При пасуванні підрахунок клітин в первинній культурі показував значну варіабельність результатів, залежно від донорських особливостей. Наприклад, за умови культивування однакової кількості фрагментів ВС (розподілених випадково з різних ділянок пупкового канатика), з культурального флакона  $25 \text{ см}^2$  від різних донорів через 10 днів від появи перших клітин можна отримати від 50 до 300 тис. клітин первинної культури. (рис 3.8.,*б*)

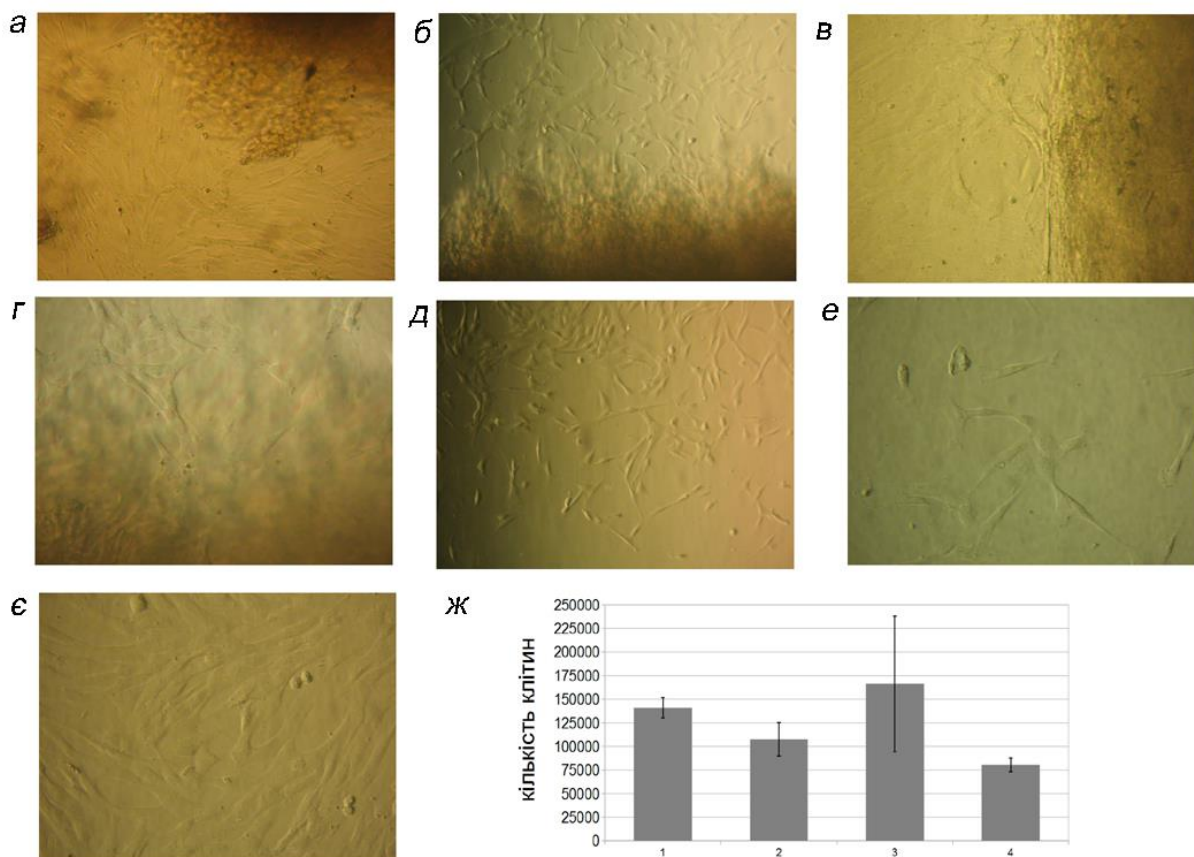


Рис 3.8. Різноманітність первинних культур за кількістю клітин та організацією моно шару: а, б - фрагмент Вартонового студню та клони різної конфлюентності, світлова мікроскопія x40, збільшення камери 1,4; в, г - клони клітин та фрагмент Вартонового студню на 10-14 день інкубування, світлова мікроскопія x100, збільшення камери 1,4; д - морфологія клону клітин на 14 день (світлова мікроскопія x40 збільшення камери 1,4); е, є - клони клітин, день 10; x100, збільшення камери 1,4; ж - кількість клітин, яку можна отримати з флакону 25 см<sup>2</sup>, 10 день після появи перших клітин, 4 різні донори

Коли клітини первинної культури досягали достатньої для аналізу кількості, після першого пасування також, як правило, визначали рівень експресії поверхневих маркерних білків, типових для МСК: наявність CD 90, CD73, CD105 та відсутність CD 45 і CD34, і встановлювали, який відсоток отриманих фібробластоподібних клітин відповідає характеристикам МСК, встановленим Міжнародним товариством з клітинної терапії [26]. Серед

оцінюваних зразків, починаючи з нульового пасажу, в усіх варіантах позитивними по маркерах було більше 60% популяції. У більшості зразків ці показники досягали 90% (рис 3.9). Слід зазначити, оскільки в подальших дослідях використовували культури другого пасажу, оцінку популяції на предмет експресії поверхневих маркерів МСК проводили безпосередньо після першого пасажу.

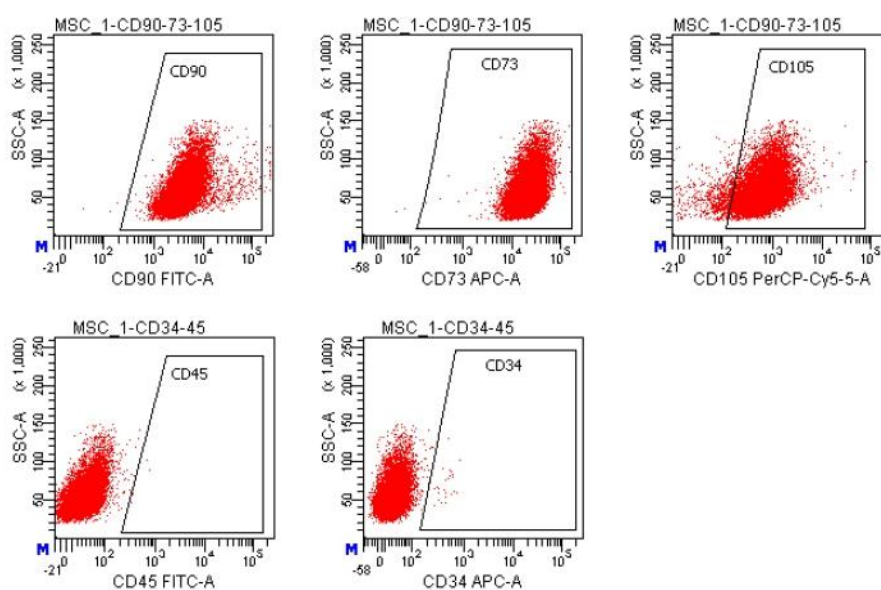


Рис.3.9. Експресія поверхневих маркерів, 0 пасаж, проточна цитофлюориметрія

Після отримання "першого покоління" клонів з фрагментів ВС, було помічено, що в середовищі можна побачити невелику кількість окремих округлих клітин. При перенесенні поживного середовища у новий культуральний посуд вони здатні прикріплюватися, і давати початок новим клонам. Узагальнюючи численні спостереження за різним донорським матеріалом ВС, було визначено, що ВС може не втрачати здатності бути джерелом МСК до 30-35 днів. Клітини, отримані за цей час, не відрізняються за рівнем експресії поверхневих маркерів та особливостями морфології (рис 3.10).

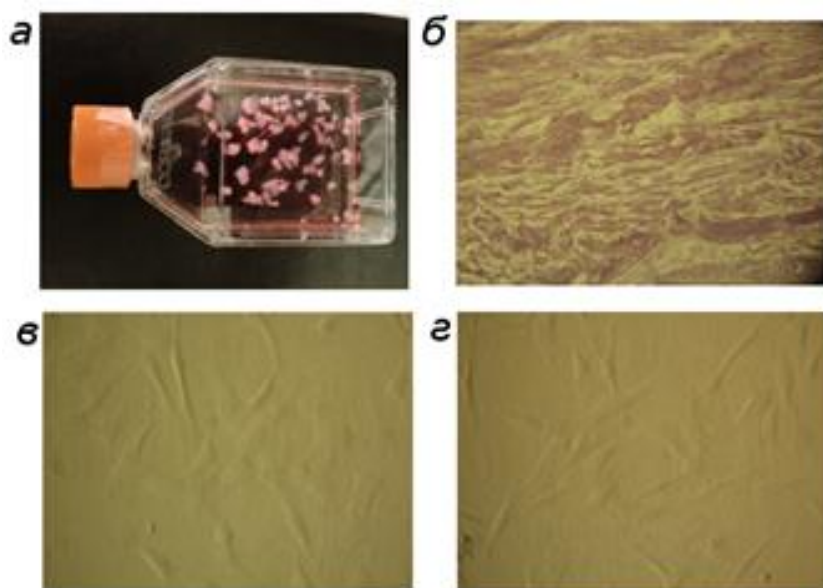


Рис.3.10. Довготривале інкубування фрагментів ВС: *а* - фрагменти ВС, що набули округлої форми, флакон 25 см<sup>2</sup>; *б* - тканина Вартонова студня, 20 доба інкубування, світлова мікроскопія, x200 , збільшення камери 1,4; *в* - морфологія клонів МСК, 18 день інкубування фрагментів (від появи одиничних клітин - 10 день), інтерференційна мікроскопія x100, збільшення камери 1,4; *г* - морфологія клонів МСК, 36 день інкубування фрагментів (від появи одиничних клітин - 8 день), інтерференційна мікроскопія x100, збільшення камери 1,4.

У результаті спостережень за таким довготривалим інкубуванням фрагментів ВС, було виявлено, що фрагменти ВС, після 10-20 днів культивування (залежно від донорських особливостей), змінюють зовнішній вигляд: зменшуються в розмірах і набувають округлої форми (рис 3.10, а). Ми припустили, що такий ефект можливий через деградацію позаклітинного матриксу ВС. Гістологічні дослідження фрагменту ВС на 20 добу культивування, після набуття фрагментами округлої форми наведено на рис 3.10,б (аналіз виконано співробітниками "Інститут біології"). Можна помітити деградацію колагенових волокон ВС. Що цікаво, не виявлено власне клітин, що може свідчити про їхню незначну вихідну кількість та нерівномірне розташування у міжклітинному матриксі ВС.

### 3.2.3. Отримання культур МСК-ВС за умов помірної гіпоксії.

Основною метою даного дослідження було вирішення питання доцільності застосування умов помірної гіпоксії для підвищення ефективності отримання первинної культури МСК-ВС. Для цього було проведено 3 незалежні дослідження на ПК від різних донорів (від новонароджених жіночої статі), з приблизно однаковими морфологічними характеристиками (які було згадано вище: діаметром канатику, щільністю студню та механічними особливостями судин).

Різниця між донорським матеріалом зумовила необхідність розробити спосіб порівняння ефективності отримання первинних культур МСК-ВС, який можна застосовувати незалежно від природної кількості клітин в ПК. Враховуючи нерівномірність розташування МСК серед "сполучної тканини" студню, потрібно було порівнювати між собою фрагменти, вибрані випадковим чином. Водночас з літератури відомо про нерівномірне розташування МСК стосовно довжини ПК [66].

Тому, було розроблено спосіб відбору фрагментів, який полягав в тому, що отриманий ПК (або надану частину від повної довжини) умовно було поділено на 3 секції: 2 "крайні" та 1 центральну. Кожну с секцій було оброблено як описано в попередньому пункті. З кожної секції було випадковим чином вибрано 2 фрагменти, і перенесено в пластикову чашку Петрі (35 мм). Таку кількість фрагментів було обрано, оскільки, судячи зі спостережень, 6 фрагментів та 2,5 мл середовища створювали оптимальне співвідношення для виходу клітин з ВС. Фрагменти ВС з контрольних груп було культивовано в стандартних умовах CO<sub>2</sub>-інкубатора. Фрагменти ВС з експериментальної групи було інкубовано в газовій суміші, що містила 3% кисню, 5% вуглекислого газу та 92% азоту. З моменту початку спостереження, коли було помічено появу перших прикріплених клітин, раз на 3 дні, одночасно з заміною культурального середовища, вели підрахунок кількості поодиноких клітин та колоній, із врахуванням кількості клітин в них. Також клони оцінювали за розміром, щільністю та особливостями

морфології. Після 17 днів культивування фрагментів ВС, коли, згідно спостереженням, щільність моношару клітин в колоніях сягала більше 80 %, було оцінено кількість та розмір колоній в ЧП. Частину культур фіксували 4% розчином формаліну та забарвлювали метиленовим синім. Результати представлені на рис 3.11 .

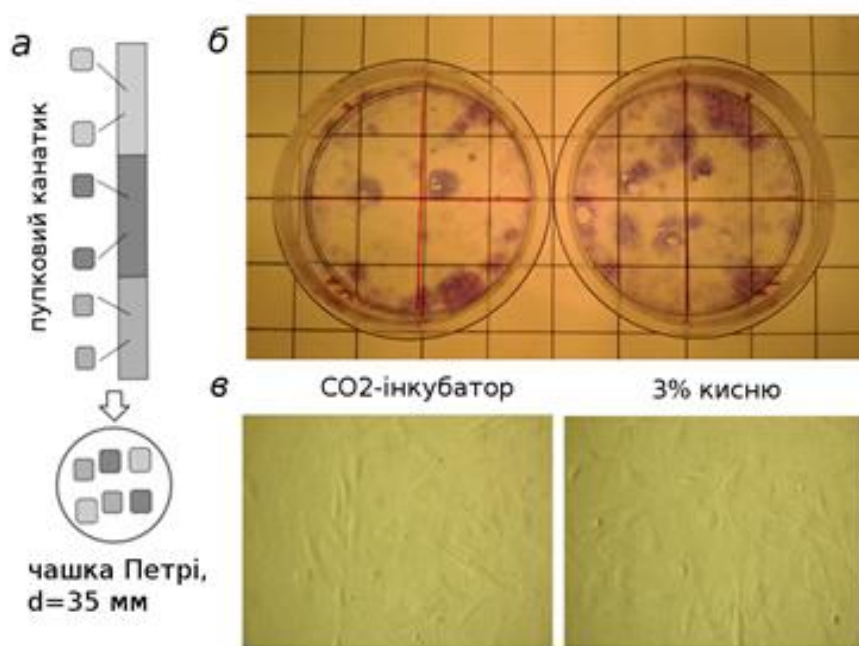


Рис. 3.11. Введення МСК-ВС в культуру при фізіологічних концентраціях кисню: *а* - схема відбору фрагментів ВС для порівняння різних умов культивування; *б* - зовнішній вигляд чашок Петрі (35 мм) з клонами, забарвлення метиленовим синім: зліва - культури зі стандартних умов CO<sub>2</sub>-інкубатора, справа - культивовані у газовій суміші, 3% кисню (3% кисню, 5% CO<sub>2</sub>, 92% азот), мікрофотографія; *в* - культури МСК-ВС (світлова мікроскопія x100, збільшення камери 1,4): зліва – з умов CO<sub>2</sub>-інкубатора, справа - з газової суміші (3% кисню, 5% CO<sub>2</sub>, 92% азот)

Іншу частину культур, через 17 днів було пасовано. При пасуванні підраховували загальну кількість клітин та оцінювали їх метаболічну активність за МТТ-тестом. Паралельно з дослідними зразками отримували первинну культуру на флаконах 25 та 75 см<sup>2</sup> (для інших досліджень) та оцінювали за поверхневими маркерами (CD90, CD73, CD105, CD34, CD45).

Було показано, що за маркерними характеристиками клітини відповідають критеріям МСК (всі вище 90%) .

Після 17 днів культивування за допомогою світлової мікроскопії було виявлено, що клони клітин у популяціях, культивованих при 3% кисню, мають більший розмір. При цьому, клітини в колоніях зберігали характерну для МСК морфологію. Клітин з атиповою морфологією не було виявлено в жодній експериментальній групі (рис 3.11 в, з).

За результатами підрахунку кількості клітин виявили, що у всіх експериментальних групах клітин, культивованих при 3% кисню, кількість клітин була достовірно більшою (рис 3.12 а).

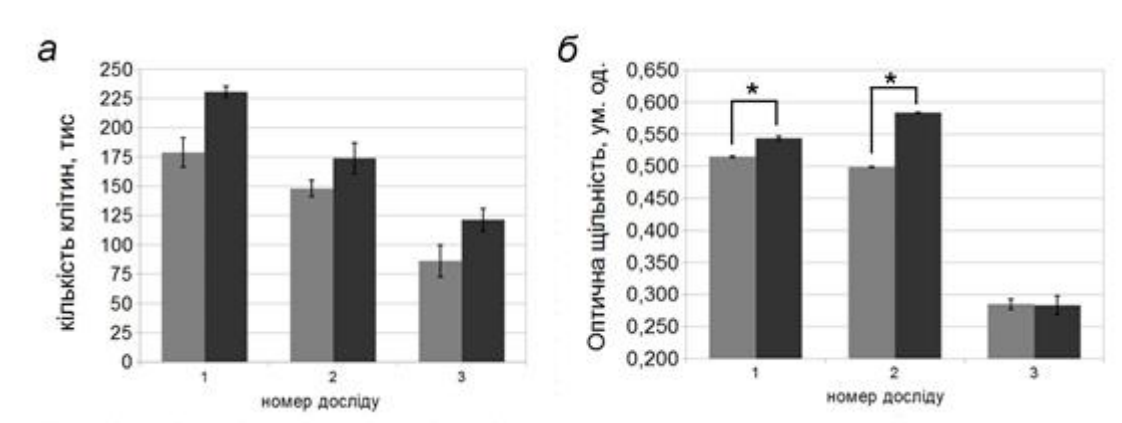


Рис 3.12. Кількість клітин та активність метаболізму первинних культур МСК-ВС: *а* - кількість клітин після 17 днів інкубування фрагментів ВС, дані представлено як середне  $\pm$  середнє квадратичне відхилення; *б* - МТТ-тест, оптична щільність, ум.од. дані представлено як середнє  $\pm$  середнє квадратичне відхилення,\* -  $p < 0,05$

МТТ-тест для культур з умов  $\text{CO}_2$ -інкубатора проводили за загальноприйнятою методикою. За годину до проведення тесту поживне середовище змінювали на нове. Клітти, культивовані при 3% кисню, готували до вимірювання таким чином: перед вимірюванням їх витримували 1 годину в умовах  $\text{CO}_2$ -інкубатора, після чого змінювали поживне середовище (одночасно з культурами з умов  $\text{CO}_2$ -інкубатора), і витримували 1 годину в умовах  $\text{CO}_2$ -інкубатора, паралельно з контрольною групою.



Вимірювання інтенсивності утворення формазану в МТТ-тесті показали, що оптична щільність відрізнялись у трьох незалежних дослідах, в яких використовувався матеріал від різних донорів. Показники відрізнялись не лише кількісно, але і характером. У двох із трьох донорів інтенсивність утворення формазану була вищою у культур з гіпоксичних умов, що відповідало більшій кількості клітин при підрахунку (рис 3.12,б). У одному варіанті, показник оптичної щільності був практично однаковим. Це може свідчити про різний час та характер відновлення інтенсивності метаболічних процесів у культурах, отриманих від різних донорів.

### **Висновок до підрозділу 3.2**

Виділення та мультиплікація первинних культур МСК-ВС показали значну гетерогенність матеріалу від різних донорів у особливостях будови пупкового канатика, характеристиках Вартонового студня, також особливостях отримання первинних культур МСК-ВС методом експлантів: час появи перших клонів, їх морфології, та кількості клітин, яку потенційно можна отримати. Було оптимізовано виділення первинної культури МСК-ВС методом експлантів, для застосування у подальших дослідженнях. Було встановлено, що отримання первинних культур МСК-ВС методом експлантів в умовах помірної гіпоксії дозволяє збільшити кількість отриманих клітин.

### **Результати, викладені у підрозділі, опубліковано в роботах**

1. Lykhmus O., Koval L., Voytenko L., Uspenska K., Komisarenko S., Deryabina O., **Shuvalova N.**, Kordium V., Ustymenko A., Kyryk V., Skok M. Intravenously injected mesenchymal stem Cells penetrate the brain and treat inflammation-induced brain damage and memory impairment in mice // *Front Pharmacol.* 2019. - Vol 10. - P. 355

2. **Шувалова Н.С.**, Дерябіна О.Г. ,Жукова С.М., Сорока М.П. Культивування мезенхімальних стовбурових клітин пуповинного канатика

людини при знижених концентраціях кисню // Науково-практична конференція з міжнародною участю "Генетична і регенеративна медицина: проблеми та перспективи" Журнал академії медичних наук України, том 16, додаток, 2010 - с.191

### 3.3. Аналіз проліферації культур МСК-ВС при фізіологічних концентраціях кисню

Висока проліферативна активність культур МСК, незалежно від джерела отримання, є важливою умовою для їхнього застосування як у дослідженнях, так і в клінічній практиці. Згідно з літературними джерелами, культивування МСК протягом тривалих періодів є небезпечним через ризик виникнення генетичних порушень [5, 71]. Таким чином, перед дослідниками стоять завдання отримання максимальної кількості клітин, і, разом з тим, скорочення часу їх перебування в умовах *in vitro*. Для вирішення цієї задачі, оптимальним рішенням вважається культивування за умов помірної гіпоксії.

Іншими факторами, що може спричинювати пошкодження макромолекул поверхні клітин і деградацію культур, вважаються стандартні методики пасування, в яких використовують розчини ферментів [81]. Тому методики, що дозволяють здійснювати пасування культури без примусового відкріплення клітин від субстрату, також можуть потенційно бути використані як спосіб оптимізації протоколів культивування МСК.

Оскільки в попередніх дослідженнях були отримані результати, які свідчили про підвищення кількості клітин в первинних культурах МСК-ВС, за умов помірної гіпоксії (а саме, 3% кисню), наступним етапом роботи стало дослідження впливу умов фізіологічних концентрацій кисню на мультиплікацію культур МСК-ВС *in vitro*. Враховуючи відомі з літератури дані про цитопротективний ефект інертних газів, в тому числі і аргону, окремим завданням стала перевірка ефективності застосування газової суміші зі зниженим вмістом кисню, створеної на основі аргону.

Вплив застосування умов помірної гіпоксії було перевірено для неіморталізованих клітинних ліній, пасованих за загальноприйнятою методикою. Додатковим завданням були також оптимізація стандартних протоколів ведення неіморталізованої лінії МСК-ВС, шляхом збереження та

мультиплікації клітин МСК-ВС, які спотанно відкріпляються від субстрату, в стандартних умовах CO<sub>2</sub>-інкубатора та за умов помірної гіпоксії.

**3.3.1. Дослідження проліферації неіморталізованих ліній МСК-ВС, пасованих за стандартними методиками.** Для проведення цього дослідження, після етапу первинної культури ("нульового пасажу"), клони, культивовані в стандартних умовах CO<sub>2</sub>-інкубатора, було пасовано. Після першого пасування культури МСК-ВС, у всіх експериментах були поділені на 3 групи. Експериментальні групи МСК-ВС культивували в газових сумішах на основі азоту (кисень - 3%, вуглекислий газ - 4%, азот - 93%) і аргону (кисень - 3%, вуглекислий газ - 4%, аргон - 93%). Контрольну групу культивували в стандартних умовах CO<sub>2</sub>-інкубатора (атмосферна концентрація кисню, ≈20%, вуглекислий газ - 4%) (рис 3.13 а).

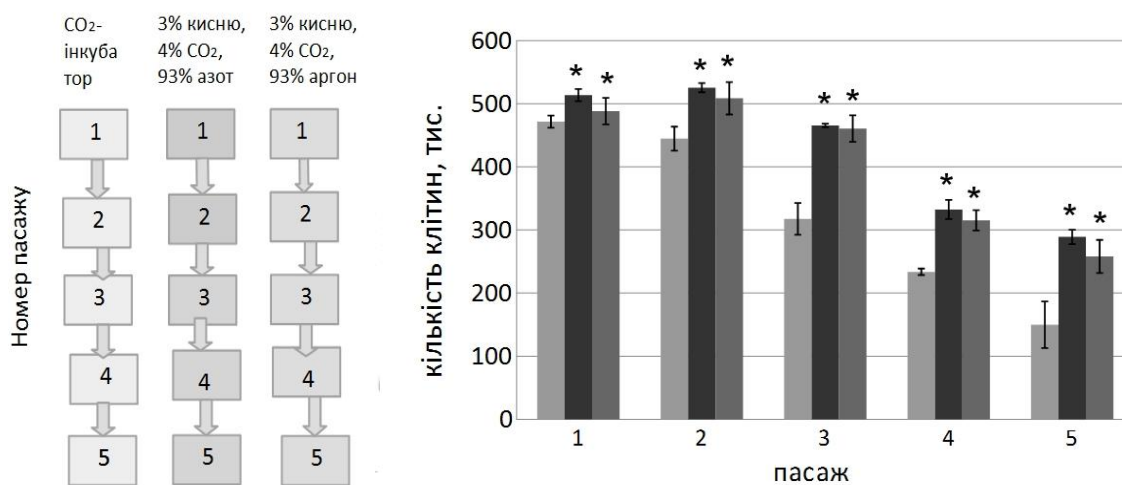


Рис. 3.13. Проліферативна активність МСК-ВС: *а* — схема експериментів, *б* - Порівняння кількості клітин в культурах МСК на кожному пасажі, після 7 днів культивування: ■ в CO<sub>2</sub>-інкубаторі, ■- в газовій суміші на основі азоту (кисень - 3%, вуглекислий газ - 4%, азот - 93%), ■ в газовій суміші на основі аргону (кисень - 3%, вуглекислий газ - 4%, аргон - 93%); \* - різниця між дослідним і контрольним варіантом достовірна (p<0.05)

У кожній групі, на кожному пасажі, починаючи з першого, клітини

"висівали" в кількості 75 000 на флакон (25 см<sup>2</sup>, щільність культури 3000 на см<sup>2</sup>), і культивували протягом 7 днів. Після цього, клітини пасували за допомогою розчину версена (0,02%) і трипсину (0,1 %) в співвідношенні 1:1, і підраховували за допомогою гемоцитометра (камери Горяєва). Також, оцінювали подвоєння популяції за формулою:  $PD = \log (N_f / N_i) / \log 2$ , де  $N_f$  = кінцева кількість клітин;  $N_i$  = початкова кількість клітин [84]. Згідно обраної схеми експерименту, в кожному незалежному досліді використовували матеріал від 1 донору. Результати підрахунку кількості клітин після 7 днів культивування, для 5 пасажів (середні результати по 3 донорам) проілюстровані на рис.3.13.б.

На всіх п'яти пасажах, кількість клітин після 7 днів культивування при 3% кисню була більшою, ніж у загальноприйнятих умовах CO<sub>2</sub> - інкубатора (табл. 3.2.)

Таблиця. 3.2.

**Порівняння кількості клітин в культурах МСК  
після 7 днів культивування**

<i>пасаж</i>	<i>азот</i>	<i>аргон</i>	<i>атмосфера</i>
1	513,68 ±9,58	488,3±20,91	471,72±9,7
2	525,47±7,32	508,6±25,69	444,58±19,07
3	465,6±2,91	460,67±21,06	317,53±25,23
4	332,39±15,16	315,27±16,22	233,62±5,1
5	288,93±11,39	258±26,17	149,77±36,9367

Варто зауважити, що спостерігалась різниця між показниками кількості клітин у сумішах на основі азоту і на основі аргону: підвищення проліферативної активності клітин у суміші на основі азоту було більш вираженим. Також було виявлено, що, починаючи з третього пасажу, з кожним пасуванням рівень мультиплікації культур знижувався. Для МСК, культивованих в газових сумішах при 3% кисню, ця тенденція була менш виражена.

У середньому показники мультиплікації культури були такими. На першому пасажі в групах із газових сумішей на основі азоту спостерігали збільшення кількості клітин в 6,8 разів, в газовій суміші на основі аргону - 6,4, у контролі - 6,1. На 2 пасажі в групах із газових сумішей на основі азоту спостерігалось збільшення кількості клітин в 6,9 разів, в газовій суміші на основі аргону - 6,8, в контролі - 6; на 3му пасажі у 6 разів, 6 разів та 4,1 раз, відповідно. Результати наведено в таблиці 3.3.

Таблиця 3.3.

### Збільшення кількості клітин в культурах МСК-ВС

<i>пасаж</i>	<i>азот</i>	<i>аргон</i>	<i>атмосфера</i>
1	6,8	6,4	6,1
2	6,9	6,8	6
3	6	6	4,1
4	4,4	4,2	3,1
5	3,8	3,4	1,9

Визначення числа подвоєнь в культурах показало, що МСК-ВС, культивовані в умовах помірної гіпоксії, в середньому проходили більшу кількість поділів за період культивування (Таблиця 3.4).

Таблиця 3.4

### Кількість подвоєнь в культурах МСК-ВС

пасаж	3% кисню, азот	3% кисню, аргон	CO <sub>2</sub> -інкубатор
1	2,76	2,68	2,61
2	2,79	2,76	2,59
3	2,59	2,59	2,04
4	2,15	2,07	1,64
5	1,95	1,78	1

Отже, підсумовуючи результати, можна сказати, що культивування при 3% кисню підвищило рівень проліферативної активності культур клітин

МСК-ВС. Ефекти сумішей різного складу (створених на основі азоту і на основі аргону) відрізнялись: на всіх досліджуваних пасажах позитивний вплив суміші на основі азоту був більш виразним.

**3.3.2. Дослідження експресії поверхневих маркерних білків при культивуванні в умовах помірної гіпоксії.** Після "нульового" пасажу, під час першого пасування, поводили рутинне оцінювання рівнів експресії поверхневих маркерних білків CD90, CD73 та CD105. У досліді було використано культури, експресія маркерних білків у яких була вище 95%. В середньому, у культур, використаних у наших досліді, маркери МСК-ВС експресувались на високому рівні: CD90 -  $98,55 \pm 0,64\%$ , CD73 -  $98,25 \pm 0,49\%$ , CD105 -  $97,4 \pm 2,55\%$  (рис 3.14).

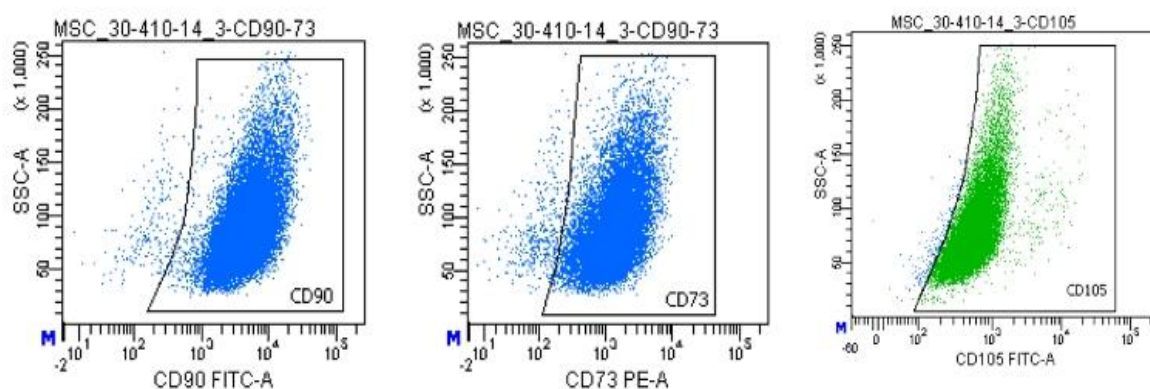


Рис. 3.14. Рівень експресії поверхневих маркерних білків, 0 пасаж, проточна цитофлюориметрія (FACSAria).

Окрім того, ми проаналізували рівень експресії вказаних поверхневих маркерних білків у культур МСК-ВС, культивованих при 3% кисню, у різних газових сумішах та умовах CO<sub>2</sub>-інкубатора, після п'ятого пасажу. Результати наведено в таблиці 3.5. Дослідження показали, що, у середньому, у наших досліді рівні сягали вище 90% у всіх зразках.

Таблиця 3.5

**Рівень експресії поверхневих маркерних білків у культурах МСК-  
ВС, 5 пасаж**

Умови культивування	CD90 ,%	CD73,%	CD105,%
CO <sub>2</sub> - інкубатор	99,75±0,21	99,9	95,7±5,74
3% кисню, азот	99,9±0,28	99,9±0,14	98,45±1,48
3% кисню, аргон	99,75±0,07	99,95± 0,07	97,4±0,71

Рівень кисню та склад газової суміші не впливали на оцінювані показники (рис 3.15)

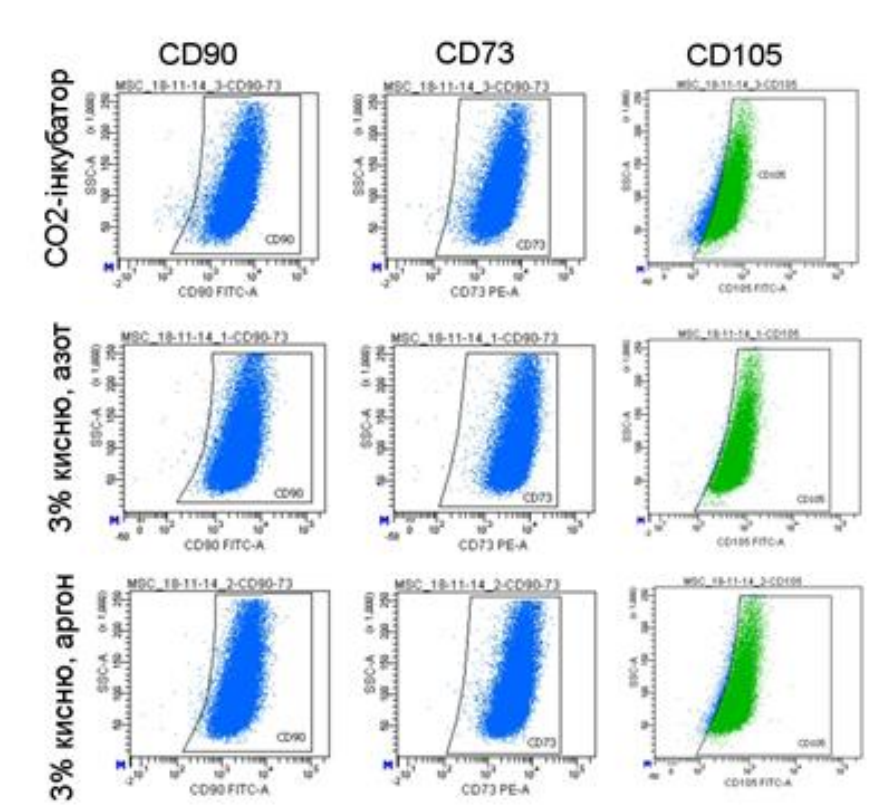


Рис.3.15. Рівень експресії поверхневих маркерних білків, 5 пасаж, проточна цитофлюориметрія (FACSAria). а — умови CO<sub>2</sub>-інкубатора. б — суміш на основі азоту (кисень - 3%, вуглекислий газ - 4%, азот — 93%). в - аргон - газова суміш на основі аргону (кисень - 3%, вуглекислий газ - 4%, аргон — 93%).



Також, в одному з окремих дослідів було виявлено цікавий феномен. У культурі, отриманій від одного донора, рівень експресії CD73, визначений після "нульового" пасажу, становив 79,7%. Варто зауважити, у цій самій культурі експресія CD90 становила 99,1%, і CD105 - 98,4%. Після культивування неіморталізованої лінії, похідної з цих клітин, у згаданих вище газових сумішах (при 3% кисню) та стандартних умовах CO<sub>2</sub>-інкубатора було виявлено, що на п'ятому пасажі рівень експресії поверхневих маркерних білків практично не змінився. Результати наведено в таблиці 3.6.

*Таблиця 3.6.*

**Рівень експресії поверхневих маркерних білків, 5 пасаж**

Умови культивування	CD90	CD73	CD105
CO <sub>2</sub> -інкубатор	99,9	73,7	89,6
3% кисню, азот	99,7	75,6	96
3% кисню, аргон	99,9	69,6	93

Рівень експресії CD73 лише незначно знизився. Найкраще рівень експресії зберігся у групі, культивованій у газовій суміші на основі азоту. Отримані результати, імовірно, підтверджують, що умови помірної гіпоксії в нашій серії експериментів не впливали на рівень експресії поверхневих маркерів.

**3.3.3. Дослідження проліферації неіморталізованих ліній МСК-ВС, отриманих за допомогою збереження клітин, які спонтанно відкріпились.** Відомо, що ступінь адгезії клітин до субстрату перед поділом знижується [159]. Метод збереження клітин, які природним чином відкріпились від субстрату, або "самопересіву" (в даній роботі ці назви є синонімічними) заснований на факті, що культура МСК в нормі є

несинхронізованою, і весь час культивування містить певну кількість клітин в стані поділу. Наші спостереження показали, що в культуральному посуді, куди перенесли кондиціоноване середовище, відібране з культури МСК-ВС, через 2-5 днів можна спостерігати прикріплені поодинокі клітини, здатні формувати клони. Ці клітини можна пасувати і отримувати життєздатні культури. За морфологією і маркерними характеристиками отримані таким чином клітини відповідають МСК-ВС вихідної культури [160]. Метод "самопересіву" може бути використаний як для додаткового отримання клонів, так і для оцінки клоногенного потенціалу популяції. Завданням даного етапу роботи було визначення впливу умов фізіологічних концентрацій кисню на культури, отримані таким методом.

**3.3.3.1. Характеристика методу отримання культур МСК-Вс за допомогою збереження клітин, що спонтанно відкріпились.** Необхідною умовою для порівняння даних, отриманих в ході експерименту, є отримання ідентичних показників в умовах, які легко співставити.

Показником, який порівнювали для неіморталізованих ліній МСК-ВС, пасованих стандартно (з використанням розчину трипсину і версену), і МСК-ВС, отриманих методом "самопересіву", була кінцева кількість клітин, після однакового часу культивування на певному пасажі. Для цього необхідно було стандартизувати "стартову" кількість клітин 75 тис. і час між пасуванням - 7 днів. Неіморталізовану лінію МСК-ВС, яку з етапу первинної культури (так званого нульового пасажу) пасували лише за допомогою розчину трипсину і версену (ТВ-пасування), умовно позначали як "основну". На кожному пасажі, починаючи з нульового, після 3 днів культивування, збирали кондиціоноване середовище, центрифугували і переносили на інший флакон 25 см<sup>2</sup>. Спостереження показали, що через 1-3 дні можна було спостерігати невеликі клони МСК-ВС. Для досягнення клонами розмірів, достатніх для пасування, в середньому було потрібно 12,3 доби. Після досягнення ними достатніх

розмірів та конфлюентності, клони пасували, та висівали на флакон 25 см<sup>2</sup> у кількості 75 тисяч. Після 7 днів культивування культури було пасовано, і кількість клітин підраховували за допомогою камери Горяєва. Неіморталізовані лінії, отримані таким чином, умовно називали "побічними" (рис 3.16).

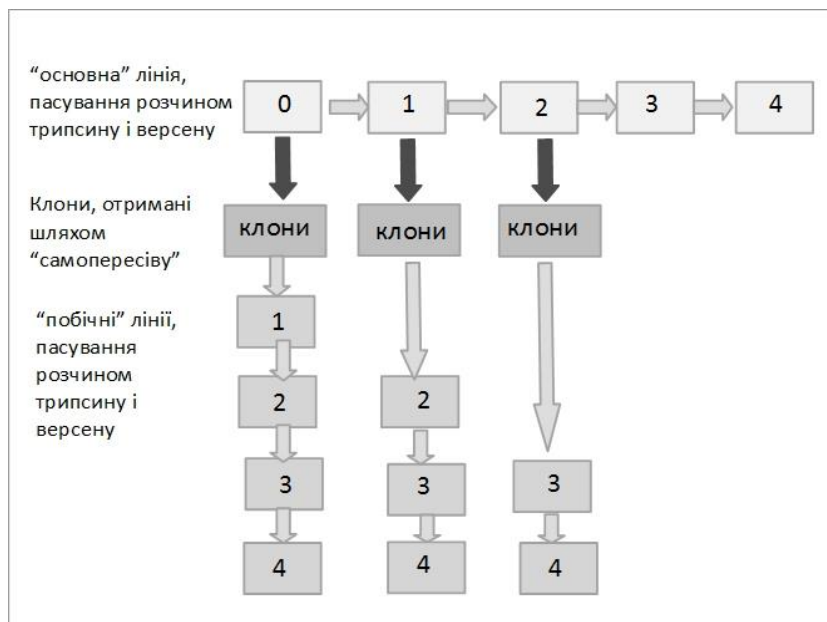


Рис.3.16. Схема отримання культур методом «самопересіву». Блоками позначені культури клітин, цифри позначають пасаж. Світлими стрілками позначені стандартні процедури пасування, темними стрілками - пасування методом «самопересіва»

Варто зауважити, питання, чи вважати клони, отримані "самопересівом", окремим повноцінним пасажем, було відкритим. Врешті було прийнято рішення порівнювати між собою культури, які пройшли однаково кількість саме пасувань за допомогою розчину трипсину-версену (ТВ-пасувань), оскільки ТВ-пасування є примусовим способом відкріплення від субстрату, і як біологічний процес, суттєво відрізняються від "природнього" спонтанного відкріплення.

Згідно обраної схеми експерименту, в кожному незалежному досліді використовували матеріал від 1 донору. Кількість клітин після 7 днів

культивування, на різних пасажах, наведено в таблиці 3.7.

Таблиця. 3.7.

**Кількість клітин в культурах МСК-ВС в «основній» і побічних лініях**

Пасаж	«Основна» лінія, $\times 10^3$	Побічна лінія з 0 пасажу, $\times 10^3$	Побічна лінія з 1 пасажу, $\times 10^3$	Побічна лінія з 2 пасажу, $\times 10^3$
1	471,72 $\pm$ 9,69	462,64 $\pm$ 4,27		
2	444,58 $\pm$ 19,07	466,02 $\pm$ 8,49	457,63 $\pm$ 9,35	
3	317,53 $\pm$ 25,23	338,56 $\pm$ 11,36	317,57 $\pm$ 4,41	252,32 $\pm$ 15,73
4	233,63 $\pm$ 5,10	239,9 $\pm$ 16,74	232,96 $\pm$ 11,08	132,36 $\pm$ 14,01

Отримані дані показали, що характер проліферації в "побічних" лініях був аналогічний такому в "основній". Рівень мультиплікації МСК з кожним пасуванням знижувався для всіх варіантів, незалежно від того, з якого пасажу "основної" лінії була отримана «побічна».

Однак певні відмінності спостерігались. Зниження проліферативної активності в "побічних" лініях, отриманих з 0го і 1го пасажів, відбувалось практично таким же чином, як і в культурах, пасованим за стандартною методикою (ТВ). Для культур, отриманим за допомогою "самопересіву" на 2 пасажі, рівень проліферації був суттєво нижчим, ніж в "основній" лінії (табл.3.7).

Варто зауважити, що різницю між варіантами можна було помітити також при оцінюванні морфології культур. МСК з різних джерел, культивовані *in vitro*, в нормі характеризуються фібробластоподібною морфологією. Типовою для них є веретеноподібна форма. У даному дослідженні, у процесі пасування морфологія культур МСК змінювалась у всіх групах. На 3 і 4 пасажах у культурах почали з'являтися клітини з атипичним фенотипом - розпластаної форми, характерної для старіючих клітин. Для культур "основної" та побічних ліній з нульового та першого пасажів ці явища проявлялись практично на одному рівні, тоді як кількість

старіючих клітин для "побічної" лінії, отриманої з 2го пасажу, була помітно більшою (рис 3.17).



Рис.3.17. Мікрофотографії культур на 3 та 4 пасажах, у «основній» і «побічних» ліній з 0, 1 і 2 пасажів (x100, збільшення камери x1,4).

Узагальнюючи, можна сказати, що метод «самопересіву» дозволяє отримати культури МСК-ВС, що мають такі ж особливості проліферації, що і «основна» культура, але незначно відрізняються залежно від пасажу, на якому були збережені спонтанно відкріплені клітини.

**3.3.3.2. Дослідження проліферації культур МСК-ВС, отриманих за допомогою збереження спонтанно відкріплених клітин, в умовах фізіологічних концентрацій кисню.** Наступним етапом дослідження була оцінка впливу культивування в умовах помірної гіпоксії на життєдіяльність культур, отриманих за допомогою методу "самопересіву". Досліди проводили за схемою, вказаною в попередньому розділі (рис 3.16). Відмінність полягала у тому, що крім груп, культивованих в умовах CO<sub>2</sub>-інкубатора, також культивували "основні" та "побічні лінії" при 3% кисню, у двох різних газових сумішах такого складу: на основі азоту (кисень - 3%, вуглекислий газ - 4%, азот - 93%) і аргону (кисень - 3%, вуглекислий газ - 4%, аргон - 93%).

Результати підрахунку МСК-ВС на кожному пасажі після 7 днів культивування показали, що кількість клітин, культивованих при 3% кисню, у

газових сумішах, у всіх експериментальних варіантах була достовірно більшою (рис 3.18. а-в).

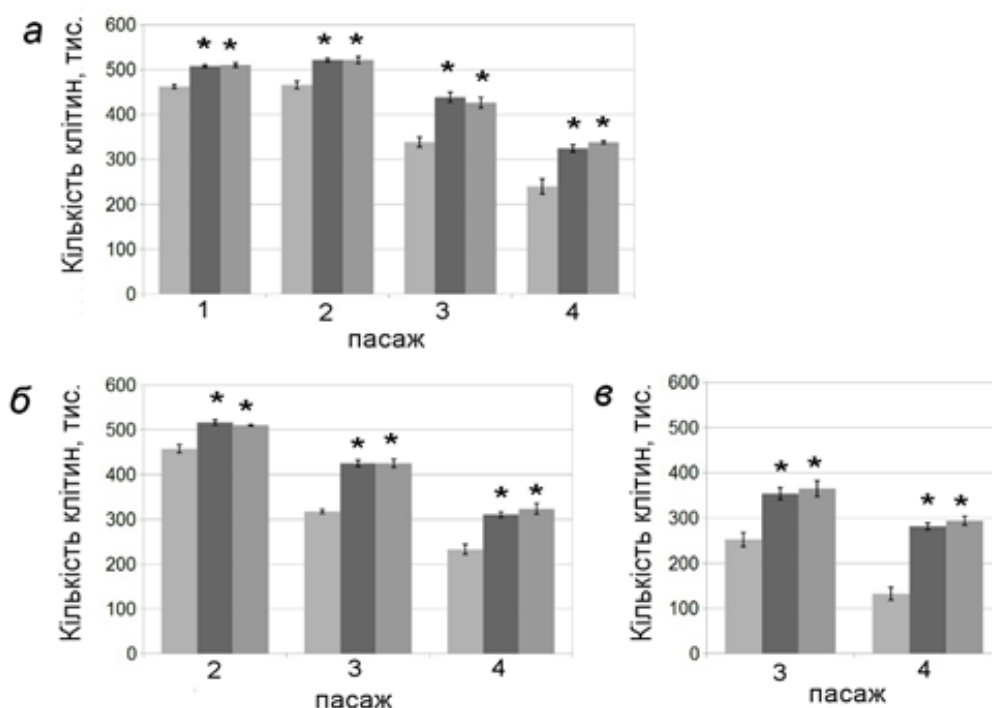


Рис. 3.18. Порівняння кількості клітин в культурах МСК-ВС, отриманих методом "самопересіву" на кожному пасажі, після 7 днів культивування, ■ в СО<sub>2</sub>-інкубаторі, ■- газова суміш на основі азоту (кисень - 3%, вуглекислий газ - 4%, азот - 93%), ■ газова суміш на основі аргону (кисень - 3%, вуглекислий газ - 4%, аргон — 93%). а - з нульового пасажу, б - з першого пасажу, в - з другого пасажу; \* - різниця між дослідним і контрольним варіантом достовірна (p<0.05)

Що цікаво, для культур, отриманих за допомогою «самопересіву», позитивний ефект суміші на основі аргону був більш вираженим. Наприклад, кількість клітин в суміші на основі аргону в "побічних" лініях, отриманих з нульового і першого пасажів, на четвертому пасажі була більшою, ніж в стандартних умовах і в суміші на основі азоту. Наприклад, для культур, отриманих з нульового пасажу, кількість клітин була  $338,3 \times 10^3 \pm 3,3 \times 10^3$  в суміші на основі аргону,  $324,7 \times 10^3 \pm 8 \times 10^3$  в суміші на основі азоту і  $239,9$

$\times 10^3 \pm 16,7 \times 10^3$  в умовах  $\text{CO}_2$ -інкубатора). У "побічних" лініях, отриманих з культур, що перебували на другому пасажі - результат був приблизно однаковим для обох сумішей:  $294,14 \times 10^3 \pm 9,8 \times 10^3$  в суміші на основі аргону,  $281,7 \times 10^3 \pm 7,2 \times 10^3$  в суміші на основі азоту,  $132,3 \times 10^3 \pm 14,1 \times 10^3$  в умовах  $\text{CO}_2$ -інкубатора.

Варто зауважити, що рівень проліферації клітин у культурах, що були отримані з другого пасажу, був нижчим, порівняно з цим показником для "побічних" ліній, отриманих з "нульового" та першого пасажів. Втім, культивування при 3% кисню сприяло підвищенню рівня проліферативної активності для цих культур.

### **Висновки до підрозділу 3.3.**

Дослідження особливостей проліферації неіморталізованих ліній МСК-ВС виявило, що культивування при 3% кисню, і в суміші на основі азоту, і в суміші на основі аргону, підвищує рівень проліферації клітин в культурах. Суміш на основі азоту мала більш виражений ефект. Культивування в газових сумішах із фізіологічним вмістом кисню не впливає на рівень експресії поверхневих маркерних білків. У дослідженні проліферації культур МСК-ВС, що були отримані шляхом збереження клітин, які спонтанно відкріпились, також було виявлено підвищення рівня проліферації в умовах помірної гіпоксії, і більш виразний ефект має газова суміш на основі аргону.

### **Результати, викладені у підрозділі, опубліковано в роботах**

1. **Shuvalova N.**, Kordium V. Comparison of proliferative activity of Wharton jelly mesenchymal stem cells in cultures under various gas conditions // Biopolym. Cell. - 2015. - Vol. 31, №3. - P. 233–239.

2. **Shuvalova N.**, Kordium V. Proliferation of Wharton jelly mesenchymal stem cells, derived by preserving the cells with reduced attachment rate, under

various gas conditions // Biopolym. Cell. - 2015. -Vol. 31, №6. - P. 447 - 454.

3. **Shuvalova N.**, Deryabina O., Kordium V. Cultivation of human mesenchymal stem cells under low oxygen tensions // Materials of International Life Sciences Students` Conference, Netherlands, Nijmegen, Nov.2010 - *Abstract book*, P. 80.

4. **Шувалова Н.С.**, Дерябіна О.Г., Маслова О.О., Жукова С.М., Сорока М.П., Кордюм В.А. Культивування мезенхімальних стовбурових клітин пупкового канатика людини в газових сумішах із фізіологічними концентраціями кисню на основі азоту та аргону // Науково-практична конференція з міжнародною участю "Актуальні проблеми регенеративної медицини", Київ 2012. - *Журнал академії медичних наук України*, том 18, додаток - с.167-168

5. **Shuvalova N.**, Deryabina O., Kordium V. Cultivation of human mesenchymal stem cells from umbilical cord matrix under physiological oxygen tensions The 4th international IMBG conference for young scientists "Molecular biology: advances and perspectives" abstract book – 2011. - P. - 176



### **3.4. Дослідження морфологічних особливостей культур МСК-ВС, культивованих при фізіологічних концентраціях кисню**

Морфологія клітин є важливим показником, який відображає внутрішньоклітинні фізіологічні процеси. Наприклад, існують дані, що свідчать про кореляцію проліферативної активності культур з їхніми морфологічними особливостями [161, 162]. У комплексі з іншими показниками, наприклад, проліферацією, вона може дати більш повну картину життєдіяльності клітини у культурі. Оцінку морфології клітин у культурах *in vitro* (наприклад, виявлення клітин з атиповим фенотипом) за допомогою мікроскопії, у дослідженнях часто використовують як перший оперативний і інформативний показник стану культури.

У відомій науковій літературі до цього часу не висвітлено питання особливостей морфології неіморталізованих ліній МСК-ВС, в залежності від етапу ведення культури, та впливу умов культивування на ці показники. Оскільки в даному дослідженні було виявлено різницю у особливостях проліферації МСК-ВС, культивованих за фізіологічних концентрацій кисню та у стандартних умовах CO<sub>2</sub>-інкубатора, то наступним етапом роботи стало дослідження особливостей морфології неіморталізованих ліній МСК-ВС, на різних етапах культивування, в умовах помірної гіпоксії.

**3.4.1. Морфометричні дослідження культур МСК-ВС на різних пасажах, при фізіологічних концентраціях кисню.** В ході експерименту, морфологія культур МСК-ВС була проаналізована на трьох пасажах. На мікрофотографіях фіксованих культур, забарвлених гематоксиліном та еозином, за допомогою програми ImageJ були розраховані ЯЦС, співвідношення "ширина/довжина" і коефіцієнти варіації отриманих даних. Проведений аналіз виявив зміни у морфологічних особливостях неіморталізованих ліній МСК-ВС протягом часу культивування. Також, було

виявлено відмінності у морфології клітин та організації моношару в групах, культивованих у різних газових сумішах зі зниженим вмістом кисню (рис.3.19)

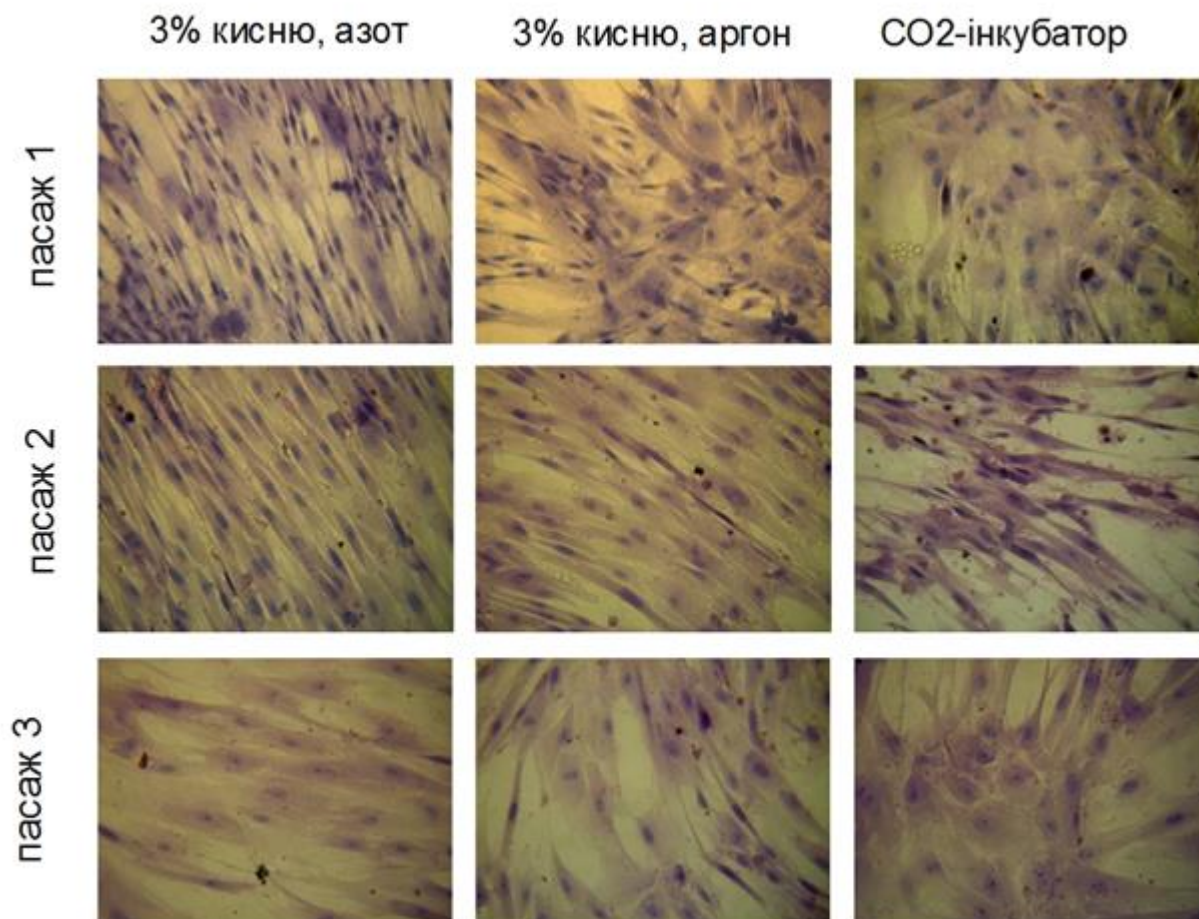


Рис 3.19. Морфологічний аналіз культур МСК-ВС. Мікрофотографії МСК-ВС, фіксація 4% розчином формаліну, забарвлення гематоксиліном та еозином (x100, збільшення камери x1,4). Варіанти умов культивування підписано на рисунку. «CO<sub>2</sub>-інкубатор»- контрольні умови CO<sub>2</sub>-інкубатора.

На рис 3.19 наведено мікрофотографії культур на 1-3 пасажах, культивованих в стандартних умовах CO<sub>2</sub> - інкубатора, і в газових сумішах, що містять 3% кисню, на основі азоту і аргону.

Відомо, що характерною ознакою і нормою для МСК з різних джерел, в тому числі і МСК-ВС, є фібробластоподібна морфологія і веретеновидна форма [162]. У нашому дослідженні у культурах на всіх пасажах такий

морфологічний тип був домінуючим. Культури на першому та другому пасажах, згідно попереднього візуального спостереження, практично повністю склалися з клітин "класичного" типу. Але варто підкреслити, що клітини на третьому пасажі в усіх експериментальних групах (як контрольної, так і культивованих в умовах помірної гіпоксії) характеризувався появою клітин з атипичним фенотипом. Ці клітини мали більші розміри, і так звану «розпластану» форму: «полюса» веретена слабо виражені, співвідношення ширини клітини до її довжини більш високе. Хоча в даному експерименті не спостерігалася характерна для старіючих клітин поява значної кількості вакуолей в цитоплазмі, згідно літературними даними, такий фенотип можна вважати "старіючим". Найбільш вираженими такі зміни були в контрольній групі, тобто при концентрації кисню, яка практично дорівнювала атмосферній .

Для більш точної оцінки морфології культур МСК-ВС були проведені морфометричні дослідження: визначено ЯЦС і співвідношення "ширина / довжина" для кожної клітини. Точкові діаграми, представлені на рис. 3.20, ілюструють розподіл клітин з різних умов культивування за цими двома параметрами.

Морфометрична оцінка культур за цими параметрами дозволила зробити два висновки. По-перше, показано, що ступінь гетерогенності за морфометричними показниками відрізнявся у МСК-ВС, що перебували на різних пасажах. Незалежно від умов культивування, найвищий рівень морфологічної гомогенності можна було спостерігати у культурах на другому пасажі. По-друге, було виявлено вплив фізіологічних концентрацій кисню на рівень морфологічної гетерогенності культур МСК-ВС. В цілому, МСК-ВС, культивовані в газових сумішах при 3% кисню, були менш гетерогенними, ніж культури в стандартних умовах  $\text{CO}_2$  - інкубатора. Варто зауважити, на третьому пасажі, коли у культурах стали з'являтися клітини зі "старіючим" фенотипом, їхня кількість у популяціях, культивованих при 3% кисню (в обох газових сумішах), була меншою, ніж у культурах зі стандартних умов  $\text{CO}_2$ -

інкубатора.

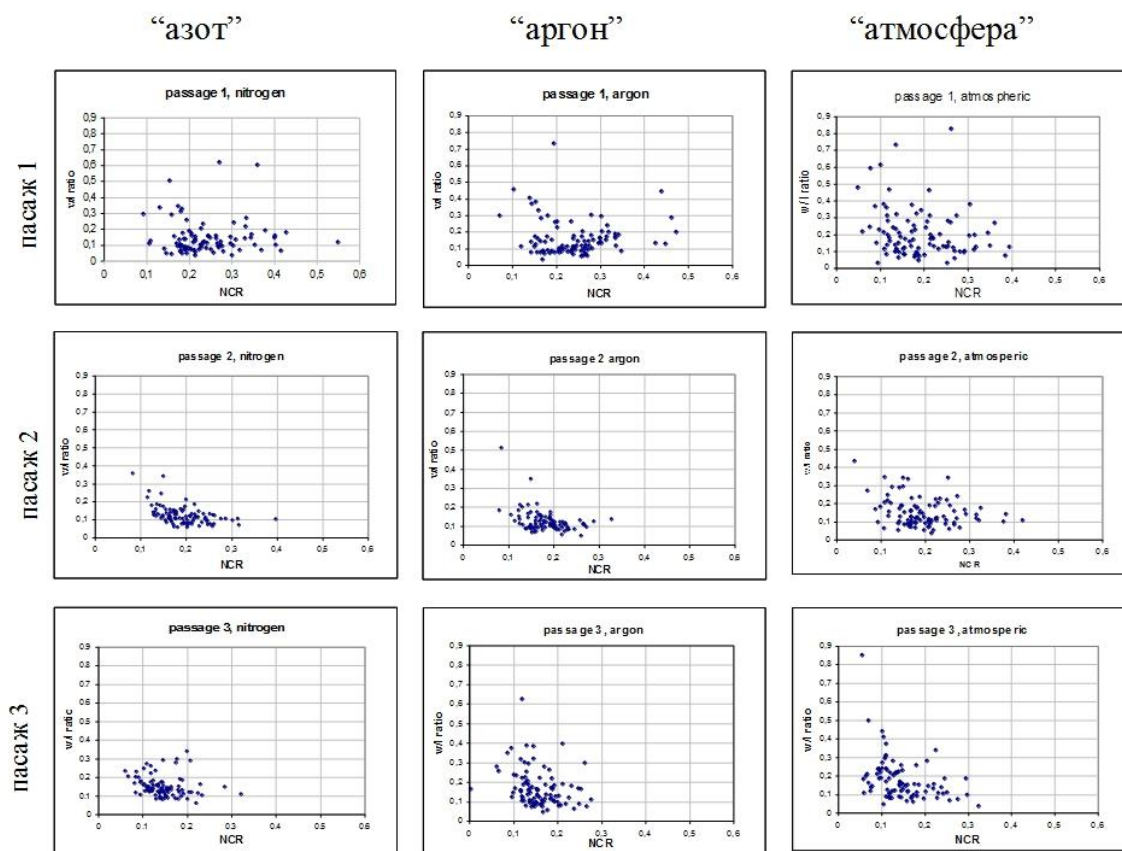


Рис 3.20. Аналіз морфології. ЯЦС і співвідношення «ширина / довжина» МСК, культивованих в газових сумішах на основі азоту і на основі аргону, на різних пасажах.

Найбільш морфологічно однорідними були МСК, культивовані в суміші на основі азоту. Найвищий рівень гетерогенності в культурі спостерігали при атмосферному вмісті кисню.

На рис 3.21. представлені коефіцієнти варіації – показники, що ілюструють значення дисперсії в популяціях, окремо для ЯЦС і співвідношення «ширина / довжина». Вони додатково характеризують ступінь варіабельності ЯЦС і «ш/д» клітин в популяціях. Найбільшою мірою гомогенності як за формою, так і за співвідношенням ЯЦС, відрізнялися культури в газових складах з низьким вмістом кисню.

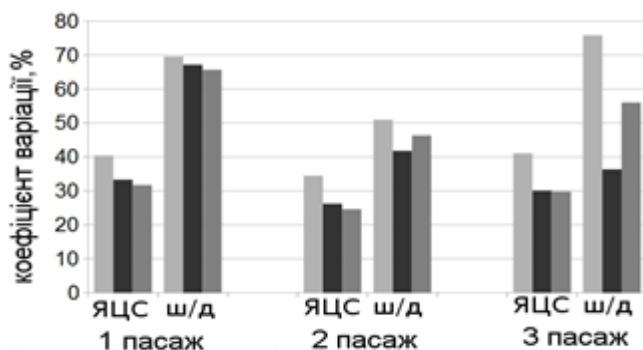


Рис. 3.21. Коефіцієнти варіації в культурах МСК-ВС, 1-3 пасажі: ■ в CO<sub>2</sub>-інкубаторі, ■- в газовій суміші на основі азоту (кисень - 3%, вуглекислий газ - 4%, азот - 93%), ■ - в газовій суміші на основі аргону (кисень - 3%, вуглекислий газ - 4%, аргон — 93%)

Найбільш однорідними за формою, так і за співвідношенням ЯЦС були культури з сумішей на основі азоту.

**3.4.2. Оцінка процесів старіння у культурах МСК-ВС.** З метою перевірки, чи можна вважати клітини з "розпластаною" формою старіючимим, і чи свідчить їхня поява про процеси старіння у культурах МСК-ВС, було проведено подальші дослідження, оцінено активність асоційованої зі старінням бета-галактозидази (SA-β-gal) у культурах МСК-ВС на третьому пассажі, в стандартних умовах CO<sub>2</sub>-інкубатора, та описаних вище газових сумішах, що містять 3% кисню. Одночасно з оцінкою активності SA-β-gal було підраховано кількість клітин з "ропластаною" формою, що у наших досліджень, згідно спостережень, гіпотетично вважалась "старіючим" фенотипом в наших дослідах: коефіцієнтом "ш\д" більше 0,35 і ЯЦС менше 0,3. У трьох незалежних дослідах було показано значну гетерогенність у активності SA-β-gal. Відмінності в інтенсивності характерного синього забарвлення цитоплазми спостерігали як у різних дослідах, так і в одному досліді, в одній групі (рис 3.22).



Рис 3.22. Мікрофотографії МСК-ВС (x100, збільшення камери x1,4), тест на активність асоційованої зі старінням бета-галактозидази (SA-β-gal): *a* - в CO<sub>2</sub>-інкубаторі, *б* - в газовій суміші на основі азоту (кисень - 3%, вуглекислий газ - 4%, азот - 93%), *в* - в газовій суміші на основі аргону (кисень - 3%, вуглекислий газ - 4%, аргон — 93%)

Результати підрахунків представлено на рис. 3.23.

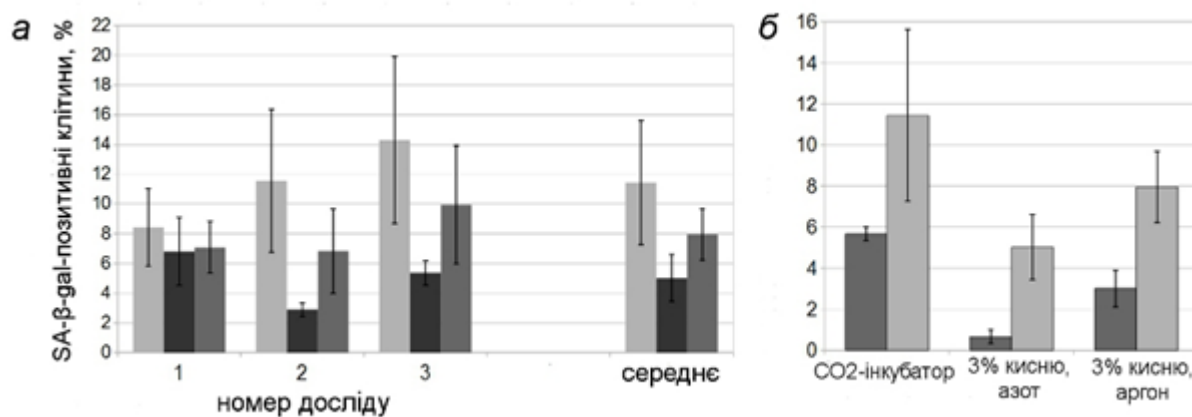


Рис 3.23. *a* - активність SA-β-gal в культурах МСК-ВС, 3 пасаж, дані представлені як відсотки ± середнє квадратичне відхилення: ■ в CO<sub>2</sub>-інкубаторі, ■- газова суміш на основі азоту (кисень - 3%, вуглекислий газ - 4%, азот - 93%), ■ газова суміш на основі аргону (кисень - 3%, вуглекислий газ - 4%, аргон — 93%); *б* - ■ відсоток МСК-ВС з "розпластаною формою" ■ відсоток клітин з вираженою активністю SA-β-gal, у групах, культивованих в умовах CO<sub>2</sub>-інкубатора, та газових сумішах на основі азоту (кисень - 3%, вуглекислий газ - 4%, азот - 93%) та аргону (кисень - 3%, вуглекислий газ - 4%, аргон — 93%)

Можна було визначити певну закономірність. У групах, культивованих при 3% кисню, в суміші на основі азоту, рівень активності SA- $\beta$ -gal був найнижчим, і розбіжність між показниками всередині одного варіанту була найменш вираженою (в середньому по дослідах  $5,02 \pm 1,58\%$ ). У групах, культивованих у суміші на основі аргону, в цілому рівень активності був меншим, ніж в контрольній групі: в середньому по дослідах,  $7,95 \pm 1,73\%$  в групах із суміші на основі аргону і  $11,43 \pm 4,18\%$  в умовах CO<sub>2</sub>-інкубатора. Також, в культурах визначали відсоток клітин з "розпластаною" формою. На рис 3.23.б. наведено середні значення порівняння кількості клітин, що мають розпластану форму та клітин, що мають характерне синє забарвлення, яке свідчить про активність SA- $\beta$ -gal. Було виявлено, що відсоток МСК-ВС, у яких спостерігали високу активність SA- $\beta$ -gal, у всіх варіантах був вищим за процент клітин з "розпластаною" формою. Також, було встановлено, що найнижчі проценти обох показників спостерігались у групах МСК-ВС, культивованих при 3% кисню, в суміші на основі азоту. Показники культур із сумішей на основі аргону також були нижчими, ніж в умовах CO<sub>2</sub>-інкубатора, але характеризувались значною гетерогенністю в середині груп.

Можна зробити висновок, що культивування в суміші на основі азоту сприяло запобіганню процесам старіння в культурах МСК-ВС.

#### **Висновки до підрозділу 3.4.**

Показано, що при культивуванні МСК-ВС змінюється. Було виявлено, що найбільшим ступенем гомогенності характеризуються культури на другому пасажі. Було встановлено, що на третьому пасажі можна спостерігати появу МСК із фенотипом, типовим для старіючих клітин, що характеризуються підвищеною активністю асоційованої зі старінням бета-галактозидази. Було показано, що культивування в умовах помірної гіпоксії, впливає на морфологічні особливості культур МСК-ВС, оскільки на всіх досліджених пасажах МСК-ВС, культивовані в газових сумішах, що містили 3% кисню, на основі азоту та аргону, були більш гомогенними за

морфологією та містили меншу кількість клітин зі старіючим фенотипом, у порівнянні з культурами зі стандартних умов CO<sub>2</sub>-інкубатора. Ефекти сумішей відрізнялись: в суміші на основі азоту кількість МСК-ВС із фенотипом, характерним для старіючих клітин, була нижчою.

### **Результати, викладені у підрозділі, опубліковано у працях**

1. **Shuvalova N.**, Kordium V. Morphological characteristics of mesenchymal stem cells from Wharton jelly, cultivated under physiological oxygen tensions, in various gas mixtures // Biopolym. Cell. - 2016. - Vol. 32. №4. - P. 262–270

2. **Shuvalova N.**, Deryabina O., Kordium V. Cultivation of human mesenchymal stem cells from umbilical cord matrix under physiological oxygen tensions // The 4th international IMBG conference for young scientists “Molecular biology: advances and perspectives” abstract book – 2011. - P. - 176

3. **Shuvalova Nadiia**, Deryabina Olena, Kordium Vitalii. Cultivation of human MSC from umbilical cord using various gas mixtures // Materials of 7th Annual Congress of the German Society for Stem Cell Research, associated with Fraunhofer Life Sciences Symposium Abstract book. - Germany, Leipzig, Nov 2012. - P. 112



### 3.5. Оптимізація трансфекції МСК за допомогою культивування в умовах помірної гіпоксії

В попередніх розділах ми показали, що умови помірної гіпоксії підвищують ефективність отримання первинних культур МСК-ВС, та мають позитивний вплив на проліферативні властивості культур МСК-ВС в процесі пасування, а також на збереження нормальної морфології при довготривалому культивуванні. Оскільки відомо, що культивування за фізіологічних концентрацій кисню здатне підвищити рівень синтезу та експресію ряду цитокінів, що відіграють важливу роль у процесах виживання, та мають протиапоптичні ефекти [163,164], виникло питання, чи можливо використати культивування при фізіологічних концентраціях кисню як спосіб оптимізації модифікації культур МСК, з метою покращення їх терапевтичного потенціалу.

Одним із перспективних методів, що дозволяє підвищити рівень експресії терапевтично значущих молекул і паракринних факторів для МСК - це трансфекція цільовими генами за допомогою різноманітних вірусних та невірусних конструкцій [165,166]. Невірусні вектори є оптимальними для випадків, коли постійна експресія цільового продукту не є обов'язковою. Проте, основним недоліком цих методів є низька ефективність трансдукції [167]. Тому наступним етапом даної роботи стала розробка та перевірка ефективності оптимізації невірусної трансфекції МСК-ВС за допомогою умов помірної гіпоксії.

Експерименти проводили на культурах МСК-ВС що перебували на другому пасажі, оскільки наші попередні дослідження показали, що на другому пасажі клітини зберігають високу проліферативну активність, і їхня морфологія є найбільш гомогенною, без ознак старіння.

МСК-ВС було культивовано 48 годин в різних газових сумішах: на основі азоту (кисень - 3%, CO<sub>2</sub> - 5%, азот - 92%), і на основі аргону (кисень - 3%, CO<sub>2</sub> - 5%, аргон - 92%). Контрольну групу клітин тримали в стандартних

умовах  $\text{CO}_2$  - інкубатора (атмосферна концентрація кисню,  $\text{CO}_2$  - 5%). Після 48 годин культивування клітини було трансфіковано нанорозмірними поліплексами pEGFP-C1/PEI та pEGFP-C1/TurboFect, що містили 3 мкг плазмідної ДНК та 6 мкг PEI, у ваговому співвідношенні ДНК: полікатіонний носій як 1:2. Культури перебували в контакті з комплексами приблизно 1 годину, в умовах  $\text{CO}_2$  - інкубатора. Після чого дослідні культури було культивовано в зазначених вище газових сумішах (при 3% кисню), а контрольну - в умовах  $\text{CO}_2$ - інкубатора. Ефективність трансфекції оцінювали за допомогою проточної цитофлюориметрії, як кількість флюоресцентних клітин, що експресують eGFP.

Флюоресценцію в культурах, що пройшли процедуру трансфекції, можна було спостерігати вже через 24 години після трансфекції. Спостереження за культурами показало, що найбільшу інтенсивність флюоресценції візуально можна спостерігати через 48 годин (рис 3.24).



Рис 3.24. Флюоресценція в культурі МСК-ВС, 48 годин після трансфекції,  $\times 100$ , збільшення камери  $\times 1,4$

Тому через 48 годин, шляхом проточної цитофлюориметрії, за допомогою проточного цитофлюориметру BD FACSAria визначали загальну інтенсивність флюоресценції і відсоток трансфікованих клітин. Крім того, для більш детальної оцінки ефективності методу також було оцінено та враховано особливості морфології культур через 48 годин після трансфекції, а саме наявність клітин з атиповою морфологією, наявність мертвих клітин та

дебрису як ознаку токсичної дії трансфікуючої суміші. Також, за допомогою проточної цитофлюориметрії, було визначено відсоток живих клітин.

Всього було проведено сім незалежних дослідів, з використанням культур, отриманих від різних донорів, з яких у п'яти випадках в якості полікатіонного носія використовували ПЕІ, а в двох - комерційний препарат TurboFect.

При проведенні спостережень за культурами за допомогою світлової мікроскопії (інвертований мікроскоп) не було виявлено виражених відмінностей між клітинами в контрольній та експериментальних групах протягом всього часу культивування після процедури трансфекції. Через 48 годин, культури, в цілому, демонстрували характерну для них організацію моношару та зберігали нормальні морфологічні характеристики (веретеноподібну форму), незважаючи на наявність незначної "зернистості" (появи дрібних вакуолей) та потемніння цитоплазми в деяких клітинах, що може свідчити про незначну токсичність трансфікуючої суміші (рис 3.25).

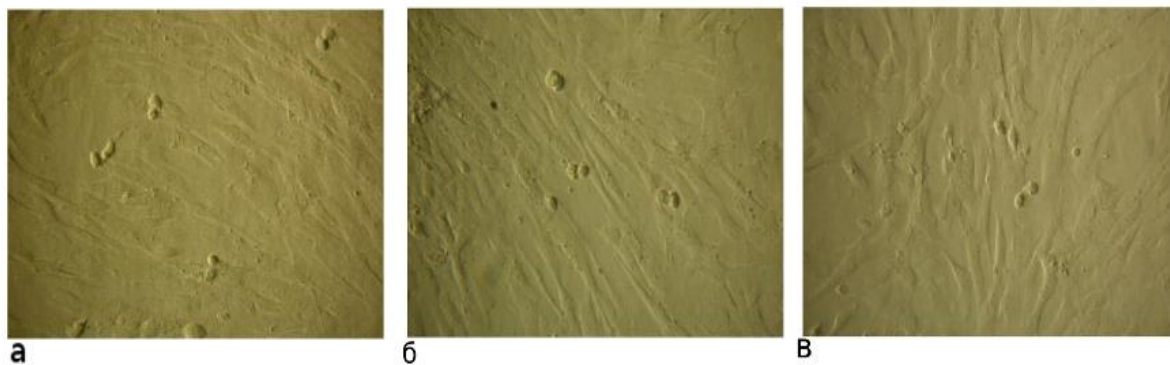


Рис 3.25. Культури МСК-ВС, 48 годин після трансфекції. а - умови  $\text{CO}_2$  - інкубатора; б - суміш на основі азоту (кисень - 3%,  $\text{CO}_2$  -- 5%, азот - 92%). в - суміш на основі аргону (кисень - 3%,  $\text{CO}_2$  - 5%, аргон - 92%). x100, збільшення камери x1,4.

Ефективність трансфекції визначали, як відсоток флюоресціюючих, тобто eGFP-позитивних клітин.

Варто зауважити, що ефективність трансфекції значно варіювала в

різних дослідах. Наприклад, на рис 3.26.а показано ефективність трансфекції (відсоток трансфікованих клітин, визначений за допомогою проточної цитофлюориметрії) в дослідах з ПЕІ, в на рис 3.26.б - в дослідах з TurboFest.

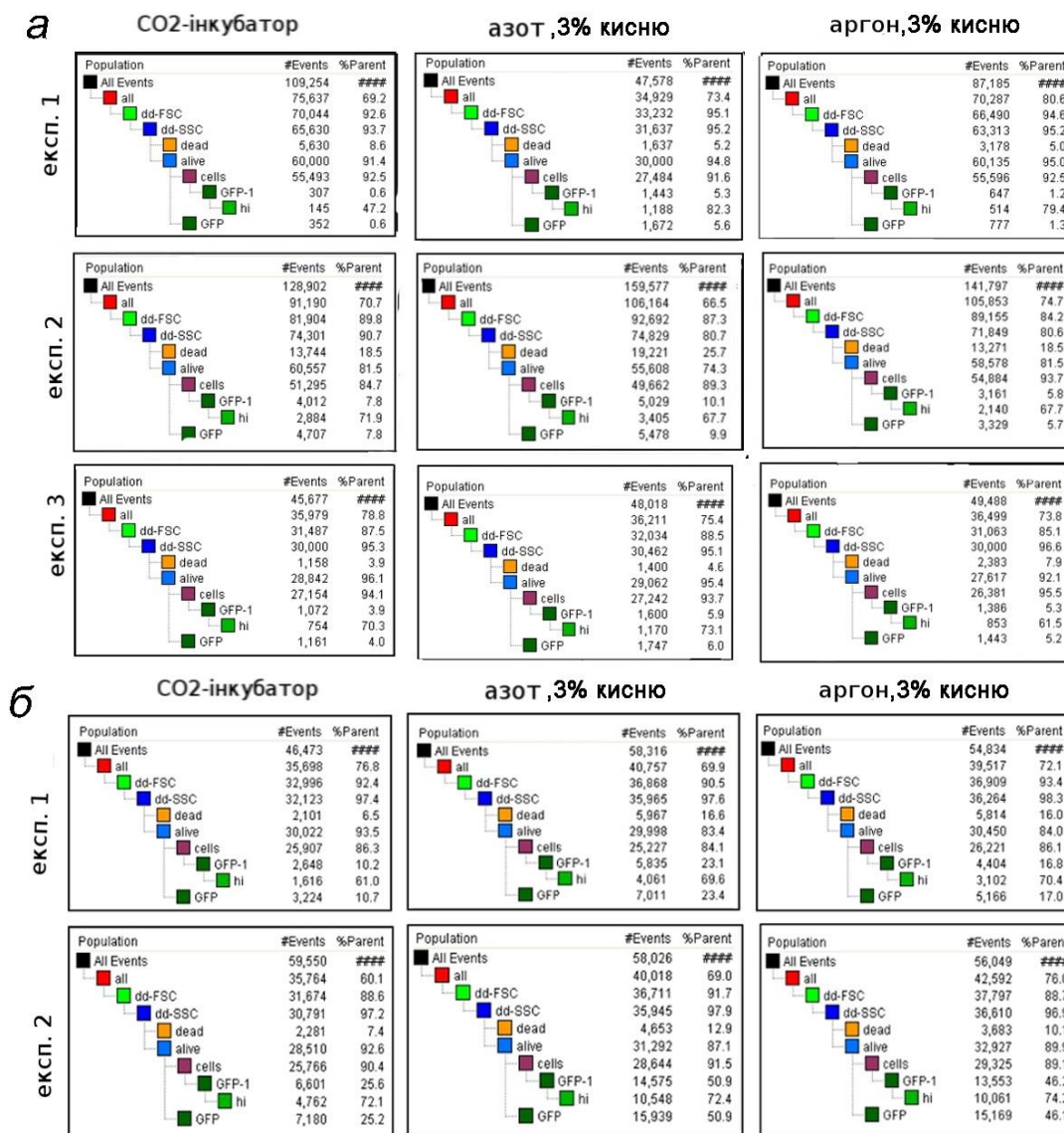


Рис 3.26. Ефективність трансфекції. а - експерименти, проведені з ПЕІ, проточна цитофлюориметрія (BD-FACS Aria). б - експерименти, проведені з TurboFest. "CO<sub>2</sub>-інкубатор"- умови CO<sub>2</sub>-інкубатора (атмосферна концентрація кисню, 20%, (атмосферна концентрація кисню, CO<sub>2</sub> --5% ), "азот"- газова суміш на основі азоту (кисень - 3%, CO<sub>2</sub> - 5%, азот - 92%), "аргон" - газова суміш на основі аргону (кисень - 3%, CO<sub>2</sub> - 5%, аргон - 92%).

Таким чином, було з'ясовано, що, у всіх дослідах, у суміші на основі

азоту, процент трансфікованих МСК-ВС був більшим, ніж в контрольній групі, яку було культивовано в стандартних умовах CO<sub>2</sub> -інкубатора. Щодо культур МСК-ВС, які було культивовано в суміші на основі аргону, у 5 із 7 дослідів відсоток трансфікованих клітин у них виявився вищим, ніж у групах з CO<sub>2</sub> -інкубатора, хоча статистичний аналіз не показав значущої різниці між ними та культурами з контрольною групою.

Оскільки метою даної роботи було оцінити ефект помірної гіпоксії на результат трансфекції, було також підраховано співвідношення між процентом eGFP-позитивних клітин в експериментальних групах та цим показником у контрольній групі. Результати наведено в табл. 3.8.

Таблиця 3.8

**Співвідношення між процентами eGFP-позитивних клітин в контрольній та експериментальних групах**

Номер досліджу	CO <sub>2</sub> -інкубатор (20% кисню)	суміш на основі азоту (3% кисню)	суміш на основі аргону (3% кисню)
1	1	8,83	2,16
2	1	1,26	0,74
3	1	1,01	1,05
4	1	2,26	1,64
5	1	1,98	1,8
6	1	1,21	0,83
7	1	1,51	1,35

Культивування в суміші на основі азоту значно підвищувало ефективність трансфекції. У суміші на основі аргону також спостерігалось підвищення відсотку eGFP-позитивних клітин, порівняно з контролем, але цей ефект був менш вираженим, ніж в суміші на основі азоту. Що цікаво, наші попередні дослідження показали позитивний вплив суміші на основі аргону на проліферативний потенціал і морфологію МСК-ВС, яка лише незначно

відрізнялося від суміші на основі азоту.

У середньому по всіх дослідах, відсоток eGFP-позитивних клітин, був більшим в середньому у 2,58 в суміші на основі азоту, та 1,37 рази в суміші на основі аргону (рис 3.27).

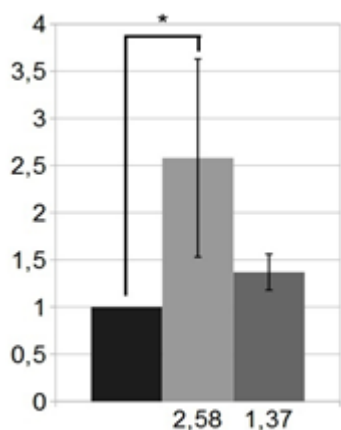


Рис. 3.27. Співвідношення між процентами eGFP-позитивних клітин в контрольній та експериментальних групах: ■ в CO<sub>2</sub>-інкубаторі, ■- в газовій суміші на основі азоту (кисень - 3%, вуглекислий газ - 4%, азот - 93%), ■ в газовій суміші на основі аргону (кисень - 3%, вуглекислий газ - 4%, аргон — 93%), дані наведено як середнє ± середнє квадратичне відхилення, n=7; різниця з контролем достовірна, \*p < 0.05

Аналіз кількості живих і мертвих клітин у кожному зразку, виконаний з допомогою проточного цитофлюориметрів BD FACSAria, показав, що відмінності між відсотком живих і мертвих клітин у різних групах були незначними. В середньому, процент живих клітин після 48 годин після трансфекції сягав 89,6±5,29 % в контрольній групі (за стандартних умовах CO<sub>2</sub> інкубатора), 85,85±7,4% в суміші на основі азоту і 88,4± 5% в суміші на основі аргону.

### Висновок до підрозділу 3.5.

Результати досліджень, викладені у підрозділі, свідчать про те, що культивування у газових сумішах пряє підвищенню ефективності

трансфекції клітин культур МСК-ВС. Також, було показано, що ефекти сумішей на основі азоту та аргону відрізнялись, незважаючи на отримані раніше данні про незначні відмінності їхнього впливу на життєдіяльність культур МСК-ВС. У всіх випадках, найбільший відсоток трансфікованих клітин спостерігали у суміші на основі азоту.

### **Результати, викладені у підрозділі, опубліковано у працях**

1. **Shuvalova N.S.**, Toporova E.K., Kordium V.A. Transfection of mesenchymal stem cells at physiological oxygen concentrations // *Biopolym. Cell.* 2020. - Vol. 36, №6. P - 433-445.

2. **Шувалова Н.С.**, Топорова О.К. Біологічні властивості мезенхімальних стовбурових клітин Вартонового студня при культивуванні в газових сумішах з фізіологічними концентраціями кисню // Науково-практична конференція з міжнародною участю «Інноваційні напрями в генетичній та регенеративній медицині» 9-10 листопада 2017 р., м. Київ, Україна. - Клітинна та органна трансплантологія. 2017, Том 5. (2) Додаток.

## РОЗДІЛ 4

## УЗАГАЛЬНЕННЯ ТА АНАЛІЗ ОТРИМНИХ РЕЗУЛЬТАТІВ

Першим етапом досліджень, метою яких було вивчення впливу умов фізіологічних концентрацій кисню на культури МСК-ВС, стала оптимізація методу виділення МСК-ВС з тканини Вартонова студня (ВС), та їхнє введення в культуру *in vitro*. Було вирішено використовувати метод експлантів, оскільки з наукової літератури відомо, що культури, отримані таким чином, мають вищий рівень проліферації та секреції терапевтично значущих ростових факторів [155, 167].

У ході проведення досліджень було показано значну гетерогенність серед пупкових канатиків (ПК) - джерел ВС. Встановлено, що отримані зразки значно варіюють за діаметром поперечного перерізу канатика, щільністю та кольором студня особливостями судин та наявністю нетипових елементів будови - наприклад, "петель", утворених судинами, ділянок з надлишковою кількістю гелеподібного студню тощо.

У відомій науковій літературі, як правило, отримання МСК-ВС за допомогою метода експлантів часто є лише етапом перед основним дослідженням, і особливості методу та ВС-джерела первинної культури, не описані детально [84,111,167]. Тому порівняти наші данні щодо гетерогенності у будові ПК, і їх вплив на отримання первинних культур МСК-ВС із даними інших дослідників на даний момент неможливо. Можна лише згадати роботу Filiz et al. [156], в якій показано значну варіабельність ВС за щільністю тканини студню, і виявлену негативну залежність цієї щільності від маси плоду [156].

Варто зауважати, в ході досліджень ми встановили, що особливості будови ПК і ВС не виявляють кореляцій з кількістю та часом спостереження



перших адгезивних клітин *in vitro*, але є важливими для при обробці ПК та тканини ВС. Оскільки існують дані, що ендотеліальні прогенітори мають значний проліферативний потенціал [158], то потенційно, за умов відсутності методів відбору МСК (наприклад, проточної цитофлуорометрії) це може ускладнити отримання популяції власне МСК. Тому врахування особливостей будови ПК є важливим у процесі видалення судин для уникнення контамінації ендотеліальними прогеніторами. Оцінка експресії поверхневих маркерних білків (наявність CD 90, CD73, CD105 та відсутність CD 45 і CD34) після пасування первинної культури, отриманої в розроблений нами спосіб, показала, що у більшості зразків ці показники досягали 90%, а CD45 і CD34 практично були відсутні. Це свідчить про ефективність застосування нашої методики, оскільки у інших дослідників рівні експресії CD90, CD73, CD105 після етапу первинної культури сягали 68% [168], і CD34 і CD45 на рівні 5 і 10%, відповідно [169].

Врахувавши виявлені особливості, вдалось розробити універсальний протокол отримання МСК з ВС, який в подальшому було застосовано для отримання МСК-ВС для усіх наступних досліджень. Було використано декілька оптимізацій. По-перше, різні дослідження вважають оптимальним різний розмір фрагментів ВС- від 1 см [76] до 1-2 мм [157,170]. Згідно логічних міркувань, найкращим рішенням, що полегшує вихід клітин з тканини студню, є механічне розділення на якомога дрібніші фрагменти, але тривалі процедури обробки можуть підвищити ризик контамінації. Згідно нашого досвіду роботи з ВС, розділення на фрагменти розмірами 3-5 мм є оптимальним для ВС будь-якої будови, оскільки не займає багато часу (приблизно 1 хв. на 1 см тканини студню) і не створює ускладнень у відмиванні фрагментів у ФСБ та при зміні культурального середовища. По-друге, інші дослідники часто використовують розчини антимикотиків при обробці тканини ВС [76,157,170]. Нами встановлено, що при використанні розробленої нами техніки, більшість випадків цього не потребує. По-третє, встановлено, що час появи клітин та їх початкова кількість значно варіює, і

перші адгезивні клітини можна спостерігати приблизно на 5-14 добу від початку інкубування фрагментів. Подібні результати узгоджуються з описаними в літературі. У роботі Hashemitabar et al. показано появу клітин на 5-8 день [171]. Зазвичай, фрагменти ВС видаляють з культури після досягнення клонами розмірів, достатніх для пасування, через 8-14 днів [170,172]. Нами ж встановлено, що фрагменти ВС можуть бути джерелом отримання клітин до 35 діб. Згідно наших результатів, отримані в різний час інкубування фрагментів клітини не відрізняються за проліферативними, морфологічними і маркерними характеристиками. При цьому, в ході досліджень нами відстежено і описано "поведінку" фрагментів Вартонова студня при тривалому інкубуванні, а саме феномен "стискання" і набуття округлої форми. У проаналізованій літературі подібних даних не знайдено, лише в роботі Tsagis et al. наведено мікрофотографію фрагмента ВС при тривалому культивуванні, яка свідчить про те, що, можливо, інші дослідники спостерігали подібне явище, але не приділили йому належної уваги [168].

Узагальнюючи численні спостереження за різним донорським матеріалом ВС, нами встановлено, що кількість клітин первинної культури, яку можна було отримати після першого пасування, сягала 50-300 тисяч клітин з культурального флакону 25 см<sup>2</sup>, що відповідає  $2 \times 10^4$  та  $12 \times 10^5$  на см<sup>2</sup>. Варто зауважити, при оцінюванні за допомогою ферментативних методів вихідної кількості клітин у тканині ВС, інші дослідники часто використовують поняття "кількість клітин на см пупкового канатика" [168]. З літературних джерел відомі дуже різні дані: від  $1 \times 10^3$  клітин на см ПК [169] до  $0,95 \times 10^6$  на см ПК [157,168]. Втім, варто зауважити, останні цифри означають підрахунок всіх живих клітин, з яких МСК виявилось 68,4%. Виявлена нами значна гетерогенність ПК за діаметром, і за кількістю та часом формування клонів первинної культури, не дозволяє точно порівняти результати наших досліджень з роботами, в яких підраховували нативну кількість клітин у тканині ВС.

Застосування розробленого нами протоколу, в якому використовувалась можливість перенесення фрагментів ВС на нові флакони впродовж 30 днів після обробки, дозволяє отримати декілька генерацій первинної культури. В загальному, з пупковго канатика розміром 5 см можна було отримати до 10 млн МСК-ВС "нульового" пасажу.

Наступним етапом роботи стало отримання первинних культур МСК-ВС за умов помірної гіпоксії, та вивчення деяких особливостей їхньої життєдіяльності. Враховуючи потенційну нерівномірність розташування в тканині ВС, ми розробили схему відбору фрагментів ВС з різних частин ПК. Відібрані за цією схемою фрагменти ВС з контрольних груп було культивовано в стандартних умовах CO<sub>2</sub>-інкубатора, а фрагменти ВС з експериментальної групи - в газовій суміші, що містила 3% кисню, 5% вуглекислого газу та 92% азоту. Отримані результати свідчать, що кількість та розмір колоній клітин після 17 днів інкубування при 3% кисню були більшими, ніж в контрольній групі. Клітини в колоніях мали характерну для МСК веретеноподібну форму. При оцінюванні експресії поверхневих маркерних білків було встановлено, що вони відповідають критеріям МСК.

З літератури відомо позитивний ефект знижених, порівняно з атмосферною, концентрацій кисню, зокрема, умови фізіологічних концентрацій кисню підвищують міграційну здатність МСК [137]. На жаль, досі не з'ясовано, чи відбувається вихід клітин з фрагментів ВС активно, чи ми спостерігаємо пасивне "випадіння" клітин при деградації сполучнотканинних елементів ВС. Подальші дослідження цього питання можуть показати, який саме з механізмів відіграє більшу роль у факті наявності більшої кількості клітин у популяціях, культивованих при фізіологічних концентраціях кисню.

Цікавими виявились результати МТТ-тесту, проведеного для культур, що перебували в умовах помірної гіпоксії, після перенесення їх у стандартні умови CO<sub>2</sub>-інкубатора. Оцінка інтенсивності утворення формагану показала, що оптична щільність відрізнялись у трьох незалежних дослідах, в яких

використовувався матеріал від різних донорів. У двох із трьох донорів інтенсивність утворення формагану була вищою у культур з гіпоксичних умов. При цьому, кількість клітин у цих культурах була більшою, порівнянно до контрольних умов. Щоправда, у одному з варіантів, показник оптичної щільності був практично однаковим з контролем.

МТТ тест є загальновизнаним показником інтенсивності метаболічних процесів клітин. В науковій літературі існують дуже різні дані щодо показників МТТ-тесту для різних типів МСК, культивованих в умовах помірної гіпоксії, та так званої "ішемії" *in vitro*, як часто називають 1% кисню або безкисневу газову суміш. Так, в роботі Zhang et al., МСК, прекодиціоновані 24 години в гіпоксичних умовах, після 24 год ішемії і 1 години МТТ тесту мали приктично такий же рівень метаболічної активності, як і інтактні клітини. В тому ж досліді, 6 годин повної аонксії призвели лише до 50% зниження активності МТТ [173]. Для МСК пуповинної крові культивування при 2,2% кисню впродовж 48 год підвищувало інтесивність утворення формагану, впродовж 72 годин - знижувало [174]. У роботі Wisel et al. показано, що після 24 годин прекодиціонування МСК-КМ щурів при 2% кисню було призводило до незначного зниження рівня інтенсивності забарвлення [175]. У дослідях Roemeling-van Rhijn спостерігалось незначне підвищення у інтенсивності забарвлення МТТ при інкубування МСК з жирової тканини при 1% кисню [176]. Також показано невелике підвищення інтенсивності утворення формагану для МСК з кісткового мозку щурів, культивованих при 3% кисню [177].

З літератури відомо досить мало даних щодо інтенсивності дихання клітин в умовах помірної гіпоксії. Деякі роботи з вимірювання концентрації кисню в культуральному середовищі показали лише незначне зниження його утилізації клітинами в умовах помірної гіпоксії, у порівнянні зі стандартними умовами CO<sub>2</sub>-інкубатора [111, 178]. Враховуючи, що початкова концентрація кисню у ВС нам невідома, але гіпотетично, з розрахунків, дуже низька, вірогідно, первинні культури МСК-ВС, культивовані при 3% кисню,

фактично не "зустрічались" з умовами атмосферної концентрації і не мали необхідності адаптувати метаболізм спочатку до гіпероксичних умов, потім знову до "гіпоксії". Тому ми застосували МТТ-тест як експериментальний, попередньо витримавши культури з експериментальних та контрольних груп в однакових умовах CO<sub>2</sub>-інкубатора. Можливо, що виявлена гетерогенність у результатах є наслідком різного характеру зміни інтенсивності метаболічних процесів у культурах, отриманих від різних донорів і є проявом індивідуальних особливостей культур. Виявлений феномен потребує подальших досліджень.

Наступним етапом даної роботи було визначення особливостей проліферації неіморталізованих ліній МСК-ВС за умов помірної гіпоксії. Виявлено, що при культивуванні МСК-ВС культури при 3% кисню (в умовах помірної гіпоксії) на 1-5 досліджених пасажах мали вищий рівень проліферації, ніж в стандартних умовах CO<sub>2</sub>-інкубатора. Виявлений позитивний ефект помірної гіпоксії добре узгоджується з відомим з літератури даними. Втім у наших дослідах різниця між проліферативною активністю за умов помірної гіпоксії і контрольних умов була дещо менш вираженою, ніж у роботах Nekanti et al. при 3% кисню та в Drela et al. при 5% , що може бути пов'язане з використанням інших середовищ та початкової щільності посіву [20,22,23]. Варто також звернути увагу на інші відмінності. Наприклад, у роботі Basciano et al. було показане сповільнення зростання культури на ранніх пасажах [84]. Подібного ефекту ми не спостерігали в жодному експерименті. В одному з дослідів Ren et al. були помічені морфологічні ознаки прискореного старіння культури, імовірно пов'язані з великою кількістю поділів, які проходять МСК в умовах гіпоксії [125]. В наших експериментах ми не спостерігали подібного ефекту.

Вважається, що існує кілька потенційних механізмів, які є причиною більш високих рівнів проліферації МСК за умов помірної гіпоксії. По-перше, одним з основних джерел пошкодження ДНК є реактивні форми кисню [85]. Відомо, що з починаючи з другого пасажу, у культурах можуть

накопичуватися пошкодження генетичного апарату. Умови помірної гіпоксії можуть запобігати цим процесам [127], що може бути особливо важливо при тривалому культивуванні. По-друге, існують дані, що гіпоксичні умови підвищують рівень експресії рецепторів цитокінів, а також продукцію ростових факторів у МСК різного походження [162,179]. В такому випадку гіпоксія може "сенсibiliзувати" клітини до ростових факторів, які присутні в сироватці і синтезуються самими клітинами [180]. По-третє, гіпоксія активує сигнальні каскади виживання клітин. Згідно літературним даним, у культурах за умов фізіологічних концентрацій кисню спостерігається менша кількість клітин, що загинули шляхом некрозу [181]. Кожен з цих механізмів може вносити певний «внесок» в ефект фізіологічних концентрацій кисню.

Літературні дані щодо впливу інертних газів (зокрема, аргону) на життєдіяльність культур клітин є досить обмеженими і мають фрагментарний характер. З нечисленних публікацій, присвячених безпосередньо ефектів впливу інертних газів (ксенону і аргону) на культури клітин нервової тканини, відомо про цитопротективну дію. Моделювання ішемічних і травматичних ушкоджень культури зрізу гіпокампу при обробці газовими сумішами, що містять різні концентрації аргону (25, 50, 74%), з атмосферним вмістом кисню (21%), показало менший рівень загибелі клітин [24]. Механізми, які забезпечують такий ефект, не досліджені. Тільки в одній з робіт, в первинних культурах нейронів і астроцитів ембріонів миші, культивованих в газовій суміші з атмосферною концентрацією кисню (21%), яка містила 50% аргону, було показано активацію кінази ERK 1 - ферменту, що грає важливу роль в процесах проліферації і виживання клітин [147]. Можливо, для МСК також характерні аналогічні механізми. У нашій роботі рівень проліферації МСК, культивованих в суміші на основі аргону був вище, ніж у МСК зі стандартних умов, але поступався показниками для культур з суміші на основі азоту. Пояснення цього ефекту вимагає додаткових досліджень. Слід зазначити, що при існуючій різноманітності протоколів культивування МСК, при використанні іншої схеми пасування культури

ефект аргону, можливо, буде відрізнятися від отриманого нами.

Також, нами перевірено ефекти умов фізіологічних концентрацій кисню на культури МСК-ВС, отриманих шляхом збереження клітин, що спонтанно відкріпились. В літературі не описані випадки отримання клонів МСК з кондиціонованого середовища, попри те, що зниження ступінь адгезії клітин до субстрату перед поділом, і можливість їхнього спонтанного відкріплення відомі [160]. Тому збереження та та мультиплікація клітин, що спонтанно відкріплюються в процесі росту адгезивної культури, може бути використаний як для додаткового отримання клонів, так і для оцінки власне клоногенного потенціалу популяції і також, потенційно, особливостей адгезії клітин у досліджуваній популяції.

На даному етапі дослідження нами було показано, що у стандартних умовах CO<sub>2</sub>-інкубатора проліферація в культурах, отриманих методом "самопересіву" (умовно названих "побічними") мала такі ж особливості, як у культурах, з яких вони походили - пасованих лише з використанням розчину трипсину і версену, і умовно названих "основними". Рівень мультиплікації МСК-ВС з кожним пасуванням знижувався для всіх варіантів, незалежно від того, з якого пасажу "основної" лінії була отримана «побічна». Варто звернути увагу, що у "побічних" лініях, відібраних з другого пасажу, зниження рівня проліферації було найбільш вираженим. Морфологічні особливості культур, отриманих методом «самопересіва» з нульового і першого пасажів? були практично ідентичними таким з «основної» лінії, тоді як «побічна» лінія з другого пасажу містила більшу кількість клітин розпластаної форми. Це дозволяє припустити, що другий пасаж, після якого проявилися помітні відмінності особливостей проліферації та морфології, в наших дослідах був свого роду "пороговим". Варто зауважити, що у роботі Widowati et al., показано, що найвищий рівень проліферативної активності спостерігався у МСК-ВС на другому пасажі [22]. Цей феномен вимагає подальших досліджень.

В нашій роботі також оцінювали проліферацію МСК-ВС, отриманих

шляхом "самопересіву", культивованих при 3% кисню, в газових сумішах на основі азоту і на основі аргону. Для культур, які з нульового пасажу були пасовані за стандартною процедурою примусового відкріплення, з використанням трипсину, найвищі рівні проліферації можна було спостерігати в культурах, вирощених в суміші на основі азоту. У той же час, для культур, отриманих з клонів спонтанно відкріплених клітин, відібраних з 0, 1 і 2 пасажів, і далі пасованих до четвертого за стандартною методикою, позитивний вплив на проліферацію був більш вираженим у суміші на основі аргону.

Підсумовуючи отримані данні, можна зробити висновок, що газові суміші з 3% кисню мали позитивний вплив на збереження потенціалу проліферації МСК-ВС. Для культур, отриманих методом "самопересіва", позитивний ефект в суміші на основі аргону був більш вираженим, що, можливо, пов'язано з подовженням загального часу культивування за рахунок "затримки" на етапі зростання клонів.

Також проведено морфометричний аналіз культур МСК-ВС на 1-3 пасажах, і більш детально охарактеризовано особливості морфології МСК-ВС, культивованих за умов фізіологічних концентрацій кисню.

Морфометрична оцінка культур за ЯЦС та коефіцієнтом «ширина\довжина» дозволила зробити такі висновки. По-перше, ступінь гетерогенності в культурах по морфометричних показників відрізнявся як між МСК-ВС на різних пасажах в однакових газових сумішах, так і між популяціями одного і того ж пасажу, культивованих у різних газових складах. Для всіх умов найвищий рівень морфологічної гомогенності можна було спостерігати на другому пасажі. По-друге, при культивуванні в сумішах зі зниженим вмістом кисню спостерігали більш низький рівень гетерогенності, ніж для культур в стандартних умовах CO<sub>2</sub>-інкубатора. Навіть на третьому пасажі, коли стали з'являтися клітини зі старіючим фенотипом, їх кількість, у порівнянні зі стандартними умовами, була помітно меншою. Найбільш однорідними були МСК, культивовані в суміші на основі азоту. Можна



припустити, що причиною таких відмінностей могла бути або селекція швидкозростаючою субпопуляції в умовах зниженої концентрації кисню, або запобігання передчасного старіння окремих клітин. Останнє було частково підтверджено вимірюванням активності бета-галактозидази, асоційованої зі старінням, яке показало, що найнижчий рівень її активності на третьому пасажі спостерігався у суміші на основі азоту.

Морфологія клітини інтегрально відображає внутрішньоклітинні фізіологічні процеси, будучи непрямим показником стану цитоскелета, і може грати роль регуляторного фактора. З літератури відомо, що умови культивування, такі, наприклад, як вибір поживних середовищ, впливають на морфологію культур і характер її зміни [75]. Це необхідно враховувати, оскільки МСК з одного джерела при використанні різних методів ведення культури можуть візуально відрізнятися. Низка робіт свідчить про вплив густоти посіву і залежною від нього форми клітин на особливості проліферації та комітування. Так, існують дані, що форма, яку МСК приймає залежно від особливостей субстрату або щільності посіву, може грати роль сигналу для диференціювання [79,80]. Для МСК було встановлено, що характерною ознакою і нормою для них є фібробластоподібна морфологія і веретеновидна форма [161]. Питання про морфологічні зміни МСК Вартонова студня в літературі практично не розглядалося, але отримані нами дані можна порівняти з особливостями морфології МСК, які спостерігали для культур МСК з інших джерел, наприклад, кісткового мозку та жирової тканини. Для них відомо, що, як правило, клітини менших розмірів і характерною веретеновидної форми мають більш високий проліферативний потенціал. Навпаки, культури, що містять клітини "розпластаної" форми, мають більш низький потенціал проліферації. Це дозволило асоціювати саме таку морфологічну особливість з ознаками процесів старіння в культурі [182].

Процес старіння МСК *in vitro* залежить від численних факторів і виявляється по-різному. Наприклад, можна спостерігати як «класичне» реплікативне, так і т. зв. передчасне, індуковане стресом, старіння. Але,

незалежно від причин, старіння, як правило, супроводжується і морфологічними ознаками: візуально спостерігають появу великих широких клітин "розпластаної" форми з вираженими волокнами і вакуолями. Деякі дослідники відзначають появу «дебріса», що утворюється внаслідок руйнування клітин [126]. З літератури відомі дуже різноманітні дані про терміни появи перших морфологічних ознак старіння в культурах. Описано культивування протягом більше 10 пасажів без ознак старіння. Також є дані про великі відсотки старіючих клітин до 7 пасажу [184]. Очевидно, це залежить від тканинного джерела клітин, індивідуальних особливостей донора [6,124] та від початкового дизайну протоколу розсіву і, вірогідно, інших, поки не врахованих, причин.

В нашій роботі, клітини «розпластаної» форми, хоча без вираженої вакуоляризації, морфологічно відповідні старіючим, стали особливо помітними на третьому пасажі, що корелювало зі зниженням рівнів проліферації і було підтверджено тестом на активність SA-w-gal. Необхідно враховувати, що у використаній схемі початкова щільність культури була достатньо невисокою, у порівнянні з відомою з літератури [181, 184] і кілька подвоєнь популяції в межах одного пасажу.

Для МСК-ВС, культивованих за умов помірної гіпоксії, при 3% O<sub>2</sub>, у сумішах на основі азоту і на основі аргону, кількість старіючих клітин, на третьому пасажі в газових сумішах було нижче, ніж у CO<sub>2</sub>-інкубаторі. При цьому в газових сумішах, порівняно з контролем, спостерігали більшу кількість подвоєнь популяції. В роботі Ren et al. було описано виражене яскраве морфологічний прояв старіння в культурі, пов'язане з великою кількістю подвоєнь [125]. Згідно наших результатів, культури з найвищою мітотичною активністю були найбільш гомогенними і за розміром, і за ЯЦС. Такий, безсумнівно, позитивний ефект, найсильніше проявився в суміші на основі азоту. Щодо залежності від концентрації O<sub>2</sub>, наші дані узгоджуються з літературним, які свідчать про позитивний вплив умов помірної гіпоксії на культури МСК [127].

В даній роботі вдалося виявити несподівано високий рівень гетерогенності культур на першому пасажі та гомогенізації морфології на другому пасажі. Слід зазначити, що при візуальному спостереженні це практично не було помітно, і виявити це явище вдалося тільки при морфометричних розрахунках. У наших дослідженнях проліферації другий пасаж був "переломним", після якого спостерігався спад проліферації. У літературі подібні ефекти описані не були. Щоправда, в роботі Angelucci та колег показано, що після другого пасажу в культурах МСК припиняється експресія ряду генів [82]. Оскільки подібного ефекту "порогового" пасажу більше ніде не описано, механізми такого явища, виявленого для МСК, вимагають подальшого вивчення. Також, показано, що рівень гетерогенності в культурах, вирощених при зниженому вмісті кисню був більш низьким, ніж за стандартних умов. Це відноситься як до ЯЦС, так і до форми клітин. Добре відома кореляція форми та розміру клітин з проліферативною активністю. У цьому зв'язку, враховуючи отримані дані про більш високі рівні проліферації МСК при 3% кисню, можна припускати, що збереження морфологічних ознак є додатковим проявом загального позитивного впливу культивування МСК-ВС за фізіологічних концентрацій кисню.

Варто зауважити, що ефект газових сумішей на основі аргону та азоту дещо відрізнявся. Гомогенізація в культурах, що ростуть в атмосфері газової суміші на основі азоту, була більш вираженою. З літератури відомо про цитопротекторний вплив інертних газів на культури нейтрального походження [24]. В нашому випадку, культивування МСК в газовій суміші на основі аргону, що містить 3% кисню, також виявило позитивний вплив на збереження морфологічного типу клітин ранніх пасажів і зниження кількості старіючих клітин порівняно до умов CO<sub>2</sub>-інкубатора. Однак, за ступенем дії суміш на основі азоту мала більш виражений ефект.

Наступним завданням даної роботи була оптимізація трансфекції МСК – ВС за допомогою умов помірної гіпоксії. Не зважаючи на актуальність розробки способів безпечної генетичної модифікації МСК, слід зазначити, що

кількість робіт, присвячені невірусним методам трансфекції МСК з використанням катіонних носіїв, є досить малою [185]. До того ж відмінності в описаних експериментах ускладнюють порівняння результатів ускладнюють аналіз літературних даних. Додатково слід зазначити, що характеристики МСК з різних тканинних джерел можуть істотно розрізнятися [55] і по низці характеристик варіювати у різних донорів [69].

Наскільки нам відомо, на даний момент ця робота є єдиною, в якій культивування при фізіологічних концентраціях кисню було використано як метод оптимізації трансфекції, і, на жаль, ми не можемо порівняти її з даними інших дослідників. Але отриманий результат - підвищену експресію маркерного білка eGFP, можна пояснити за допомогою даних, відомих про вплив умов помірної гіпоксії на культури МСК в цілому.

З літератури відомо, що ефективність трансфекції, особливо методів із використанням катіонних носіїв, для різних клітин залежить від фази клітинного циклу, і проліферативних характеристик культури [186,187]. Так, показано, що умови культивування, які інгібують поділ МСК людини, можуть знижувати ефективність трансфекції [188]. У зв'язку з цим, слід окремо згадати роботу Воуга і колег [189]. Вони показали, що щільність посіву МСК впливає на ефективність трансфекції. Як правило, у роботах, присвячених трансфекції МСК, використовують високу щільність посіву для зручності цитофлюориметричного аналізу [190, 191, 192]. В роботі Воуга було обрано щільність посіву культури (1000 і 3000 клітин на  $\text{cm}^2$ ), яка дозволяла клітинам проліферувати. Трансфекцію в даній роботі проводили через 72 години, щоб переконатися в наявності проліферативної активності в культурах. Цей результат був справедливий для МСК кісткового мозку, жирової тканини і Вартонова студня. У нашій роботі ми використовували щільність посіву (приблизно 9400 клітин на  $\text{cm}^2$ ), яка була вище щільності, зазвичай використовуваної в наших роботах для мультиплікації МСК [193]. Однак, наші спостереження за морфологією клітин і підрахунок кількості свідчать про те, що культура на момент трансфекції перебувала у стані активної

проліферації.

На сьогоднішній день відомо, що умови помірної гіпоксії підвищують кількість проліферуючих клітин в культурі [22,127], що справедливо і для МСК-ВС [23, 194]. Можливо, це пояснює більш високу ефективність трансфекції та більшу кількість клітин, що експресують маркерний ген. Згідно наших результатів, вплив газових сумішей на основі досліджуваних газів відрізнявся: суміш на основі аргону мала достовірно менш виражений ефект, ніж суміш на основі азоту. Цей феномен вимагає додаткового дослідження.

## ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі отримані нові данні стосовно впливу культивування в умовах фізіологічних концентрацій кисню у газових сумішах на основі азоту та аргону на функціональні та морфологічні характеристики МСК-ВС.

1. Розроблено схеми створення сумішей зі зниженим вмістом кисню на основі аргону та азоту, перевірено експериментальні зразки розроблених систем. Оптимізовано методичний підхід для культивування МСК-ВС у створених за допомогою систем умовах помірної гіпоксії.

2. Встановлено, що введення МСК-ВС в культуру методом експлантів за фізіологічних концентрацій кисню (3%) сприяє збільшенню кількості отриманих клітин, незалежно від особливостей тканини Вартонова студня.

3. Показано, що культивування МСК-ВС за 3% кисню, як в суміші на основі азоту, так і в суміші на основі аргону підвищує рівень проліферації МСК-ВС. Культивування у газових сумішах з фізіологічним вмістом кисню не впливає на рівень експресії поверхневих маркерів. Вперше виявлено різницю у впливі газових сумішей на основі та аргону.

4. Встановлено, що культивування МСК в газових сумішах, що містять 3% кисню, призводить до зниження гетерогенності клітинної культури в ході її пасування, і зниження кількості клітин з фенотипом, притаманним старіючим клітинам, у порівнянні з культивуванням у стандартних умовах CO<sub>2</sub>-інкубатора. Встановлено, що в суміші на основі азоту ступінь гетерогенності і кількість МСК-ВС із фенотипом, характерним для старіючих клітин, були найнижчими.

5. Вперше показано, що культивування МСК-ВС у газових сумішах зі зниженим містом кисню сприяє підвищенню ефективності трансфекції таких клітин плазмідною ДНК. Відсоток eGFP-позитивних клітин, був більшим в середньому у 2,58 в суміші на основі азоту, та 1,37 рази в суміші на основі

аргону, у порівнянні з умовами CO<sub>2</sub>-інкубатора.

6. Вперше виявлено різницю у біологічних ефектах сумішей з однаковим вмістом кисню, створених на основі азоту або аргону, на проліферативні і морфологічні особливості та ефективність невірусної трансфекції МСК-ВС.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Christodoulou I, Goulielmaki M, Devetzi M, Panagiotidis M, Koliakos G, Zoumpourlis V. Mesenchymal stem cells in preclinical cancer cytotherapy: a systematic review. *Stem Cell Res Ther.* 2018; 9:336.
2. Keshtkar S, Azarpira N, Ghahremani MH. Mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles: novel frontiers in regenerative medicine. *Stem Cell Res Ther.* 9, 63 (2018).
3. Wu P, Zhang B, Shi H, Qian H, Xu W. MSC-exosome: A novel cell-free therapy for cutaneous regeneration. *Cytotherapy.* 2018; 20(3):291-301.
4. Chen PM, Yen ML, Liu KJ. et al. Immunomodulatory properties of human adult and fetal multipotent mesenchymal stem cells. *J Biomed Sci.* 2011:18(49).
5. Koltsova AM, Krylova TA, Musorina AS, Zenin VV, Turilova VI, Yakovleva TK, et al. The dynamics of cell properties during long-term cultivation of two lines of mesenchymal stem cells derived from Wharton's jelly of human umbilical cord. *Cell and Tissue Biology.* 2018; 12:7–19.
6. Bonab MM, Alimoghaddam K, Talebian F, Ghaffari SH, Ghavamzadeh A, Nikbin B. Aging of mesenchymal stem cell in vitro. *BMC Cell Biol.* 2006;7:14.
7. Yu KR, Kang KS. Aging-related genes in mesenchymal stem cells: a mini-review. *Gerontology.* 2013;59:557–563.
8. Estrada JC, Torres Y, Benguría A, Dopazo A, Roche E, Carrera-Quintanar L, Pérez R A, Enríquez JA, Torres R, Ramírez JC, Samper E, Bernad A. Human mesenchymal stem cell-replicative senescence and oxidative stress are closely linked to aneuploidy. *Cell Death & Disease.* 2013; 4:e691.
9. Yang YHK, Ogando CR, Wang See C, Chang TY, Barabino GA. Changes in phenotype and differentiation potential of human mesenchymal stem cells aging in vitro. *Stem Cell Research & Therapy.* 2018; 9: 131.
10. Mas-Bargues C, Sanz-Ros J, Román-Domínguez A, Inglés M, Gimeno-Mallench L, El Alami M, et al. Relevance of oxygen concentration in stem cell



culture for regenerative medicine. *International Journal of Molecular Sciences*. 2019; 20(5):1195

11. Choo KB, Tai L, Hymavathees KS, Wong CY, Nguyen P, Huang C-J, Cheong S K, Kamaru T. Oxidative stress-induced premature senescence in Wharton's Jelly-derived mesenchymal stem cells. *Int J Med Sci*. 2014; 11(11): 1201–1207.

12. Kuilman T, Michaloglou C, Mooi WJ, Peeper DS. The essence of senescence. *Genes Dev*. 2010;24(22):2463-2479.

13. Damiani E, Brugè F, Cirilli I, et al. Modulation of Oxidative Status by Normoxia and Hypoxia on Cultures of Human Dermal Fibroblasts: How Does It Affect Cell Aging? *Oxid Med Cell Longev*. 2018;2018:5469159.

14. Lu T, Finkel T. Free radicals and senescence. *Exp Cell Res*. 2008 Jun 10;314(9):1918-22.

15. Kolf CM, Cho E, Tuan RS. Biology of adult mesenchymal stem cells: regulation of niche, self-renewal and differentiation. *Arthritis Research & Therapy*. 2007;9(204).

16. Ivanovic Z, Hermitte F, Brunet de la Grange P, Dazey B, Belloc F, Lacombe F, et al. Simultaneous maintenance of human cord blood SCID-repopulating cells and expansion of committed progenitors at low O<sub>2</sub> concentration (3%). *Stem Cells*. 2004; 22:716–724.

17. Fotia C, Massa A, Boriani F, Baldini N, Granchi D. Hypoxia enhances proliferation and stemness of human adipose-derived mesenchymal stem cells. *Cytotechnology*. 2014; 67(6):1073-84.

18. Chen L, Xu Y, Zhao J, Zhang Z, Yang R, Xie J, Liu X, Qi S. Conditioned medium from hypoxic bone marrow-derived mesenchymal stem cells enhances wound healing in mice. *PloS one*. 2014; 9(4), e96161.

19. Tsai C, Yew T, Yang D, Huang W, Hung S. Benefits of hypoxic culture on bone marrow multipotent stromal cells. *Am J Blood Res*. 2012;2(3):148-159.

20. Nekanti U, Dastidar S, Venugopal P, Totey S, Ta M. Increased proliferation and analysis of differential gene expression in human Wharton's jelly-

derived mesenchymal stromal cells under hypoxia. *International journal of biological sciences*.2010;6(5):499-512.

21. Zhao D, Liu L, Chen Q, Wang F, Li Q, Zeng Q, Huang J, Luo M, Li W, Zheng Y, Liu T. Hypoxia with Wharton's jelly mesenchymal stem cell coculture maintains stemness of umbilical cord blood-derived CD34+ cells. *Stem Cell Res Ther*. 2018 Jun 13;9(1):158.

22. Widowati W, Wijaya L, Bachtiar I, Gunanegara RF, Sugeng SU, Irawan YA, et al. Effect of oxygen tension on proliferation and characteristics of Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells. *Biomarkers and Genomic Medicine*. 2014; 6:43e48.

23. Drela K, Sarnowska A, Siedlecka P, Szablowska-Gadomska I, Wielgos M, Jurga M, Lukomska B, Domanska-Janik K. Low oxygen atmosphere facilitates proliferation and maintains undifferentiated state of umbilical cord mesenchymal stem cells in an hypoxia inducible factor-dependent manner. *Cytotherapy*. 2014; 16(7):881 - 892.

24. Loetscher PD, Rossaint J, Rossaint R, Weis J, Fries M, Fahlenkamp A, Ryang YM, Grottke O, Coburn M. Argon: neuroprotection in in vitro models of cerebral ischemia and traumatic brain injury. *Crit Care*. 2009;13(6):R206.

25. Hass R, Kasper C, Böhm S, Jacobs R. Different populations and sources of human mesenchymal stem cells (MSC): A comparison of adult and neonatal tissue-derived MSC. *Cell Communication and Signaling*. 2011; 9:12.

26. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for cellular therapy position statement. *Cytotherapy*.2006;8(4):315e7.

27. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*. 1999; 284(5411): 143-147.

28. Friedenstein AJ, Gorskaja JF, Kulagina NN. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Exp Hematol.* 1976; 4(5):267-274.
29. Friedenstein AJ, Chailakhyan RK, Gerasimov UV. Bone marrow osteogenic stem cells: in vitro cultivation and transplantation in diffusion chambers. *Cell Proliferation.* 1987. 20 (3):263–272.
30. Klimczak A, Kozłowska U. Mesenchymal stromal cells and tissue-specific progenitor cells: their role in tissue homeostasis. *Stem Cells International.* 2016; 2016: 4285215.
31. Secco M, Moreira YB, Zucconi E, Vieira NM, Jazedje T, Muotri AR, et al. Gene expression profile of mesenchymal stem cells from paired umbilical cord units: cord is different from blood. *Stem Cell Rev.* 2009; 5(4): 387–401.
32. Makino S, Fukuda K, Miyoshi S, Konishi F, Kodama H., Pan J, et al.. Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells in vitro. *J. Clin. Invest.* 1999;103:697–705.
33. Reinisch A, Etchart N, Thomas D, Hofmann NA, Fruehwirth M, Sinha S, et al. Epigenetic and in vivo comparison of diverse MSC sources reveals an endochondral signature for human hematopoietic niche formation. *Blood* 2015;125:249-260.
34. Xu W, Zhang X, Qian H, Zhu W, Sun X, Hu J, et al. Mesenchymal stem cells from adult human bone marrow differentiate into a cardiomyocyte phenotype In vitro. *Biology and Medicine.* 2004; 229(7):623–631.
35. Андреева ЕР, Буравкова ЛБ. Взаимодействие мультипотентных мезенхимальных стромальных и иммунных клеток: двунаправленные эффекты. 2012; 98 (12): 1441-1459.
36. Wei X, Yang X, Han Z, Qu F, Shao L, Shi Y. Mesenchymal stem cells: a new trend for cell therapy. *Acta Pharmacologica Sinica.* 2013;34:747–754.
37. Rohban R, Pieber TR. Mesenchymal stem and progenitor cells in regeneration: tissue specificity and regenerative potential. *Stem Cells International.* 2017: 2017:Article ID 5173732.

38. Le Blanc K, Samuelsson H, Gustafsson B, Remberger M, Sundberg B, Arvidson J, et al. Transplantation of mesenchymal stem cells to enhance engraftment of hematopoietic stem cells. *Leukemia*. 2007; 21:1733–1738.
39. Hanson SE, Bentz ML, Hematti P. Mesenchymal stem cell therapy for nonhealing cutaneous wounds. *Plast Reconstr Surg*. 2010;125(2): 510–516.
40. Hirabaru M, Kuroki T, Adachi T, Kitasato A, Ono S, Tanaka T, et al. A method for performing islet transplantation using tissue-engineered sheets of islets and mesenchymal stem cells. *Tissue Eng Part C Methods*. 2015;12:1205–1215.
41. Rowart P, Erpicum P, Detry O, Weekers L, Grégoire C, Lechanteur C, et al. Mesenchymal stromal cell therapy in ischemia/reperfusion injury. *J Immunol Res*. 2015; 2015:602597.
42. Zheng C, Chen J, Liu S, Jin Y. Stem cell-based bone and dental regeneration: a view of microenvironmental modulation. *Int J Oral Sci*. 2019;11(3):23.
43. Ezquer F, Bahamonde J, Huang YL, Ezquer M. Administration of multipotent mesenchymal stromal cells restores liver regeneration and improves liver function in obese mice with hepatic steatosis after partial hepatectomy. *Stem Cell Res Ther*. 2017;8(1):20.
44. Kebriaei P, Isola L, Bahceci E, Holland K, Rowley S, McGuirk J, et al.. Adult human mesenchymal stem cells added to corticosteroid therapy for the treatment of acute graft-versus-host disease. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2009;15:804-811.
45. Ahn J , Park E , Kim BJ , Kim J, Choi B, Lee S , Han I. Transplantation of human Wharton’s jelly-derived mesenchymal stem cells highly expressing TGFβ receptors in a rabbit model of disc degeneration. *Stem Cell Res Ther*. 2015;6(190).
46. Torres-Espín A, Redondo-Castro E, Hernandez J, Navarro X. Immunosuppression of allogenic mesenchymal stem cells transplantation after spinal cord injury improves graft survival and beneficial outcomes. *J. Neurotrauma*. 2015;32(6): 367–380.

47. Ménard C, Tarte K. Immunoregulatory properties of clinical grade mesenchymal stromal cells: evidence, uncertainties, and clinical application. *Stem Cell Research & Therapy*. 2013;4(64).

48. Nagaishi K, Mizue Y, Chikenji T, Otani M, Nakano M., Saijo Y., et al. Umbilical cord extracts improve diabetic abnormalities in bone marrow-derived mesenchymal stem cells and increase their therapeutic effects on diabetic nephropathy. *Sci Rep*. 2017;7(1):8484.

49. Ge M, Zhang Y, Hao Q, Zhao Y, Dong B. Effects of mesenchymal stem cells transplantation on cognitive deficits in animal models of Alzheimer's disease: A systematic review and meta-analysis. *Brain Behav*. 2018;8(7):e00982.

50. Ling L, Feng X, Wei T, Wang Y, Wang Y, Wang Z, et al. Human amnion-derived mesenchymal stem cell (hAD-MSC) transplantation improves ovarian function in rats with premature ovarian insufficiency (POI) at least partly through a paracrine mechanism. *Stem Cell Res Ther*. 2019;10(1):46.

51. Ventura Ferreira MS, Bienert M, Müller K, Rath B, Goecke T, Opländer C, et al. Comprehensive characterization of chorionic villi-derived mesenchymal stromal cells from human placenta. *Stem Cell Res Ther*. 2018 Feb 5;9(1):28.

52. Li J, Wong WH, Chan S, Chim JC, Cheung KM, Lee T, Au W, et al. Factors affecting mesenchymal stromal cells yield from bone marrow aspiration. *Chin J Cancer Res*. 2011;23(1):43–48.

53. Lyahyai J, Mediano DR, Ranera B, et al. Isolation and characterization of ovine mesenchymal stem cells derived from peripheral blood. *BMC Vet Res*. 2012;8:169.

54. Stavely R, Robinson AM, Miller S, Boyd R, Sakkal S, Nurgali K. Human adult stem cells derived from adipose tissue and bone marrow attenuate enteric neuropathy in the guinea-pig model of acute colitis. *Stem Cell Res Ther*. 2015; 6: 244.

55. Шахпазян НК, Астрелина ТА, Яковлева МВ. Мезенхимальные стволовые клетки из различных тканей человека: биологические свойства,

оценка качества и безопасности для клинического применения. Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. 2012;7(1):23 – 33.

56. MB Eslaminejad, S Jahangir. Amniotic fluid stem cells and their Application in Cell-Based Tissue Regeneration. *Int J Fertil Steril*. 2012;6(3):147–156.

57. Koike C, Zhou K, Takeda Y, Fathy M, Okabe M, Yoshida T, et al. Characterization of Amniotic Stem Cells. *Cell Reprogram*. 2014;16(4):298–305.

58. Yamahara K, Harada K, Ohshima M, Ishikane S, Ohnishi S, Tsuda H, et al. Comparison of Angiogenic, Cytoprotective, and Immunosuppressive Properties of Human Amnion- and Chorion-Derived Mesenchymal Stem Cells *PLoS One*. 2014. V. 9. N.2. P. e88319.

59. A Bongso, C Fong. The Therapeutic Potential, Challenges and Future Clinical Directions of Stem Cells from the Wharton's Jelly of the Human Umbilical Cord. *Stem Cell Reviews and Reports*. 2013; 9(2):226–240.

60. Taghizadeh RR, Cetrulo KJ, Cetrulo CL. Wharton's Jelly stem cells: future clinical applications. *Placenta*. 2011;32:311 -315.

61. Zhang H, Zhang B, Tao Y, Cheng M, Hu J, Xu M, Chen H. Isolation and characterization of mesenchymal stem cells from whole human umbilical cord applying a single enzyme approach. *Cell Biochemistry and Function*. 2012; 30(8):643–649.

62. Fong CY, Richards M, Manasi N, Biswas A, Bongso A. Comparative growth behaviour and characterization of stem cells from human Wharton's jelly. *Reproductive Biomedicine Online* 2007;15(6):708e18.

63. Hsieh JY, Wang HW, Chang SJ, Liao KH, Lee IH, Lin WS, et al. Mesenchymal stem cells from human umbilical cord express preferentially secreted factors related to neuroprotection, neurogenesis, and angiogenesis. *PLoS One*. 2013;8(8):e72604.

64. Wang XY, Lan Y, He WY, Zhang L, Yao HY, Hou CM, et al. Identification of mesenchymal stem cells in aorta-gonad-mesonephros and yolk sac of human embryos. *Blood*. 2008;111:2436-2443.

65. Lindenmair A, Hatlapatka T, Kollwig G, Hennerbichler S, Gabriel C, Wolbank S, et al. Mesenchymal stem or stromal cells from amnion and umbilical cord tissue and their potential for clinical applications. *Cells* 2012;1(4):1061 – 1088.
66. Troyer DL, Weiss ML. Wharton's jelly-derived cells are a primitive stromal cell population. *Stem Cells*. 2008;26(3):591-9.
67. Le Blanc K. Immunomodulatory effects of fetal and adult mesenchymal stem cells. *Cytotherapy* 2003;5(6):485 – 489.
68. Can A, Karahuseyinoglu S. Concise review: human umbilical cord stroma with regard to the source of fetus-derived stem cCells. *STEMCELLS* 2007;25:2886–2895.
69. Lund TC, Kobs A, Blazar BR, Tolar J. Mesenchymal stromal cells from donors varying widely in age are of equal cellular fitness after in vitro expansion under hypoxic conditions. *Cytotherapy* 2010;12(8):971–981.
70. Kebriaei P, Isola L, Bahceci E, Holland K, Rowley S, McGuirk J, Devetten M, Jansen J, Herzig R, Schuster M, Monroy R, Uberti J. Adult human mesenchymal stem cells added to corticosteroid therapy for the treatment of acute graft-versus-host disease. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2009;15:804-811
71. Rubio D, Garcia-Castro J, Martin MC, de la Fuente R, Cigudosa JC, Lloyd AC, Bernad A. Spontaneous human adult stem cell transformation. *Cancer Res*. 2005;65:3035.
72. Kilian KA, Bugarij B, Lahn BT, Mrksich M. Geometric cues for directing the differentiation of mesenchymal stem cells. *PNAS* 2010; 107( 11): 4872–4877
73. Burnouf T, Strunk D Koh , MBC, Schallmoser K. Human platelet lysate: Replacing fetal bovine serum as a gold standard for human cell propagation? *Biomaterials*. 2016;76(371):e387
74. Muraglia A, Nguyen VT, Nardini M, Mogni M, Coviello D, Dozin B, et al. Culture medium supplements derived from human platelet and plasma: Cell Commitment and Proliferation Support. *Front Bioeng Biotechnol*. 2017. V 5. N 66.

75. Saskianti T, Misami K, Kato Y. Comparison of Hyclone and Biowest: effect to hMSC proliferation, morphology, and osteogenic differentiation. *J. Trop. Life. Science.* 2013;3(1):63 – 68.

76. PV Pham, NC Truong, PT Le, TD Tran, NB Vu, KH Bui, N. Phan. Isolation and proliferation of umbilical cord tissue derived mesenchymal stem cells for clinical applications. *Cell Tissue Bank.* 2016;17:289–302.

77. Reilly G, Engler A. Intrinsic extracellular matrix properties regulate stem cell differentiation. *Journal of Biomechanics.* 2010;43(1):55-62.

78. Katsube Y, Hirose M, Nakamura C, Ohgushi H. Correlation between proliferative activity and cellular thickness of human mesenchymal stem cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2008;368(2):256-60.

79. McBeath R, Pirone DM, Nelson CM, Bhadriraju K, Chen CS. Cell shape, cytoskeletal tension, and RhoA regulate stem cell lineage commitment. *Developmental Cell* 2004;6(4):483-495.

80. Yu H, Lim KP, Xiong S, Tan LP, Shim W. Functional morphometric analysis in cellular behaviors: shape and size matter. *Adv Healthc Mater.* 2013;2(9):1188-97.

81. Rombouts WJC, Ploemacher RE. Primary murine MSC show highly efficient homing to the bone marrow but lose homing ability following culture. *Leukemia.* 2003;17(1):P160-170.

82. Angelucci S, Marchisio M, Di Giuseppe F, Pierdomenico L, Sulpizio M, Eleuterio E, et al. Proteome analysis of human Wharton's jelly cells during in vitro expansion. *Proteome Sci.* 2010; 8:18.

83. Kim MJ, Kim CW, Choi YS, Kim MH, Park CJ, Suh Y. Age-related alterations in mesenchymal stem cells related to shift indifferentiation from osteogenic to adipogenic potential: implication to age-associated bone diseases and defects. *Mech Ageing Dev.* 2012; 133:215–225.

84. Basciano L, Nemos C, Foliguet B, de Isla N, de Carvalho M, Tran N, Dalloul A. Long term culture of mesenchymal stem cells in hypoxia promotes a



genetic program maintaining their undifferentiated and multipotent status. *BMC Cell Biol.* 2011;12:12.

85. Wiseman H, Halliwell B. Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: role in inflammatory disease and progression to cancer. *The Biochemical journal.* 1996;313:17-29.

86. Duling BR, Berne RM. Longitudinal gradients in periarteriolar oxygen tension. A possible mechanism for the participation of oxygen in local regulation of blood flow. *Circulation Research.* 1970; 27(11):669 – 677.

87. Brahim-Horn MC, Pouyssegur J. Oxygen, a source of life and stress. *FEBS Letters.* 2007;581:3582 – 3591.

88. Braun RD., Lanzen JL, Snyder SA, Dewhirst MW. Comparison of tumor and normal tissue oxygen tension measurements using OxyLite or microelectrodes in rodents. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2001; 280: 2533 – 2544.

89. Erecinska M, Silver IA. Tissue oxygen tension and brain sensitivity to hypoxia. *Respir. Physiol.* 2001;128:263 – 276.

90. Semenza GL, Wang GL. A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation. *Molecular and Cellular Biology.* 1992;12(12):5447-5454;

91. Semenza GL. Hypoxia. Cross talk between oxygen sensing and the cell cycle machinery. *American Journal of Physiology-Cell Physiology.* 2011; 301(3):550-552

92. Qutub AA, Popel AS. A computational model of intracellular oxygen sensing by hypoxia-inducible factor HIF1 alpha. *J Cell Sci.* 2006;119(Pt 16):3467-80.

93. Kaelin WG Jr, Ratcliffe PJ. Oxygen sensing by metazoans: the central role of the HIF hydroxylase pathway. *Mol Cell.* 2008;30(4):393-402.

94. Lisy K, Peet DJ. Turn me on: regulating HIF transcriptional activity. *Cell Death Differ.* 2008;15(4):642-9.

95. Haddad JJ. Oxygen-sensing mechanisms and the regulation of redox-responsive transcription factors in development and pathophysiology. *Respir. Res.* 2002;3:26–52.
96. Rankin EB, Rha J, Selak MA., Unger TL, Keith B, Liu Q, Haase VH. Hypoxia-inducible factor 2 regulates hepatic lipid metabolism. *Molecular and cellular biology.* 2009;29(16):4527 – 4538.
97. Covello KL, Kehler J, Yu H, Gordan JD, Arsham AM, Hu CJ., et al. HIF-2 $\alpha$  regulates Oct-4: effects of hypoxia on stem cell function, embryonic development, and tumor growth. *Genes & Dev.* 2006;20:557-570.
98. Aragonés J, Fraisl P, Baes M, Carmeliet P. Oxygen sensors at the crossroad of metabolism. *Cell Metab.* 2009;9(1):11-22.
99. Metzen E, Berchner-Pfannschmidt U, Stengel P, Marxsen JH, Stolze I, Klinger M et al. localisation of human HIF-1 alpha hydroxylases: implications for oxygen sensing. *J.Cell.Sci.* 2003; 116(7):1319–1326.
100. Hirsilä M, Koivunen P, Günzler V, Kivirikko KI, Myllyharju J. Characterization of the human prolyl 4-hydroxylases that modify the hypoxia-inducible factor. *J Biol Chem.* 2003;278(33):30772-80.
101. Berra E, Ginouvès A, Pouyssegur J. The hypoxia-inducible-factor hydroxylases bring fresh air into hypoxia signalling. *EMBO Rep.* 2006;7(1):41-5.
102. Ke Q, Costa M. Hypoxia-Inducible Factor-1 (HIF-1). *Mol.Pharmacol.* 2006;70:1469–1480.
103. Acker H. The oxygen sensing signal cascade under the influence of reactive oxygen species. *Phil. Trans. R. Soc.* 2005;360(1464):2201 – 2210.
104. Semenza GL. Oxygen homeostasis. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med.* 2010;2(3):336-361
105. Watt FM, Hogan BLM. Out of Eden: stem cells and their niches. *Science* 2000; 287:1427 – 1430.
106. Eliasson P, Jönsson J. The hematopoietic stem cell niche: low in oxygen but a nice place to be. *J. Cell. Physiol.* 2010;222:17-22.

107. Ahmed Mohyeldin, Tomás Garzón-Muvdi, Alfredo Quiñones-Hinojosa. Oxygen in Stem Cell Biology: A Critical Component of the Stem Cell Niche. *Cell Stem Cell*. 2010, Volume 7, Issue 2. P. 150-161
108. Diabira S, Morandi X. Gliomagenesis and neural stem cells: key role of hypoxia and concept of tumor “neo-niche”. *Med. Hypotheses*. 2008;70(1):96 – 104.
109. D'Ippolito G, Diabira S, Howard G. Low oxygen tension inhibits osteogenic differentiation and enhances stemness of human MIAMI cells. *Bone*. 2006; 3:513 – 522.
110. Dos Santos F, Andrade PZ, Boura JS, Abecasis MM, da Silva CL, Cabral JM. Ex vivo expansion of human mesenchymal stem cells: a more effective cell proliferation kinetics and metabolism under hypoxia. *J Cell Physiol*. 2010 ;223(1):27 – 35.
111. Lavrentieva A, Majore I, Kasper C, Hass R. Effects of hypoxic culture conditions on umbilical cord-derived human mesenchymal stem cells. *Cell Commun Signal*. 2010; 8:18
112. Raheja LF, Genetos, DC, Wong A, Yellowley CE. Hypoxic regulation of mesenchymal stem cell migration: the role of RhoA and HIF-1 $\alpha$ . *Cell Biology International*, 2011; 35: 981-989.
113. Lee S, Choi E, Cha MJ, Hwang KC. Cell adhesion and long-term survival of transplanted mesenchymal stem cells: a prerequisite for cell therapy. *Oxid Med Cell Longev*. 2015;2015:632902.
114. Gao, S., Xiang, C., Qin, K., & Sun, C. Mathematical Modeling Reveals the Role of Hypoxia in the Promotion of Human Mesenchymal Stem Cell Long-Term Expansion. *Stem cells international*, 2018, 9283432.
115. Grayson WL, Zhao F, Bunnell B, Ma T. Hypoxia enhances proliferation and tissue formation of human mesenchymal stem cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 2007;358:948 – 953.

116. Caroti CM., Ahn H, Salazar HF, Joseph G, Sankar SB, Willett, NJ, et al. A novel technique for accelerated culture of murine mesenchymal stem cells that allows for sustained multipotency. *Scientific reports*. 2017;7(1):13334.

117. Antebi B, Rodriguez LA, Walker KP, Asher AM, Kamucheka RM, Alvarado L, et al. Short-term physiological hypoxia potentiates the therapeutic function of mesenchymal stem cells. *Stem cell research & therapy*. 2018;9(1):265.

118. Rauh J, Jacobi A, Stiehler M. Identification of stable reference genes for gene expression analysis of three-dimensional cultivated human bone marrow-derived mesenchymal stromal cells for bone tissue engineering. *Tissue Eng Part C Methods*. 2015;21(2):192-206.

119. Grayson WL, Zhao F, Izadpanah R, Bunnell B, Ma T. Effects of hypoxia on human mesenchymal stem cell expansion and plasticity in 3D constructs .*J. Cell. Physiol*. 2006;207(2):331 – 339.

120. Kwon SY, Chun SY, Ha YS, Kim DH, Kim J, Song PH, et al. Hypoxia enhances cell properties of human mesenchymal stem cells. *Tissue Eng Regen Med*. 2017;14(5):595-604.

121. Жамбалова А, Гершович Ю, Буравкова Л, Гальчук С, Романов ЮА. Влияние пониженного содержания кислорода на дифференцировку мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток костного мозга человека *in vitro*. *Гены и клетки*, 2009;4(3):47-51.

122. Reagan MR, Rosen CJ. Navigating the bone marrow niche: translational insights and cancer-driven dysfunction. *Nat Rev Rheumatol*. 2016;12(3):154–168.

123. Gardner LB, Li Q, Park MS, Flanagan WM, Semenza GL, Dang CV. Hypoxia inhibits G1/S transition through regulation of p27 expression. *J. Biol. Chem*. 2001;276:7919 – 7926.

124. Holzwarth C, Vaegler M, Gieseke F, SM Pfister, R Handgretinger, G Kerst, et al. Low physiologic oxygen tensions reduce proliferation and differentiation of human multipotent mesenchymal stromal cells. *BMC Cell Biol* 2010;11:11.

125. Ren H, Cao Y, Zhao Q, Li J, Zhou C, Liao L, et al. Proliferation and differentiation of bone marrow stromal cells under hypoxic conditions. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006;347(1):12-21.

126. Wagner W, Horn P, Castoldi M, Diehlmann A, Bork S, Saffrich R, et al. Replicative senescence of mesenchymal stem cells: a continuous and organized process. *PLoS One.* 2008;3(5):e2213.

127. Fehrer C, Brunauer , Laschober G, Unterluggauer H, Reitinger S, Kloss F, et al. Reduced oxygen tension attenuates differentiation capacity of human mesenchymal stem cells and prolongs their lifespan. *Aging Cell.* 2007;6:745 – 57.

128. Zhou S, Lechpammer S, Greenberger JS, Glowacki J. Hypoxia inhibition of adipocytogenesis in human bone marrow stromal cells requires transforming growth factor-beta/Smad3 signaling. *J. Biol. Chem.* 2005;280:22688 – 22696.

129. Fink T, Abildtrup L, Fogd K, Abdallah BM, Kassem M, Ebbesen P, et al. Induction of adipocyte-like phenotype in human mesenchymal stem cells by hypoxia. *STEM CELLS.*2004;22:1346-1355.

130. Lin Q, Lee YJ, Yun Z. Differentiation arrest by hypoxia. *J. Biol. Chem.* 2006;281:30678 – 30683.

131. Lin Q, Kim Y, Alarcon RM, Yun Z. Oxygen and Cell Fate Decisions. *Gene Regul. Syst. Bio.* 2008;10(2):43 – 51.

132. Cejudo-Martina P, Johnson RS. A new Notch in the HIF belt: how hypoxia impacts differentiation. *Developmental cell.* 2005;9(5):574 – 576.

133. Rasmussen JG, Frøbert O, Pilgaard L, Kastrup J, Simonsen U, Zachar V, Fink T. Prolonged hypoxic culture and trypsinization increase the pro-angiogenic potential of human adipose tissue-derived stem cells. *Cytotherapy.* 2011;13(3):318-28.

134. Ефименко АЮ, Старостина ЕЕ, Калинина НИ, Парфенова ЕВ. Влияние возраста на ангиогенные свойства мезенхимальных стволовых клеток жировой ткани. *Гены и клетки.* 2011;6(3):48-57.

135. Madrigal M, Rao KS, Riordan NH. A review of therapeutic effects of mesenchymal stem cell secretions and induction of secretory modification by different culture methods. *J Transl Med.* 2014;11(12):260.

136. Nishi H, Nishi KH, Johnson AC. Early Growth Response-1 gene mediates up-regulation of epidermal growth factor receptor expression during hypoxia. *Cancer Res.* 2002;62(3):827-34.

137. Liu H, Liu S, Li Y, Wang X, Xue W, et al. (2012) The Role of SDF-1-CXCR4/CXCR7 Axis in the Therapeutic Effects of Hypoxia-Preconditioned Mesenchymal Stem Cells for Renal Ischemia/Reperfusion Injury. *PLOS ONE* 7(4): e34608.

138. Rosová I, Dao M, Capoccia B, Link D, Nolte JA. Hypoxic preconditioning results in increased motility and improved therapeutic potential of human mesenchymal stem cells. *Stem Cells.* 2008;26(8):2173-82.

139. Ceradini DJ, Kulkarni AR, Callaghan MJ. Progenitor cell trafficking is regulated by hypoxic gradients through HIF-1 induction of SDF-1. *Nat. Med.* 2004;10:858 – 864.

140. Ye Z, Zhang R, Sun X. Bustling argon: biological effect. *Med Gas Res.* 2013;3(1):22.

141. Harris K, Armstrong SP, Campos-Pires R, et al. Neuroprotection against traumatic brain injury by xenon, but not argon, is mediated by inhibition at the N-methyl-D-aspartate receptor glycine site. *Anesthesiology.* 2013;119(5):1137-1148.

142. Nespoli F, Redaelli S, Ruggeri L, Fumagalli F, Olivari D, Ristagno G. A complete review of preclinical and clinical uses of the noble gas argon: Evidence of safety and protection. *Ann Card Anaesth.* 2019;22(2):122-135.

143. Höllig A, Schug A, Fahlenkamp AV, Rossaint R, Coburn M; Argon Organo-Protective Network (AON). Argon: systematic review on neuro- and organoprotective properties of an "inert" gas. *Int J Mol Sci.* 2014;15(10):18175-18196.

144. Jawad N, Rizvi M, Gu J, Adeyi O, Tao G, Maze M, Ma D. Neuroprotection (and lack of neuroprotection) afforded by a series of noble gases in an in vitro model of neuronal injury. *Neurosci Lett.* 2009;460(3):232-6.

145. Yarin YM, Amarjargal N, Fuchs J, Haupt H, Mazurek B, Morozova SV, Gross J. Argon protects hypoxia-, cisplatin- and gentamycin-exposed hair cells in the newborn rat's organ of Corti. *Hear Res.* 2005;201(1-2):1-9.

146. Abraini JH, Kriem B, Balon N, Rostain JC, Risso JJ. Gamma-aminobutyric acid neuropharmacological investigations on narcosis produced by nitrogen, argon, or nitrous oxide. *Anesth Analg.* 2003 ;96(3):746-9.

147. Fahlenkamp AV, Rossaint R, Haase H, Al Kassam H, Ryang YM, Beyer C, Coburn M. The noble gas argon modifies extracellular signal-regulated kinase 1/2 signaling in neurons and glial cells. *Eur J Pharmacol.* 2012;674(2-3):104-11.

148. Ulbrich F, Kaufmann KB, Coburn M, Lagrèze WA, Roesslein M, Biermann J, et al. Neuroprotective effects of Argon are mediated via an ERK-1/2 dependent regulation of heme-oxygenase-1 in retinal ganglion cells. *J Neurochem.* 2015;134(4):717-27.

149. Zhao H, Mitchell S, Ciechanowicz S, Savage S, Wang T, Ji X, Ma D. Argon protects against hypoxic-ischemic brain injury in neonatal rats through activation of nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2. *Oncotarget.* 2016;7(18):25640-51.

150. Bezlyudna AS, Pustovalov AS, Matvienko MG, Dzerzhinskii NE. Effects of the  $\alpha$ -adrenergic, kisspeptinergetic, and melatonin systems on the morphofunctional state of cells of the adrenal cortex in mature rats. *Neurophysiology.* 2017; 49(2): 98 – 106.

151. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual.* 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press 1989.

152. Kordyum VA, Toporova EK, Okunev OV, Pokholenko YA, Suchorada EM, Ruban TA, Andrienko VI, Irodov DM. Novel cell line with multiple markers, derivative of CHO-K1. *Biopolym Cell.* 2003; 19(3):252 – 256.

153. Фрешни Р, редактор. Культура животных клеток. Методы. Пер.с англ. М.: Мир, 1989. 333 с.
154. Wenger RH, Kurtcuoglu V, Scholz CC, Marti HH, Hoogewijs D. Frequently asked questions in hypoxia research. *Hypoxia (Auckl)*. 2015;3:35-43.
155. Yoon JH, Roh EY, Shin S, Jung NH, Song EY, Chang JY, Kim BJ, Jeon HW. Comparison of explant-derived and enzymatic digestion-derived MSCs and the growth factors from Wharton's jelly. *Biomed Res Int*. 2013;2013:428726.
156. Filiz AA, Rahime B, Keskin HL, Esra AK. Positive correlation between the quantity of Wharton's jelly in the umbilical cord and birth weight. *Taiwan J Obstet Gynecol*. 2011 Mar;50(1):33-6.
157. Margossian T, Reppel L, Makdissy N, Stoltz JF, Bensoussan D, Huselstein C. Mesenchymal stem cells derived from Wharton's jelly: comparative phenotype analysis between tissue and in vitro expansion. *Biomed Mater Eng*. 2012;22(4):243-54.
158. Eggermann J, Kliche S, Jarmy G, Hoffmann K, Mayr-Beyrle U, Debatin KM et al. Endothelial progenitor cell culture and differentiation in vitro: a methodological comparison using human umbilical cord blood. *Cardiovasc Res*. 2003 May 1;58(2):478-86.
159. They M, Bornens M. Cell shape and cell division. *Curr Opin Cell Biol*. 2006;18(6):648-57
160. Shuvalova NS, Maslova OA, Sukhorada OM, Deryabina OG, Kordium VA. Maintenance of mesenchymal stem cells culture due to the cells with reduced attachment rate. *Biopolym. Cell*. 2013; 29(1):75–78.
161. Wang HS, Hung SC, Peng ST, Huang CC, Wei HM, Guo YJ, Fu YS, Lai MC, Chen CC. Mesenchymal stem cells in the Wharton's jelly of the human umbilical cord. *Stem Cells*. 2004;22(7):1330–7.
162. Chen L, Xu Y, Zhao J, Zhang Z, Yang R., Xie J et al. Conditioned medium from hypoxic bone marrow-derived mesenchymal stem cells enhances wound healing in mice. *PloS one*. 2014;9(4):e96161.



163. Huang B, Qian J, Ma J, Huang Z, Shen Y, Chen X, Sun A, Ge J, Chen H. Myocardial transfection of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  and co-transplantation of mesenchymal stem cells enhance cardiac repair in rats with experimental myocardial infarction. *Stem Cell Res Ther.* 2014;5:22.

164. He Y, Zhou S, Liu H, Shen B, Zhao H, Peng K, Wu X. Indoleamine 2, 3-Dioxygenase Transfected Mesenchymal Stem Cells Induce Kidney Allograft Tolerance by Increasing the Production and Function of Regulatory T Cells. *Transplantation.* 2015;99(9):1829-38

165. Wang W, Xu X, Li Z, Lendlein A, Ma N. Genetic engineering of mesenchymal stem cells by non-viral gene delivery. *Clin Hemorheol Microcirc.* 2014; 58(1):19 - 48.

166. Hendijani F. Explant culture: An advantageous method for isolation of mesenchymal stem cells from human tissues. *Cell Prolif.* 2017 Apr;50(2):e12334.

167. Tantrawatpan C, Manochantr S, Kheolamai P, U-Pratya Y, Supokawej A, Issaragrisil S. Pluripotent gene expression in mesenchymal stem cells from human umbilical cord Wharton's jelly and their differentiation potential to neural-like cells. *Journal of the Medical Association of Thailand = Chotmaihet Thangphaet.* 2013; 96(9):1208-1217.

168 Tsagias N, Koliakos I, Karagiannis V, Eleftheriadou M, Koliakos GG. Isolation of mesenchymal stem cells using the total length of umbilical cord for transplantation purposes. *Transfusion Medicine,* 2011;21:253-261.

169. Salehinejad P, Alitheen NB, Ali AM, Omar AR, Mohit M, Janzamin E, Samani FS, Torshizi Z, Nematollahi-Mahani SN. Comparison of different methods for the isolation of mesenchymal stem cells from human umbilical cord Wharton's jelly. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 2012 Feb;48(2):75-83.

170. Bharti D, Shivakumar SB, Park JK, Ullah I, Subbarao RB, Park JS, Lee SL, Park BW, Rho GJ. Comparative analysis of human Wharton's jelly mesenchymal stem cells derived from different parts of the same umbilical cord. *Cell Tissue Res.* 2018;372(1):51-65.

171. Hashemitabar M, Allahbakhshi E, Tabande M, Orazizadeh M, Dehbashi F, Azandeh S, et al. Isolation and characterization of human umbilical cord mesenchymal stem cells and their differentiation into Pdx-1+ cells. *Journal of Biomedical Science and Engineering*. 2015;8:780-788.

172. Donders R, Bogie JFJ, Ravanidis S, Gervois P, Vanheusden M, Marée R, Schrynemackers M, Smeets HJM, Pinxteren J, Gijbels K, Walbers S, Mays RW, Deans R, Van Den Bosch L, Stinissen P, Lambrichts I, Gyselaers W, Hellings N. Human Wharton's Jelly-Derived Stem Cells Display a Distinct Immunomodulatory and Proregenerative Transcriptional Signature Compared to Bone Marrow-Derived Stem Cells. *Stem Cells Dev*. 2018 Jan 15;27(2):65-84.

173. Zhang W, Su X, Gao Y, Sun B, Yu Y, Wang X, Zhang F. Berberine protects mesenchymal stem cells against hypoxia-induced apoptosis in vitro. *Biol Pharm Bull*. 2009 Aug;32(8):1335-42.

174. Son TW, Yun SP, Yong MS, Seo BN, Ryu JM, Youn HY, Oh YM, Han HJ. Netrin-1 protects hypoxia-induced mitochondrial apoptosis through HSP27 expression via DCC- and integrin  $\alpha 6\beta 4$ -dependent Akt, GSK-3 $\beta$ , and HSF-1 in mesenchymal stem cells. *Cell Death Dis*. 2013 Mar 28;4(3):e563.

175. Wisel S, Khan M, Kuppusamy ML, Mohan IK, Chacko SM, Rivera BK, et al. Pharmacological preconditioning of mesenchymal stem cells with trimetazidine (1-[2,3,4-trimethoxybenzyl]piperazine) protects hypoxic cells against oxidative stress and enhances recovery of myocardial function in infarcted heart through Bcl-2 expression. *J Pharmacol Exp Ther*. 2009;329(2):543-50.

176. Roemeling-van Rhijn M, Mensah FK, Korevaar SS, Leijts MJ, van Osch GJ, Ijzermans JN, Betjes MG, Baan CC, Weimar W, Hoogduijn MJ. Effects of Hypoxia on the Immunomodulatory Properties of Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem cells. *Front Immunol*. 2013;18(4)203.

177. Lv B, Li F, Fang J, Xu L, Sun C, Han J, et al. Hypoxia inducible factor 1 $\alpha$  promotes survival of mesenchymal stem cells under hypoxia. *Am J Transl Res* 2017;9(3):1521-1529.

178. Ejtehadifar M, Shamsasenjan K, Movassaghpour A, Akbarzadehlaleh P, Dehdilani N, Abbasi P, Molaeipour Z, Saleh M. The Effect of Hypoxia on Mesenchymal Stem Cell Biology. *Adv Pharm Bull.* 2015; 5(2): 141–149.

179. Hung SC, Pochampally RR, Hsu SC, Sanchez C, Chen SC, Spees J, Prockop DJ. Short-term exposure of multipotent stromal cells to low oxygen increases their expression of CX3CR1 and CXCR4 and their engraftment in vivo. *PLoS One.* 2007 May 2;2(5):e416.

180. Annabi B, Lee YT, Turcotte S, Naud E, Desrosiers RR, Champagne M, Eliopoulos N, Galipeau J, Béliveau R. Hypoxia promotes murine bone-marrow-derived stromal cell migration and tube formation. *Stem Cells.* 2003;21(3):337-47.

181. Krinner A, Zscharnack M, Bader A, Drasdo D, Galle J. Impact of oxygen environment on mesenchymal stem cell expansion and chondrogenic differentiation. *Cell Prolif.* 2009 Aug;42(4):471-84.

182. Majore I, Moretti P, Hass R, Kasper C. Identification of subpopulations in mesenchymal stem cell-like cultures from human umbilical cord. *Cell Commun Signal.* 2009 Mar 20;7:6.

183. Kern S, Eichler H, Stoeve J, Klüter H, Bieback K. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. *Stem Cells.* 2006; 24(5):1294–301.

184. Carrancio S, López-Holgado N, Sánchez-Guijo FM, Villarón E, Barbado V, Tabera S, Díez-Campelo M, Blanco J, San Miguel JF, Del Cañizo MC. Optimization of mesenchymal stem cell expansion procedures by cell separation and culture conditions modification. *Exp Hematol.* 2008;36(8):1014-21.

185. Jo J, Tabata Y. Non-viral gene transfection technologies for genetic engineering of stem cells. *Eur J Pharm Biopharm.* 2008 Jan;68(1):90-104.

186. Brunner S, Fürtbauer E, Sauer T, Kursa M, Wagner E. Overcoming the nuclear barrier: cell cycle independent nonviral gene transfer with linear polyethylenimine or electroporation. *Mol Ther.* 2002 Jan;5(1):80-6.

187. Männistö M, Rönkkö S, Mättö M, Honkakoski P, Hyttinen M, Pelkonen J, et al. The role of cell cycle on polyplex-mediated gene transfer into a retinal pigment epithelial cell line. *J. Gene Med.* 2005; 7:466-476.

188. King WJ, Kouris NA, Choi S, Ogle BM, Murphy WL. Environmental parameters influence non-viral transfection of human mesenchymal stem cells for tissue engineering applications. *Cell Tissue Res.* 2012 Mar;347(3):689-99.

189. Boura JS, Santos FD, Gimble JM, Cardoso CM, Madeira C, Cabral JM, Silva CL. Direct head-to-head comparison of cationic liposome-mediated gene delivery to mesenchymal stem/stromal cells of different human sources: a comprehensive study. *Hum Gene Ther Methods.* 2013;24(1):38-48.

190. Gheisari Y, Soleimani M, Azadmanesh K, Zeinali S. Multipotent mesenchymal stromal cells: optimization and comparison of five cationic polymer-based gene delivery methods. *Cytotherapy.* 2008;10(8):815-23.

191. Hoare M, Greiser U, Schu S, Mashayekhi K, Aydogan E, Murphy M, et al. Enhanced lipoplex-mediated gene expression in mesenchymal stem cells using reiterated nuclear localization sequence peptides. *J. Gene Med.* 2010;12: 207-218.

192. Madeira C, Mendes RD, Ribeiro SC, Boura JS, Aires-Barros MR, da Silva CL, Cabral JM. Nonviral gene delivery to mesenchymal stem cells using cationic liposomes for gene and cell therapy. *J Biomed Biotechnol.* 2010;2010:735349.

193. Kovalchuk MV, Deryabina OG, Pichkur LD, Verbovskaya SA, Shuvalova NS, Pichkur OL, Kordium VA. Distribution of transplanted human mesenchymal stem cells from Wharton's Jelly in the central nervous systems of the EAE rats. *Biopolymers and Cell.* 2015;31(5):371–378.

194. Reppel L, Margossian T, Yaghi L, Moreau P, Mercier N, Leger L, et al. Hypoxic culture conditions for Mesenchymal Stromal/Stem Cells from Wharton's jelly: a critical parameter to consider in a therapeutic context. *Curr Stem Cell Res Ther.* 2014;9(4):306-18.

ДОДАТОК А  
ПЕРЕЛІК НАУКОВИХ ПРАЦЬ ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ  
ДИСЕРТАЦІЇ

1. **Shuvalova N.,** Kordium V. Comparison of proliferative activity of Wharton jelly mesenchymal stem cells in cultures under various gas conditions // *Biopolym. Cell.* - 2015. - Vol. 31, №3. - P. 233–239.

2. **Shuvalova N.,** Kordium V. Proliferation of Wharton jelly mesenchymal stem cells, derived by preserving the cells with reduced attachment rate, under various gas conditions // *Biopolym. Cell.* - 2015. - Vol. 31, №6. - P. 447 - 454.

3. **Shuvalova N.,** Kordium V. Morphological characteristics of mesenchymal stem cells from Wharton jelly, cultivated under physiological oxygen tensions, in various gas mixtures // *Biopolym. Cell.* - 2016. - Vol. 32. №4. - P. 262–270

4. Lykhmus O., Koval L., Voytenko L., Uspenska K., Komisarenko S., Deryabina O., **Shuvalova N.,** Kordium V., Ustymenko A., Kyryk V., Skok M. Intravenously Injected Mesenchymal Stem Cells Penetrate the Brain and Treat Inflammation-Induced Brain Damage and Memory Impairment in Mice // *Front Pharmacol.* 2019. - Vol 10. - P. 355

5. **Shuvalova N. S.,** Toporova E. K., Kordium V. A. Transfection of mesenchymal stem cells at physiological oxygen concentrations // *Biopolym. Cell.* - 2020. - Vol.36 №6. - P. 433 - 445

6. **Шувалова Н.С.,** Дерябіна О.Г. ,Жукова С.М., Сорока М.П. Культивування мезенхімальних стовбурових клітин пуповинного канатика людини при знижених концентраціях кисню // Науково-практична конференція з міжнародною участю "Генетична і регенеративна медицина: проблеми та перспективи" *Журнал академії медичних наук України*, том 16, додаток, 2010 — с.191.

7. **Shuvalova N.,** Deryabina O., Kordium V. Cultivation of human mesenchymal stem cells under low oxygen tensions // *Materials of International Life Sciences Students` Conference, Netherlands, Nijmegen, Nov.2010 - Abstract*

book, P. 80.

8. **Shuvalova N., Deryabina O., Kordium V.** Cultivation of human mesenchymal stem cells from umbilical cord matrix under physiological oxygen tensions *The 4th international IMBG conference for young scientists "Molecular biology: advances and perspectives" abstract book* – 2011. - P. - 176

9. **Шувалова Н.С., Дєрябіна О.Г., Маслова О.О., Жукова С.М., Сорока М.П., Кордюм В.А.** Культивування мезенхімальних стовбурових клітин пупкового канатика людини в газових сумішах із фізіологічними концентраціями кисню на основі азоту та аргону // Науково-практична конференція з міжнародною участю "Актуальні проблеми регенеративної медицини", Київ 2012. - *Журнал академії медичних наук України*, том 18, додаток - с.167-168.

10. **Shuvalova Nadiia, Deryabina Olena, Kordium Vitalii.** Cultivation of human MSC from umbilical cord using various gas mixtures // *Materials of 7th Annual Congress of the German Society for Stem Cell Research, associated with Fraunhofer Life Sciences Symposium Abstract book.* - Germany, Leipzig, Nov 2012. - P. 112.

11. **Шувалова Н.С., Топорова О.К.** Біологічні властивості мезенхімальних стовбурових клітин Вартонового студня при культивуванні в газових сумішах з фізіологічними концентраціями кисню // Тези науково-практичної конференції з міжнародною участю «Інноваційні напрями в генетичній та регенеративній медицині» 9-10 листопада 2017 р., м. Київ, Україна. - *Клітинна та органна трансплантологія. 2017, Том 5. №2. Додаток.* - С. 258.