

**КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА**

ННЦ «Інститут біології та медицини»
Кафедра цитології, гістології
та репродуктивної медицини

Завідувач кафедри

професор Микола ДЗЕРЖИНСЬКИЙ

Протокол №____ засідання кафедри

Від «__» _____ 2023 р.

**ПОРІВНЯЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА КЛІТИННИХ КУЛЬТУР
ЛЮДИНИ РІЗНИХ ДЖЕРЕЛ ПОХОДЖЕННЯ ДЛЯ ЦІЛЕЙ
АВТОМАТИЗОВАНОГО БІОТЕХНОЛОГІЧНОГО ВИРОБНИЦТВА**

Випускна кваліфікаційна робота магістра
денної форми навчання
за спеціальністю 091 Біологія
Хмельницької Юлії Миколаївни
Науковий керівник від кафедри
канд. біол. наук, доцент
Вороніна О.К.

Робота виконана на базі біотехнологічної лабораторії Банку пуповинної крові,
тканин та інших клітин людини ТОВ «Медичний центр «М.Т.К.»
Фармацевтичної корпорації «ЮРІЯ-фарм»
під керівництвом завідуючого біотехнологічною лабораторією Пихтєєва Д.М.

Оцінка захисту роботи

Київ – 2023р.

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

ВІЛ 1 / ВІЛ 2 - вірус імунодефіциту людини

к-середовище – кондиціоноване середовище отримане з мезенхімальних стовбурових клітин

МСК – мезенхімальні стовбурові клітини

DMEM/F12 – Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12 (модифіковане середовище Дульбеко/поживна суміш F-12 для клітинних культур)

DPBS – Dulbecco's phosphate-buffered saline (фосфатний буферний розчин у модифікації Дульбеко)

FBS – fetal bovine serum (фетальна бичача сироватка)

MEM Alpha - Minimum Essential Medium Eagle alpha modification (змінений середовищний склад Дульбеко (MEM) Альфа)

ЗМІСТ

ВСТУП	5
РОЗДІЛ I. Властивості та можливості мезенхімальних стовбурових клітин людини	7
1.1. Мезенхімальні стовбурові клітини	7
1.2. Джерела виділення мезенхімальних стовбурових клітин.....	9
1.2.1. Ендоетріальні МСК виділені з менструальної крові	9
1.2.2. МСК виділені з кісткового мозку	10
1.2.3. МСК виділені з жирової тканини.....	10
1.2.4. МСК виділені з нервового гребня.....	11
1.3. Застосування кондиційованого середовища.....	12
1.4. Біотехнологічні особливості клітинних культур.....	14
РОЗДІЛ 2. Матеріали та методи дослідження	17
2.1. Отримання біоматеріалу	17
2.2. Виділення мезенхімальних стовбурових клітин з менструальної крові, похідного нервового гребня, кісткового мозку та жирової тканини.....	18
2.3. Культивування мезенхімальних стовбурових клітин людини.....	20
2.4. Флуоресцентне забарвлення мезенхімальних стовбурових клітин акридиновим оранжевим	20
2.5. Диференціювання мезенхімальних стовбурових клітин в адипогеному, остеогеному та хондрогеному напрямленнях	21
2.6. Визначення рецепторного профілю мезенхімальних стовбурових клітин за допомогою проточної цитофлуориметрії	22
2.7. Дослідження клітинного циклу МСК за різного часу культивування (7, 14 та 21 день).....	24

2.8. Отримання кондиційованого середовища від культури мезенхімальних стовбурових клітин людини	25
2.9. Визначення концентрації білку в кондиційованому середовищі за Бредфордом	26
2.10. Визначення білкового складу кондиційованого середовища	26
2.11. Статистичні методи	27
РОЗДІЛ 3. результати дослідження та обговорення	28
3.1. Порівняльна характеристика мезенхімальних стовбурових клітин отриманих з різних джерел	28
3.2. Багатолінійний потенціал до диференціації ізольованих мезенхімальних стовбурових клітин	38
3.3. Вплив терміну культивування при біотехнологічному процесі на клітинний цикл мезенхімальних стовбурових клітин	43
3.4. Біохімічні показники кондиціонованого середовища	53
ВИСНОВКИ	65

ВСТУП

Використання мезенхімальних стовбурових клітин (МСК) є найбільш перспективним в лікуванні безлічі аутоімунних захворювань, в регенеративній медицині, а також хвороб пов'язаних з опорно-руховою системою та інших.

Не дивлячись на безліч клінічних випробувань з аутологічними та алогенними мезенхімальними стовбуровими клітинами, що проводяться в світі лише 13 продуктів вироблених на основі МСК людини були зареєстровані, серед цих продуктів 9 були на основі алогенних МСК, інші 4 застосовуються для аутологічної трансплантації [1]. В результаті досліджень було виявлено, що економічно більш доцільно застосовувати терапію алогенними мезенхімальними стовбуровими клітинами. Алогенні мезенхімальні стовбурові клітини людини є клітинами, які використовуються для лікування різних хвороб безпосередньо з банку донорських клітин. Використання алогенних МСК має кілька переваг порівняно з аутологічними МСК, такі як економічність, доступність та менші ризики відторгнення. Крім того, алогенні МСК можуть бути вироблені у великих кількостях, що дозволяє їх використовувати для лікування більшої кількості пацієнтів.

Фармацевтичні компанії спрямовують свої зусилля на оптимізацію виробництва з метою культивування мезенхімальних стовбурових клітин людини в промислових масштабах, забезпечуючи при цьому стандартизацію та контроль якості. Одна з ключових задач, що стоять перед фармацевтичним виробництвом, - це виробництво великих об'ємів клітинного продукту для фармацевтичної промисловості, які відповідають високим стандартам якості. Однак метою масштабування біотехнологічного виробництва є забезпечення легкої доступності до банку мезенхімальних стовбурових клітин, які можуть використовуватися пацієнтами для лікування різних захворювань [2].

Промислове біотехнологічне виробництво потребує стандартизованих умов культивування для отримання результату, що відповідає вимогам сучасної Фармакопеї України. Біотехнологічний процес з культивування МСК

є мало рандомізованим, та залежить від типу джерела виділення клітин, від стану здоров'я практично здорових донорів, від протоколу культивування та протоколу аналізу клітин. Дані параметри впливають на якість отриманого клітинного продукту та на секретом культури (фактори росту, цитокіни, хемокіни).

До цього часу не проводився аналіз та облік вище перерахованих факторів для біотехнологічного виробництва, яке є більш масштабним, що націлено на великі об'єми клітин та вихід готового продукту, що рахується десятками мільярдів клітин, на відміну від лабораторного, де виготовляється не більше сотні мільйонів клітин.

Масштабування культивування клітин потребує з'ясування механізмів управління біотехнологічним процесом, забезпечення співвідношенням якість/ефективність клітинної культури, які до цього часу не були визначені в порівняльному аспекті, що визначило цілі та завдання даного дослідження.

РОЗДІЛ І

ВЛАСТИВОСТІ ТА МОЖЛИВОСТІ МЕЗЕНХІМАЛЬНИХ СТОВБУРОВИХ КЛІТИН ЛЮДИНИ

1.1. Мезенхімальні стовбурові клітини

Клітинна терапія вважається новою революційною моделлю лікування в медицині. Терапія мезенхімальними стовбуровими/стромальними клітинами вивчається вже близько 30 років. На даний момент застосування МСК в клінічній практиці із новизни поступово переходить в клінічні випробування та лікувальну практику затверджену європейськими (European Medicines Agency), американськими (Food and Drug Administration) та іншими медичними інстанціями [3]. Мезенхімальні стовбурові клітини нескладні в культивування та здатні до проліферації в умовах *in vitro*, що дозволяє біотехнологічно виробляти клітинні препарати на основі мезенхімальних стовбурових клітин для масового застосування.

Мезенхімальні стовбурові клітини – вважаються мультипотентними клітинами, що здатні самовідновлюватися та давати початок всім клітинам мезодермального походження. Вперше мезенхімальні стовбурові клітини з диференційованих тканин дорослого організму було виділено з кісткового мозку, потім було знайдено, що в інших джерелах диференційованих тканин присутні МСК, зокрема в жировій тканині, периферичній крові, нервовому гребні, пуповинній крові, плаценті. За своїм потенціалом МСК здатні диференціюватися в декілька ліній клітин, зокрема в остеобласти, хондробласти та адипоцити. Є дослідження в яких вказано, що МСК можуть диференціюватися в немезодермальні типи клітини, включаючи нейрональні клітини. МСК здатні відновлювати пошкоджену нервову тканину і цим самим вони стають придатними для лікування нервової системи, що зазнала уражень. Також мезенхімальним стовбуровим клітинам властива імуносупресивна

активність, що дозволяє застосовувати даний вид терапії при неврологічних порушеннях запальної етіології [4].

Мезенхімальні стовбурові клітини через знижену імуногенну властивість та гарний потенціал до розмноження стали терапевтичною перспективою не тільки регенеративної медицини, а й клітинної терапії. Міжнародна спільнота міжклітинної терапії (The International Society for Cellular Therapy) встановила три мінімальних критерія для визначення мультипотентних стовбурових клітин [5].

1) МСК повинні мати адгезивний потенціал (зокрема, в стандартних умовах культивування мають прикріплюватися до пластику);

2) МСК мають експресувати маркери CD73+, CD90+, CD105+ ($\geq 90\%$) та бути негативними на експресію CD45-, CD34-, CD14- чи CD11b-, CD79альфа- чи CD19- і HLA-DR- ($\leq 2\%$);

3) МСК мають диференціюватися в 3 типи клітин: остеобласти, хондробласти, адипоцити.

Терапевтичний потенціал МСК зумовлений тим, що ці клітини секретують різні цитокіни, фактор росту, білки позаклітинного матриксу, що беруть участь в ремоделюванні позаклітинного матриксу, позаклітинні везикули та екзосоми [6]. Проте нещодавні дослідження показали, що після клітинної трансплантації, частина мезенхімальних стовбурових клітин потрапивши у велике та мале коло кровообігу гинуть. Так в малому, або легеневому колі кровообігу частина трансплантованих МСК піддається згубної дії легеневих макрофагів в перші години трансплантації. Проте в середньому 65-70% мезенхімальних стовбурових клітин все таки залишаються неушкодженими в кров'яному руслі і в подальшому сприяють такому явищу як хоумінг (міграція стовбурових клітин в місце пошкодження шляхом захоплення їх кровоносною системою пошкодженої тканини з подальшою міграцією через ендотеліальні клітини судин до місця ураження [7].

1.2. Джерела виділення мезенхімальних стовбурових клітин

Джерелом мезенхімальних стовбурових клітин можуть слугувати кістковий мозок, жирова тканина, пульпа зуба, нервовий гребінь, синовіальна оболонка, ендометрій, менструальна кров, плацента та пуповина [8]. Мезенхімальним стовбуровим клітинам властиве самовідновлення, мультипотентність та добра біодоступність [9]. Є припущення, що МСК можуть бути виділеними з будь-якої тканини, проте є ряд обмежень з приводу цього. По-перше це обмежена доступність тканин для взяття біоматеріалу, зокрема інвазивність процедури. По-друге це індивідуальні особливості донора, які пов'язані з віком, статтю, супутніми захворюваннями. Важливо вибрати правильне джерело для отримання мезенхімальних стовбурових клітин, залежно від характеристики пацієнта та його потреби [9].

1.2.1. Ендометріальні МСК виділені з менструальної крові

Стовбурові/стромальні клітини ендометрію можуть бути виділені як з ендометріальної тканини, так і з менструальної крові. В 2004 році Чан та його колегами вперше було показано, що з ендометрію можливо отримати такі популяції клітин, як мезенхімальну та епітеліальну, а в 2007 році Мен та його колеги вперше виділили мезенхімальні стовбурові клітини з менструальної крові [10, 11]. Характерним є те, що фенотип МСК виділених з менструальної крові такий самий як із МСК виділених з жирової тканини та кісткового мозку. Зокрема МСК з менструальної крові позитивні за CD73+ та CD90+ (мезенхімальні маркери), CD105+ (ендогліни). Також в цій популяції МСК присутні маркери ендометріальних стовбурових клітин, а саме CD44+ та CD146+, але клітини не несуть на собі маркери ендотелію (CD31+), маркери стовбурових гемопоетичних клітин (CD34+).

1.2.2. МСК виділені з кісткового мозку

МСК виділені з кісткового мозку найбільш частіше використовуються в клітинній терапії та практиці регенеративної медицини. Проте дане джерело отримання стовбурових клітин не є досить безпечним, адже необхідна спеціальна процедура аспірації кісткового мозку, що може бути травматичною та болісною. Автори в цій роботі [12] застерігають, що виділення мезенхімальних стовбурових клітин з кісткового мозку може бути болісною процедурою з можливим ускладненням у вигляді кровотечі. Також якщо порівнювати ту кількість мезенхімальних стовбурових клітин, що знаходиться серед всього пулу клітин кісткового мозку, то лише 0,001–0,01% клітин є МСК. Також є дані, що МСК з кісткового мозку можуть проявляти ознаки старіння, навіть на ранніх пасажах [8]. Мезенхімальні стовбурові клітини, джерелом яких є кістковий мозок, мають експресію антигенна поверхневої активності. Так на поверхні клітин виділених з кісткового мозку експресуються маркери, що є характерними для всіх МСК CD73+, CD90+, CD105+ та мають поверхневі такі білки, як CD271+, CD140b, STRO-1 [13]. МСК з кісткового мозку краще диференціюються в хондробласти та мають більшу експресію колагену 2 типу, в порівнянні з МСК виділених з жирової тканини та нервового гребня [9].

1.2.3. МСК виділені з жирової тканини

Стовбурові клітини жирової тканини – це стовбурові клітини мезенхімального походження, що мають потенціал до самовідновлення та мультипотенціального диференціювання. За останнє десятиліття жирова тканина є однією з найбільш вивчених типів тканин через свою ендокринну активність, що проявляється у вивільненні адипоцитокінів, цитокінів, транскрипційних ростових факторів, що утворюють секретом [14].

Стовбурові клітини жирової тканини можна виділити завдяки мінімальним інвазійним методам та з декількох місць. Також характерним для МСК жирової тканини є те, що клітини будучі позитивними за маркером CD34+ можуть диференціюватися та утворювати некротворні колонії в яких можна ідентифікувати такі субпопуляції за фенотипом: проендотеліальні (CD146+/CD31+/CD34+), перицити (CD146+/CD31-/CD34-), та стромальні клітини, що мають великий потенціал до диференціації в адипоцити (CD146-/CD31-/CD34+) [8, 14, 15].

1.2.4. МСК виділені з нервового гребня

Тканини дорослого організму мають в обмеженій кількості постмігруючі клітини похідні нервового гребня. Стовбурові клітини нервового гребня – це мультипотентні стовбурові клітини, що можуть диференціюватися в напрямку клітин мезодермального та ектодермального походження [16]. Так стовбурові клітини нервового гребня є тимчасовою популяцією, що присутня в ранньому ембріональному періоді [17]. Клітини, які походять з нервового гребня здатні диференціюватися в нейрони, клітини глії, серцевий м'яз, хондроцити, остецити. Вважається, що стовбурові клітини нервового гребня виділені з дорослого організму мають більший потенціал до диференціювання клітин в нейрони та клітини глії, на відміну від МСК виділених з кісткового мозку та менструальної крові. Британські вчені Oscar O. та його команда описали фенотип мезенхімальних стовбурових клітин виділених з нервового гребня та показали, що ці клітини експресують ті ж маркери, що і нервовий гребінь під час ембріональної закладки, а саме NES, Sox9, p75, Slug, Sox10 та інші [18-20]. Дані характеристики МСК отриманих з нервового гребня дорослого організму можуть бути використані для лікування нейродегенеративних захворювань.

1.3. Застосування кондиційованого середовища

Загальновизнано, що свої терапевтичні та регенеративні властивості мезенхімальні стовбурові клітини проявляють шляхом секреції паракринних факторів та стимуляції клітин-мішеней, а не шляхом приживлення в тканинах пацієнта [21]. Терапія, що заснована на введенні стовбурових клітин, заснована на покращенні механізму відновлення організму шляхом стимуляції та модуляції ендогенних стовбурових клітин, що в подальшому стимулює їх ріст для відновлення клітинного пулу для забезпечення гомеостазу та регенерації тканин [22]. В процесі культивування МСК в поживному середовищі починається вивільнення ростових факторів протягом всього періоду росту клітин в культуральне середовище, яке називається кондиціонованим середовищем від МСК (к-середовище). К-середовищу властива терапевтична дія з регенеративними властивостями. Також фактори, що секретуються МСК в к-середовище мають здатність до антиоксидантної, клітинно-проліферативної, імуносупресивної дії [23]. Зокрема в кондиціонованому середовищі спостерігається високий рівень розчинних факторів, факторів росту, інтерлейкінів, що відповідають хемоатрактивній дії на оточуючі тканини.

Терапія аутологічними стовбуровими клітинами не може відбуватися екстрено, бо потребує специфічного довготривалого культивування та розмноження стовбурових клітин. Кондиціоноване середовище з МСК може бути використане, як екстрений лікувальний препарат, адже необхідності в довготривалому нарощуванні клітинної культури не має, а є потреба в простому накопиченні к-середовища в момент культивування МСК. Також к-середовище позбавлене клітин, а отже не несе жодної імунологічної відповіді, при застосуванні кондиціонованого середовища не спостерігалася реакції трансплантат проти хазяїна [24]. Кондиціоноване середовище від МСК на відміну від мезенхімальних стовбурових клітин може мати декілька фармацевтичних форм: в рідкому стані, ліофілізованому стані, в стані гелю.

Також к-середовище легко виробляти, транспортувати та зберігати [24]. Цікавим є те, що секретом (всі білки, амінокислоти, цитокіни, хнемокіни, мікроРНК, що продукують МСК в середовище) к-середовища може бути альтернативою при лікуванні деяких захворювань, а саме опікові ураження шкіри, дистрофічні процеси в шкірі (включаючи виразки метаболічного характеру), дефекти слизової оболонки (включаючи лікування тріщин заднього проходу); інволюційно-дистрофічні зміни слизової піхви.

Позаклітинні везикули, що виділяють клітини в культуральне середовище в процесі культивування мають ряд переваг, в порівнянні з мезенхімальними стовбуровими клітинами. Серед цих переваг є нездатність до самовідтворення, що автоматично знижує ризик утворення онкологічних захворювань, можуть активно секретуватися в поживне середовище навіть під час процесу старіння клітинної культури [25, 26].

Перевагою застосування кондиційованого середовища з мезенхімальних стромальних клітин є те, що це готовий біотехнологічний продукт, який можна використовувати для швидкого лікування пацієнтів без попереднього виділення клітин та подальшого їх культивування. К-середовище має властивості пришвидшення загоєння ран, зменшення та перетворення келоїдних рубців в нормотрофічні рубці. Так в своєму дослідженні японські вчені показали, що алогенне к-середовище від МСК можна використовувати місцево та локально при опіках, з метою зменшення запалення шкіри *in vivo*. Також к-середовище посилювало проліферацію епідермісу та глибокої дерми [27]. Також в літературі зустрічаються дані про ефект к-середовища від фотостаріння шкіри, що спричинений ультрафіолетовим випромінюванням. Як показали вчені місцеве застосування к-середовища з МСК виділених кісткового мозку сприяє покращенню проліферативного процесу дермальних фібробластів людини та зниження рівня апоптичних клітин [23].

1.4. Біотехнологічні особливості клітинних культур

В сучасних умовах гостро виникає потреба у виробництві великих об'ємів клітин, які можуть бути застосовані в медицині, для лікування багатьох захворювань, таких як захворювання ендокринної системи, опорно-рухової системи, ішемічні ураження серця і тканин кінцівок. Все це приводить до необхідності нарощування в лабораторних умовах великої кількості клітин для проведення різних клінічних випробувань. Це в свою чергу потребує розробки високоефективних методів виробництва, які дозволили би створити економічно ефективну систему для отримання клітинного продукту, що задовольняє всім вимогам української фармакопеї. Тому останнім часом стало з'являтися все більше наукових публікацій, що описують подібні технології.

Так, dos Santos та колеги [28] запропонували для цілей виробництва великих обсягів клітинної суспензії використовувати біореактори об'ємом на 1 літр і більше з керованим перемішуванням, при використанні мікроносіїв, як субстрат для зростання адгезійних культур мезенхімальних стовбурових клітин. У своєму повідомленні вони наводять отримані ними дані щодо режимів живлення клітинної суспензії, аерації та режимів перемішування клітинної суспензії. Як було показано, в результаті проведеного дослідження їм вдалося повністю зберегти вихідний фенотип клітинної лінії, і наростити отриману біомасу до рівня більш ніж 1 мільярд клітин. Автори даного дослідження також показали, що режим харчування, у вигляді різних схем додавання поживних речовин, не значно впливає на вихід готового продукту. У цьому спостерігалися лише незначні метаболічні відмінності. Однак, слід зазначити, що глибокого та детального аналізу виниклих метаболічних відмінностей культивування не представлено.

Автори іншого дослідження [29] звертають увагу на той факт, що мезенхімальні стовбурові клітини виділені з різних джерел мають різні біологічні властивості, залежно від джерела виділення. Крім того, фізіологічні властивості мезенхімальних стовбурових клітин можуть сильно варіювати в

залежності від складу середовища, в якому проходить культивування обраного типу МСК. У своїй роботі основний наголос дослідники роблять на склад середовища та необхідність додавання сироватки. А як критерій успішності процесу пропонують використовувати такі параметри як швидкість зростання та диференціювання МСК. Вказуючи, що секретом клітин є дуже важливим параметром оцінки якості отриманих культур автори, недостатню увагу приділяють характеристикам секретому клітинних культур, а також таким параметрам як збереження фенотипу клітин в процесі культивування, і проліферативному потенціалу клітин.

На противагу авторам попереднього дослідження, Kang та його колеги [30] наголосили на вивченні та порівнянні поведінки диференціювання мезенхімальних стовбурових клітин різного походження в умовах, коли процеси росту та диференціювання клітин проходять на штучних матрицях, зокрема, на розробленій ними матриці, що містить мальтозо-зв'язуючий білок. Як було показано, залежно від використаних матриць для культивування, мезенхімальні стовбурові клітини показують різний потенціал диференціації, що залежить від матриці клітинної адгезії. У підсумках своєї роботи автори роблять висновок, що для цілей застосування клітин у сучасній медицині саме поведінка диференціювання є важливим способом характеристики одержаних клітинних продуктів. У той самий час, у роботі практично не розглянуті питання продукції секретому використаних клітинних культур.

Багато авторів опублікованих досліджень відзначають, що на кінцевий вихід клітинної продукції впливає багато факторів. Автори цитованої роботи [31] вивчили та порівняли між собою різні методи оцінки якості клітин після культивування. Розглянувши параметри оцінки при використанні тільки камери для підрахунку клітин, або використовуючи метод підрахунку колоній, метод проточної цитофлуориметрії застерігають від невиправданого прямого порівняння результатів досліджень, не враховуючи багато факторів, наприклад, такі як протокол виділення і метод кількісного визначення параметрів клітинної культури. В умовах зростаючого запиту на

автоматизацію біотехнологічного виробництва та отримання стандартизованих культур такі дослідження порушують дуже гостро питання вивчення параметрів культивування клітин із різних джерел для створення біотехнологічного процесу, що параметрично контролюється.

Таким чином, з аналізу доступної нам літератури випливає висновок, що біотехнологічний процес з культивування мезенхімальних стовбурових клітин є мало рандомізованим, залежним від типу джерела виділення клітин. Масштабування біотехнологічного процесу залежить від методів контролю якості отриманих клітинних продуктів, що визначило цілі та завдання даного дослідження.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1. Отримання біоматеріалу

Зразки менструальної крові, клітин похідного нервового гребня, кісткового мозку та жирової тканини були отримані від 3-х здорових жінок донорів віком від 22 до 25 років, що надали добровільно-інформовану згоду на використання їхнього біоматеріалу в наукових цілях. Донори були протестовані на віруси ВІЛ 1/2, гепатити В та С, Епштейна-Барра, та на сифіліс.

Менструальну кров збирали на 2 та 3 день менструації за допомогою менструальної чаші, вміст якої вносили в пробірку з поживним середовищем DMEM high glucose (4500g/l glucose) (Sigma Aldrich, Велика Британія), 5000 МО/мл гепарину (Фармекс, Україна) та 2% Антибіотик/Антимікотик (Gibco).

Перед забором кісткового мозку, жирової тканини та клітин похідного нервового гребня проводилося маркування пробірки куди забирався біоматеріал. Донору в операційній після обробки операційного поля, проводилась місцева анестезія зони де буде проводитися забір. Для анестезії місця доступу використовували розчин 1% лідокаїну.

Забір кісткового мозку проводили за допомогою голки Франка. Отриманий аспірат кісткового мозку у розмірі не менше 20 мл з додаванням 5 мл розчину гепарину (5000 МО/мл) (Фармекс, Україна).

Для забору жирової тканини виконувався розріз шкіри на боковій поверхні черевної стінки. Далі зону ліпоаспірації інфільтрували розчином лідокаїну з адреналіном. Після проведення інфільтрації проводили аспірацію жирової тканини з передньої черевної стінки шприцовим методом із збереженням всіх умов асептики та антисептики. Ліпоаспірат у розмірі мінімум 5 мл розташовували у стерильній ємності, з додаванням 1% розчину антибіотик-антимікотик (Gibco) в PBS.

Забір клітин похідних нервового гребня відбувалося малоінвазивним методом шляхом серії розрізів на відстані 7мм та 9мм до піднебіного краю. Піднебіна тканина представляла собою субепітеліальну сполучну тканинну розміром 5x8мм. Біоматеріал поміщався в транспортне середовище (DMEM/F12 з 5% FBS та 1% антибіотик/антимікотик).

Ємність з менструальною кров'ю, аспіратом кісткового мозку, жировою тканиною та клітинами похідними з нервового гребня закривали та розташовували у контейнері для транспортування, що містив велику кількість льоду.

2.2. Виділення мезенхімальних стовбурових клітин з менструальної крові, похідного нервового гребня, кісткового мозку та жирової тканини

Менструальну кров розбавляли один до третьох розчином DPBS з 5% містом антибіотика/антимікотика (Gibco). Менструальну кров центрифугували при 3200 об/хв 10 хвилин. Надосад утилізували, а осад розбавляли один до третьох розчином DPBS з 5% містом антибіотика/антимікотика (Gibco) та знову центрифугували на тих самих обертах. Концентрацію клітин визначали автоматичним лічильником для клітин Luna. Внесли клітинну суспензію до флаконів з поживним середовищем. Нормальна посадкова щільність є із розрахунку $1 \cdot 10^6$ мононуклеарних клітин на мл поживного середовища.

Кістковий мозок розбавили один до одного середовищем MEM Alpha (Biowest, Франція) та перемішали. Додали розчин гепарину (5000 МО/мл) (Фармекс, Україна). Обережно шприцем на 10 мл, нахиливши пробірку під кутом 45° , внесли по стінці аспірат кісткового мозку з середовищем в завчасно підготовлені центрифужні пробірки з розчином гістопаку з щільність $1,077 \text{ г/см}^3$ (Sigma Aldrich, Велика Британія). Аспірат кісткового мозку центрифугували при 450g 30 хвилин за температури 15°C .

Після центрифугування ми отримали кістковий мозок розділений на такі фракції: плазма, мононуклеарні клітини, гістопак та еритроцити. Надосад у вигляді плазми та осад з еритроцитів відібрали на утилізацію. Клітинну суспензію мононуклеарних клітин у вигляді білої борозни над гістопаком разом з плазмою перенесли в іншу центрифужну пробірку з однократним розчином DPBS та ще раз відцентрифугували при 350g 15 хвилин. Концентрацію клітин визначали автоматичним лічильником для клітин Luna. Внесли клітинну суспензію до флаконів з поживним середовищем. Нормальна посадкова щільність є із розрахунку $1 \cdot 10^6$ мононуклеарних клітин на мл поживного середовища.

Ліпоаспірат інтенсивно промивали стерильним розчином Хенкса без кальцію та магнію. Для руйнування позаклітинного матриксу, жирову тканину на протязі 40-60 хв інкубували в шейкері-інкубаторі при 37°C, 100 обертів на хвилину з 0,2% розчином колагенази другого типу в співвідношенні 1 частина колагенази на 2 частини жирової тканини.

Після інкубації ферментативну активність нейтралізували додаванням 2 мл чистої ФБС та додаванням середовища DMEM/F12 (Sigma Aldrich, Велика Британія), що містить 10% фетальну бичачу сироватку (Sigma Aldrich, Велика Британія). Центрифугували первинну суспензію при 4°C 800 g 10 хв, що призвело до розділення її на дві фракції.

У верхньому світлому шарі розташовувалися адипоцити, а в осаді — клітини СВФ жирової тканини з домішками гемопоетичних клітин. Після чого стромально-клітинне фракцію центрифугували при 4°C 800 g 10 хвилин. Концентрацію клітин визначали автоматичним лічильником для клітин Luna. Внесли клітинну суспензію до флаконів з поживним середовищем із розрахунку $1 \cdot 10^6$ мононуклеарних клітин на мл поживного середовища.

Шматочок тканини нервового гребеня промивали в розчині Хенкса вільного від іонів магнію та кальцію з додаванням 5% розчину антибіотик/антимікотик (Gibco). Для ферментативного розщеплення тканини додали ферментний коктейль до складу якого входили трипсин, гіалуронідаза

та диспаза 1 типу. Інкубували нервовий гребінь протягом 30 хвилин на шейкері-інкубаторі зі швидкістю 200 обертів на хвилину при температурі 37°C.

Ферментну дисоціацію інактивували середовищем DMEM/F12 (Sigma Aldrich, Велика Британія) з 10% вмістом ФБС (Sigma Aldrich, non-USA). Дисоційовану клітинну суспензію центрифугували при 450g 10 хвилин. Концентрацію клітин визначали автоматичним лічильником для клітин Luna. Внесли клітинну суспензію до флаконів з поживним середовищем із розрахунку $1 \cdot 10^6$ клітин на мл поживного середовища.

2.3. Культивування мезенхімальних стовбурових клітин людини

Мезенхімальні стовбурові клітини виділені з менструальної крові, кісткового мозку, жирової тканини, клітин похідних нервового гребня культивувалися в культуральному середовищі на основі комерційного безсироваткового середовища STEMPRO (StemCell Corporation, США), 4 нг/мл FGF-2 та 1% антибіотик/антимікотик (Gibco, США) за стандартних умов при 37°C, 5% CO₂, 18% O₂ та 95 % вологості.

Культуральне середовище змінювали кожні 3-4 дні. При досягненні 90% конфлюентного шару, клітини пасували з використанням 0,05% розчину трипсин/ЕДТА (Gibco, США). Всі експерименти проводили на клітинах від 12 донорів (по 3 донора на кожен біоматеріал) від першого по дев'ятий пасаж.

2.4. Флуоресцентне забарвлення мезенхімальних стовбурових клітин акридиновим оранжевим

Мезенхімальні стовбурові клітини, що виділені з різних джерел при досягненні 90% конфлюентного шару трипсинізувалися 0,05% розчином трипсин/ЕДТА (Gibco, США). МСК висаджували на чашки Петрі розміром

30мм з концентрацією клітин $2 \cdot 10^4$. Культивували мезенхімальні стовбурові клітини виділені з менструальної крові, нервового гребня, жирової тканини та кісткового мозку 48годин. Після закінчення терміну культивування, відбиралося поживне середовище, клітини промивали двічі $1 \times DPBS$ (Biowest, Франція) та фіксували в 10% забуференому нейтральному формаліні 30 хвилин. Відмивали клітини від фіксатора двічі $1 \times DPBS$ (Biowest, Франція) та вносили по 2мл барвника акридинового оранжевого в концентрації 0,2мкг/мл на 2хв. Після чого клітини промивали дистильованою водою та висушували на повітрі в темному місці. Забарвлені клітини аналізували на флуоресцентному мікроскопі Leica DM 2000LED.

2.5. Диференціювання мезенхімальних стовбурових клітин в адипогену, остеогену та хондрогену напрямленнях

МСК виділені з менструальної крові, нервового гребня, кісткового мозку, жирової тканини висівали в концентрації $3 \cdot 10^4$ на лунку в 12-лунковий планшет (Starsted) з об'ємом 2 мл комерційного культурального середовища. Для диференціювання в адипогену напрямленні використовували Human Adipocyte Differentiation Medium (Cell Applications, США). Для диференціювання в остеогену напрямленні було використане середовище Human Osteoblast Differentiation Medium (Cell Applications, США). Для диференціювання в хондрогену напрямленні було використане середовище Human Osteoblast Chondrocyte Medium (Cell Applications, США). Культуральне середовище змінювали кожні 3 дні протягом 14 діб.

Аналіз диференціювання на адипоцити проводили за допомогою забарвлення специфічним барвником Oil-Red-O. Клітини фіксували в 10% нейтральному, забуференому формаліні не менше 30 хв. Промивали двічі

DPBS та вносили на 5 хвилин 70% етанол. Інкубували клітини з 0,5% барвником Oil-Red-O 30 хвилин. Продиференційовані МСК промивали двічі DPBS та аналізували зображення.

Остеогенне диференціювання МСК перевіряли барвником алізариновий червоний. Клітини фіксували в 10% нейтральному, забуференому формаліні не менше 30 хв. Промивали тричі дистильованою водою та вносили барвник на 30 хвилин. Продиференційовані МСК промивали двічі дистильованою водою та аналізували зображення.

Другим методом диференційного забарвлення МСК була виявлення лужної фосфатази в остеобластах за допомогою ВСІР/НВТ. Клітини фіксували 1,5 хвилини в 0,1% нейтральному забуференому формаліні. Промивали клітини 1х DPBS без Ca^{2+} та Mg^{2+} з 0,05% Tween20. Після додавали розчин субстрату ВСІР/НВТ на 8 хвилин. Промивали клітини 1х DPBS без Ca^{2+} та Mg^{2+} з 0,05% Tween20 та аналізували зображення.

МСК, що диференціювалися в хондробласти забарвлювали толуїдиновим блакитним. Клітини фіксували в 10% нейтральному, забуференому формаліні не менше 30 хв. Промивали двічі DPBS та забарвлювали 1% розчином толуїдинового блакитного.

2.6. Визначення рецепторного профілю мезенхімальних стовбурових клітин за допомогою проточної цитофлуориметрії

Імунофенотипування мезенхімальних стовбурових клітин виділених з кісткового мозку, жирової тканини, менструальної крові та нервового гребеня було здійснено методом проточної цитофлуориметрії на приладі CytoFLEX S V4-B2-Y0-R3 (Beckman Coulter, Китай). Імунофенотипування клітин мезенхімального ряду відбувалося маркерами до рецепторів, характерних для мезенхімальних стовбурових клітин: CD73+, CD90+, CD105+, CD44+, також

проводився аналіз клітинних популяцій на відсутність таких маркерів CD45-, CD34-, HLA-DR- на суспензії дезагрегованих клітин.

Після досягнення МСК конфлюенту, адгезовані клітини знімали з використанням розчину 0,05% розчину трипсин/ЕДТА («Gibco», США). Клітини центрифугували протягом 5хв при 450 g в буфері DPBS (Biowest, Франція). Підрахунок кількості живих клітин здійснювали на автоматичному лічильнику клітин Luna-F1 (Logos Biosystem). На один зразок концентрація клітин становила – $5 \cdot 10^5$ кл/мл. Для мічення маркерів, клітини інкубували з моноклональними антитілами кон'югованими із флюорохромами: Mouse Anti-Human CD73 APC (BD Pharmingen, США); Mouse Anti-Human CD90 FITC (BD Pharmingen, США); Mouse Anti-Human CD105 V450 (BD Pharmingen, США). Для перевірки клітин на життєздатність використовували реагент 7AAD (Beckman Coulter, США). Клітини інкубували з антитілами протягом 20 хв при кімнатній температурі у темряві. Концентрація МСК у зразку на 1 тест становила $5 \cdot 10^5$ клітин на 100 мкл. У процедурі використовується 100 мкл зразка, попередньо розведеного.

Імунофенотипування проводили на приладі CytoFLEX S V4-B2-Y0-R3 (Beckman Coulter, Китай), що оснащений трьома лазерами (з довжиною хвилі 405нм, 488нм, 638нм), з використанням програми CytExpert (Beckman Coulter, Китай). Аналіз популяцій проводили на таких каналах з довжиною емісії FITC – 525/40, APC - 660/40 та V450(PV) - 450/42 нм. Кількість клітин, що експресувала білок була пропорційною інтенсивності флуоресценції. При великій кількості позитивних клітин на певний маркер спостерігався зсув клітин по осі X. Ми реєстрували 5 000 подій при аналізі на проточному цитометрі, кожна подія відповідала 1 клітині. Через програму CytExpert (Beckman Coulter, Китай) проводився статистичний аналіз та обрахунок клітин, що позитивні та негативні на певний маркер.

2.7. Дослідження клітинного циклу МСК за різного часу культивування (7, 14 та 21 день)

Мезенхімальні стовбурові клітини з різного джерела походження культивувалися без заміни культурального середовища 7, 14 та 21 день (табл. 2.1). Після закінчення терміну культивування ми відбирали к-середовища на дослідження загальної концентрації білку за методом Бредфорда, а клітини промивали фізіологічним розчином, додавали 0,05% розчину трипсин/ЕДТА («Gibco», США). Після дезагрегації клітини центрифугували протягом 5хв при 450 g в Alpha MEM («Biowest», Франція). Частина клітин ми висаджували на 2 флакони для подальшого культивування в умовах експерименту із постійною заміною і без заміни культурального середовища і при досяганні моношару знімали клітини за описаною методикою вище та також досліджували на клітинний цикл. Другу частину клітин ми досліджували на клітинний цикл. Ми фіксували клітини за допомогою фіксуючого розчину (Beckman coulter) протягом однієї години. Потім центрифугували при 450 g 5хв та відбирали супернатант. До клітинного осаду було додано 5мл 70% етилового спирту за постійного перемішування на вортексі для премобілізації клітин, пробірки з клітинами поміщали в морозильну камеру та за температури -20°C зберігали 6 годин. Після цього промивали клітини двічі DPBS (Biowest, Франція) за допомогою центрифуги при 450 g 5хв. До отриманого осаду додавали 500мкл фарбуючого розчину PI/RNase (Beckton Dickenson) та інкубували клітини протягом 20хв при кімнатній температурі в темряві. Аналізували клітинний цикл за допомогою проточного цитометра на червоному лазері з довжиною фільтра 660nm.

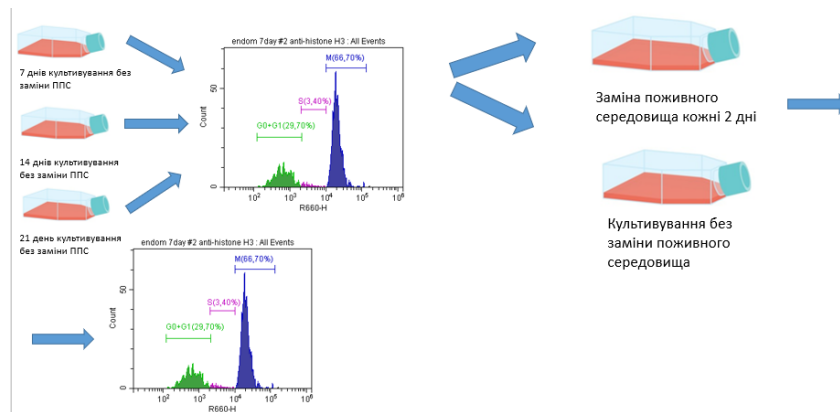


Рис.2.1. Схема експерименту з дослідження клітинного циклу при безперервному культивуванні 7, 14 та 21 день

2.8. Отримання кондиційованого середовища від культури мезенхімальних стовбурових клітин людини

Було отримано 4 види кондиційованого середовища (к-середовище) від мезенхімальних стовбурових клітин з різного джерела походження, зокрема від кісткового мозку, жирової тканини, менструальної крові та нервового гребня. Для отримання кондиційованого середовища, на першому етапі МСК культивували за стандартних умов, що наведені вище. Для отримання к-середовища МСК інкубувалися без заміни середовища 7, 14 та 21 діб. Після 7 днів, 14 днів та 21 дня культивування к-середовище відбиралося, фільтрувалося через фільтри з розміром пор 100мкм, 70мкм та 0,44мкм для того аби очистити к-середовище від клітинного дебрису. Зберігалося кондиційоване середовище в стерильній ємності, в холодильнику при +4°C.

Також ми отримали кондиційоване середовище з кожного пасажу МСК отриманих з різних джерел для подальшого імуноферментного аналізу на білки. Так ми відібрали з першого по дев'ятий пасаж к-середовище від МСК виділених від менструальної крові, кісткового мозку, жирової тканини, нервового гребня. Ми отримали 36 зразків к-середовища, що відбиралося після 7 діб культивування МСК без заміни середовища. Кондиційоване середовище

пропускалося через фільтри з розміром пор 100 мкм, 70 мкм та 0,44 мкм та зберігалось в холодильнику при +4°C.

2.9. Визначення концентрації білка в кондиційованому середовищі за Бредфордом

Для кількісного визначення сумарної кількості білка в кондиційованому середовищі був використаний колориметричний тест за Бредфордом. Для побудови калібрувальної кривої використовували бичачий сироватковий альбумін (БСА) в фосфатному буфері в концентрації 0,1; 0,25; 0,5; 0,75; 1; 1,25 та 1,4 мкг/мл. Приготували зразок білка з кондиційованого середовища та внесли по 5мкл к-середовища до 96-лунки (TPP, Китай) з кількістю повторів 5 разів. Внесли до 96-лунки 250мкл реагенту Бредфорда та перемішали на шейкері (Biosan, Латвія). Інкубували планшет при кімнатній температурі 20хв. Вимірювання оптичної густини проводилося на приладі Microplate photometer MPP-96 (Biosan, Латвія) при довжині хвилі 620нм. Прорахували середнє арифметичне та підставили рівняння для визначення оптичної густини, що підходить до калібрувальної кривої і виражали значення в мкг/мл.

2.10. Визначення білкового складу кондиційованого середовища

Для оцінки білкового складу кондиційованого середовища отриманого від МСК був використаний метод імуноферментного аналізу, що був проведений на приладі Microplate photometer MPP-96 (Biosan, Латвія).

Для визначення кількості ростових факторів серед яких FGF-2, VEGF, EGF, M-CSF використовували комерційні набори (Wuhan Fine Biotech Co, Китай).

Кількість ростових факторів визначали за принципом «непрямого» твердофазного ІФА у триетапній інкубації. У лунках мікропланшету попередньо засорбовані антитіла для захоплення ростових факторів. Під час першої інкубації присутні в досліджуваних зразках ростові фактори зв'язуються із засорбованими антитілами на твердій фазі. Лунки відмиваються для видалення незв'язаних компонентів. Після цього додаються зв'язані з біотином антитіла, що приєднуються до сформованих раніше комплексів. Далі відбввається повторна відмивка та третя інкубація, під час якої до лунок додається кон'югат стрептавідину з пероксидазою хрому. Незв'язані компоненти видаляються під час відмивання. Комплекси виявляються шляхом додавання розчину хромогену 3,3',5,5'-тетраметилбензидину (ТМБ), який під дією пероксидази хрому надає синє забарвлення розчину. Після інкубації протягом 10-20 хвилин реакція зупинялася додаванням стоп-реагенту. Оптична густина (ОГ) в лунках визначалася на спектрофотометрі при довжині хвилі 450нм. Інтенсивність жовтого забарвлення пропорційна кількості фактору росту наявного в досліджуваних зразках. Завдяки наявності в наборі стандарту для побудови калібрувальної кривої, можна кількісно обрахувати концентрацію ростових факторів у досліджуваних зразках.

2.11. Статистичні методи

Статистична обробка результатів була здійснена за допомогою програм Excel (MS Office 2010). Дані представлені у вигляді середнього арифметичного значення із зображенням стандартного відхилення (\pm SD). За допомогою рангового критерію Уїлкоксона-Манна-Уїтні було порівняно середнє значення двох груп. За критичний рівень достовірності при перевірці статистичних гіпотез приймали $*p \leq 0,05$. Кожен експеримент повторювали не менше трьох разів.

РОЗДІЛ 3

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ОБГОВОРЕННЯ

3.1. Порівняльна характеристика мезенхімальних стовбурових клітин отриманих з різних джерел

Мезенхімальні стовбурові клітини – це мультипотентні стовбурові клітини, що здатні до самовідновлення, саморегуляції, хоумінгу. Також МСК властиве достатньо швидке розмноження із середнім коефіцієнтом приросту 2.6, клітини є імуносупресивними та не стимулюють негайної імунної відповіді [32]. Насьогодні клітинна терапія в основному зав'язана на лікуванні чистими мезенхімальними стовбуровими клітинами, що виділені з різних джерел, зокрема кістковий мозок, жирова тканина, нервовий гребінь. Важливим є пошук нових та оптимізація старих способів виділення та культивування МСК для отримання більш однорідної популяції клітин, що несе завідомо клітини з фенотипом мезенхімальних стовбурових клітин. Також важливо, аби з процесом культивування, що супроводжується пасажуванням не втрачалася мезенхімальність клітин, здатність до проліферації та зменшити накопичення активних метаболітів, що призводить до старіння клітин. Важливо стандартизувати метод виділення та культивування аутологічних та алогених мезенхімальних стовбурових клітин для промислового біотехнологічного виробництва. Адже МСК є найбільш вивченим стовбуровими клітинами дорослого організму, які використовуються при лікуванні таких захворювань, як цукровий діабет, ішімізована кінцівка, остеоартрит, некротичні процеси суглобів, реакція трансплантат проти хазяїна та інші. Стандартизація методу виділення та культивування МСК для промислового автоматизованого біотехнологічного виробництва є важливою проблемою, адже якість та кількість стовбурових клітин різко залежить від віку донора, супутніх захворювань та ліків, що приймає донор. Алогені МСК, що виділені з біоматеріалу від гарно

підбраного донора несуть за собою високу продукцію стовбурових клітин, що забезпечить правильну трансплантаційну дозу. Також алогені МСК від здорових донорів дають можливість пошуку альтернативи джерела для виділення МСК з високим проліферативним потенціалом та з низьким потенціалом до старіння та накопичення метаболітів в клітинах, що і є найбільш розповсюдженою проблемою масштабування біотехнологічного процесу по вирощуванню стовбурових клітин для клітинної терапії [33]. В цій роботі ми порівнюємо якість мезенхімальних стовбурових клітин виділених з різних джерел, біологію поведінки клітин та біохімічні характеристики клітин (культурального середовища від МСК) для терапевтичного біопроектингу.

Незалежно від метода виділення та культивування мезенхімальні стовбурові клітини мають бути стандартизованими та відповідати певним критеріям. Так МСК можуть диференціюватися в такі види клітин, як остеобласти, хондробласти та адипоцити. При культивуванні клітин, отриманих з ендометрію, кісткового мозку, жирової тканини, нервового гребня, в середовищі, що підтримує недеференційованність МСК, ми отримали популяцію клітин, що мала фібробластоподібну форму, незалежно від джерела походження з характеристиками МСК, що визначенні критеріями Міжнародної спільноти з клітинної терапії (International Society for Cellular Therapy Statement).

На цьому етапі роботи важливо було дослідити ріст та динаміку клітинної культури людини різного джерела походження в однакових умовах. Крім того метою етапу було отримання даних щодо можливостей старіння культури та оцінки її за допомогою фенотипування на проточному цитометрі. Так було досліджено 4 види культури від 12 здорових донорів (менструальна кров, кістковий мозок, жирова тканина, нервовий гребінь), що піддавалися довготривалому культивуванню з пасажуванням культури (метод адгезії до пластику для виділення) при досягання 90% конфлюентності. Було отримано культури з першого по дев'ятий пасаж та проаналізовано за допомогою інвертованого мікроскопа на морфологічні особливості культури та

досліджено на проточному цитометрі клітини на предмет експресії маркерів мезенхімальності, а зокрема на CD73+, CD90+, CD105+.

Морфологічні характеристики мезенхімальних стовбурових клітин не відрізнялися за своїм морфотипом в межах одного джерела від різних донорів. В цілому можна було спостерігати три форми мезенхімальних стовбурових клітин незалежно від джерела отримання МСК. Культура МСК виділених з менструальної крові характеризується моношаровим розповсюдженням клітин на підложці з різнонаправленим характером росту, утворюючи пучки інклюзії, а також області з частковим черепковим нашаруванням клітин. Клітини візуалізуються як веретеноподібні, однак дана культура характеризується як найбільш мультиморфна в порівнянні з іншими культурами, з клітинами різної форми, починаючи від веретеноподібних і закінчуючи майже пірамідальною формою. Ядра клітин, також варіабільні по розмірам, формі та розташуванню. Частіше за все округлі, витягнуті, світлі, що містять 2-5 ядерць. Для окремих клітин характерне перенуклеарне просвітлення, а в більшості спостерігається ущільнення цитоплазми в області ядер, за рахунок конденсації дрібних гранул. Цитоплазма клітин більш світла, спостерігають філаментні структури, а також дрібна та середня грануляція (Рис.3.1.А, Рис.3.2.А).

Культура жирової тканини представлена моношаровим розташуванням клітин. В окремих ділянках культури спостерігалось скупчення клітин, що формувало колонії специфічної форми зірки. Характер росту клітин направлений ацинальний. Форма клітин переважно веретеноподібна, з переважним потовщенням та витонченням до країв, іноді саблеподібна. В окремих випадках форма клітин наближається до витягнутої трикутної, а іноді набуває потовщеної форми. Зустрічаються клітини округлої форми з пікнотичним ядром. Для даного типу культури характерна наявність островків розпластаних клітин. Ядро округлої форми з 2-3 ядерцями. Ядро розташоване ексцентрично, цитоплазма містить дрібні включення. В окремих клітинах спостерігалась мітотична активність (Рис.3.1.Г, Рис.3.2.Г).

Культура мезенхімальних стовбурових клітин з кісткового мозку представлена моношаровим розташуванням клітин, при цьому багат шаровість для цієї культури не характерна. Характер росту клітин на підложці філаментний та направлений. Форма клітин веретеноподібна, з перенуклеарним потовщенням, що зміщене до країв клітини. Ядро розташовано центрально, практично без зміщень. В окремих місцях клітинної культури зустрічають клітини пірамідальної форми з центрально розташованим ядром та клітини округлої форми. В цілому для цієї культури характерна мультиформність клітин. Ядра клітин оптично порожні, містять частіше 2-3 ядерця. Цитоплазма в умовах поляризаційного фазового контрасту виглядає більш темною та контрастною (Рис.3.1.В, Рис.3.2.В).

Культура клітин нервового гребня характеризується моношаровим розташуванням клітин на культуральному пластику з направленим характером росту. Клітини візуалізуються як веретеноподібні з перенуклеарним потовщенням та зі збільшенням довжини проксимальних кінців, що витягнуті в тонку нитку. Для даної культури характерна помірна мультиморфність, як за розмірами так і за формою клітин. Характер розташування клітин дуже щільний. Звертає на себе увагу перенуклеарне затемнення та просвітлення ділянки цитоплазми та її проксимальних ділянок. Ядра переважно злегка витягнуті, темні з декількома ядерцями (Рис.3.1.Б, Рис.3.2.Б).

Кількість колоній після виділення МСК з менструальної крові, нервового гребня та кісткового мозку поступово збільшувалася, так 90% конфлюентного шару було досягнуто на 24, 22 та на 30 добу культивування відповідно. Проте після другого посіву клітини виділені з менструальної крові та нервового гребня досягали моношару протягом 4-5 днів. Натомість динаміка росту МСК з кісткового мозку була найнижчою серед інших культур і становила формування 90% конфлюентного шару протягом 12-14 діб. Мезенхімальні стовбурові клітини, джерелом яких була жирова тканина, максимально швидко в порівнянні з іншими культурами досягли 90% конфлюентного шару

за 7 днів культивування. Характерним є те, що динаміка швидкого росту МСК з жирової тканини зберіглася до 9 пасажу.

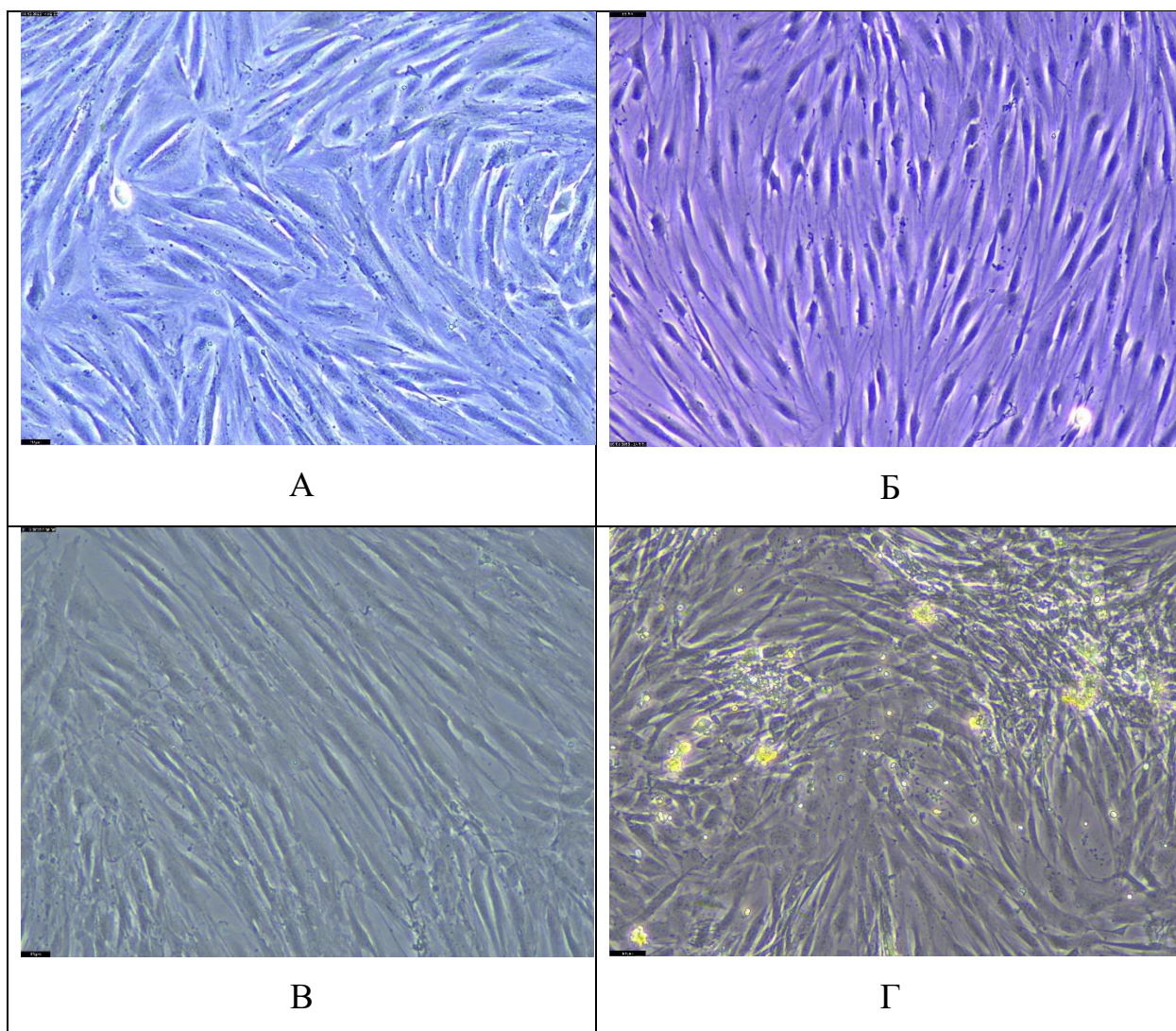


Рис.3.1. Морфологія клітинної культури мезенхімальних стовбурових клітин виділених з А) менструальної крові, Б) нервового гребня, В) кісткового мозку, Г) жирової тканини. Інвертований мікроскоп Leica, об'єктив 20х, окуляр 10х.

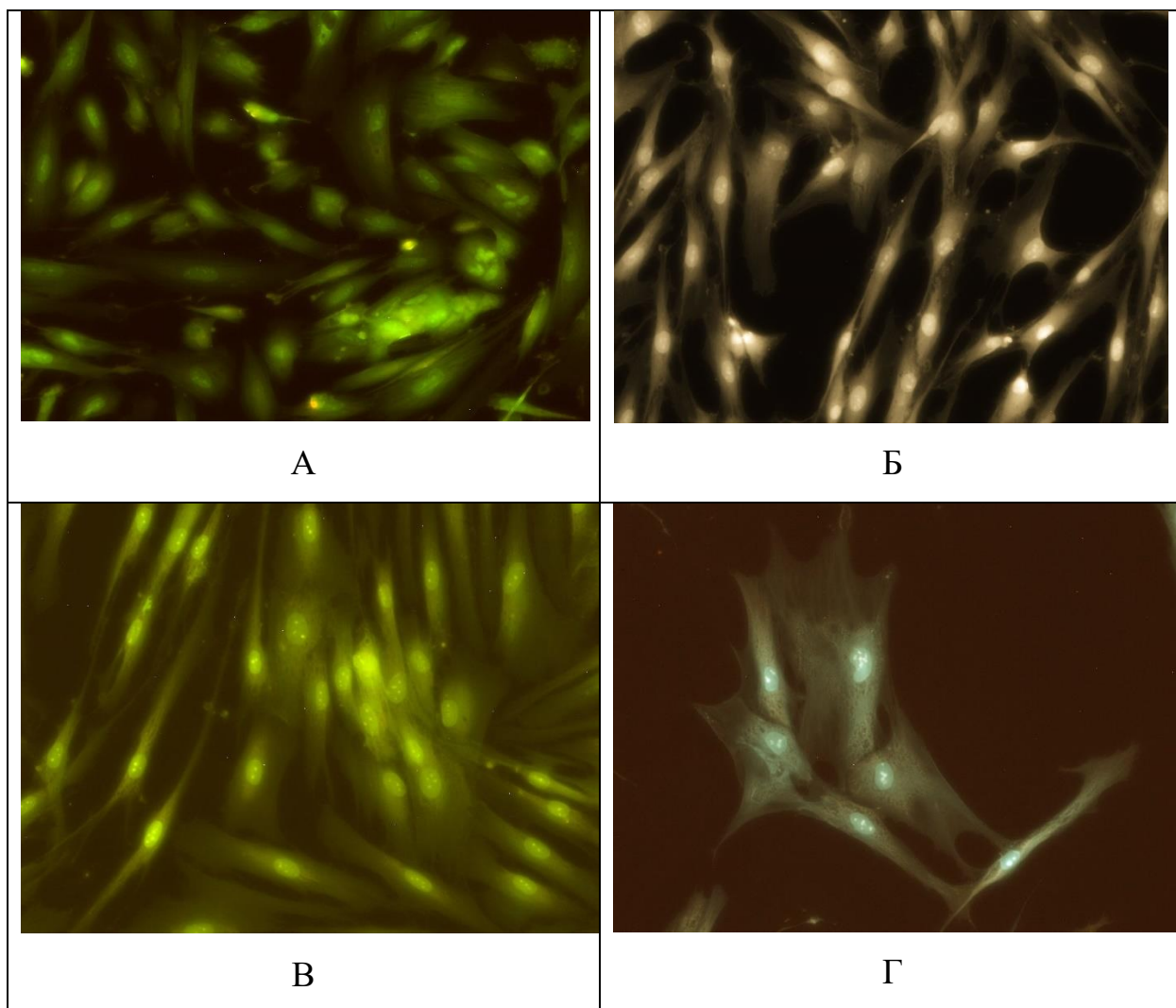


Рис.3.2. Мікрофотографія клітинної культури мезенхімальних стовбурових клітин виділених з А) менструальної крові, Б) нервового гребня, В) кісткового мозку, Г) жирової тканини. Флуоресцентний мікроскоп Leica LED2000, об'єктив 20х, окуляр 10х.

Наступним методом, яким ми давали характеристику мезенхімальним стовбуровим клітинам була проточна цитометрія. Так, було показано, що незалежно від джерела отримання клітин та метода виділення (метод експлантів, метод диференційного центрифугування та метод жорсткого центрифугування) всі клітини несуть маркери мезенхімальних стовбурових клітин в середньому більше ніж 96% стабільно. Якщо ж дивитися експресію маркерів МСК по пасажах, то стовбурові клітини, що виділені з менструальної крові з першого по дев'ятий пасаж несуть на собі експресію маркерів CD73+ в

середньому в 98,4% клітинах, CD90+ в середньому 98,2% клітин, а CD105+ 97,4% клітин (Рис.3.3.). Якщо ж розглядати експресію маркерів мезенхімальних стовбурових клітин по пасажах то на 6 та 7 пасажах спостерігалася варіація в експресії клітин маркерів. Зокрема на 6 пасажі лише експресія маркеру CD105+ знижується на 7%, проте на 7 пасажі експресія маркерів CD90+ та CD105+ зменшилася на 10% та 13% відповідно в клітинах. Так зменшення експресії стовбурових маркерів може свідчити про втрату потенціалу клітин бути стовбуровими. МСК мають обмежену кількість поділів в культурі *in vitro*, так з певним часом культивування клітини починають старіти. Також у мезенхімальних стовбурових клітинах зустрічається явище спонтанної диференціації клітин. Старіння, диференціація, втрата фенотипу стовбуровості може додатково ще супроводжуватися зміною морфології клітин, зниженням швидкості проліферації. Так старіння клітин та втрата фенотипу їх стовбуровості може спостерігатися не лише на пізніх пасажах, але й на первинних. Так після періоду нормально росту клітини можуть перестати проліферувати та почати втрачати білки на поверхні клітин [34].

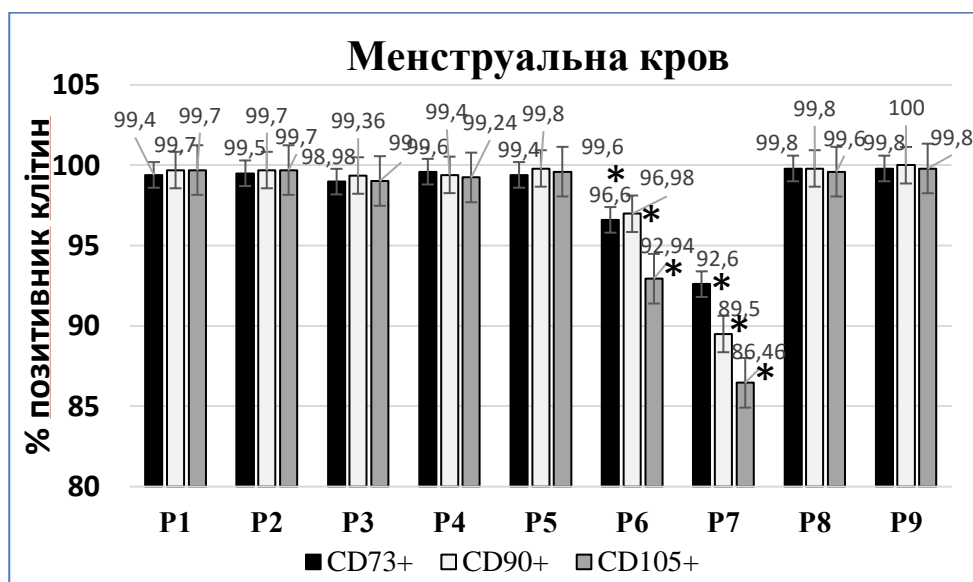


Рис.3.3. Порівняння показників популяцій по пасажах мезенхімальних стовбурових клітин виділених з менструальної крові, проточна цитометрія, фільтр 585/42 із довжиною хвилі емісії при 575 нм. *P≤0,05- в порівнянні з попереднім пасажем

Клітини, що виділені з нервового гребня мають позитивну реакцію на білок мезенхімальності CD73+ в середньому в 98,4% клітинах, CD90+ в середньому 98,2% клітин, а CD105+ 98,6% клітин (Рис.3.4.). Протягом всього культивування стовбурові клітини джерелом, яких був нервовий гребінь, мали стабільний фенотип. Проте на 4 пасажі кількість МСК, що несуть на собі заякорені мембранні білки CD73+ та CD90+ та трансмембранний протеїн CD105+ незначно падають, в середньому на 6%. З наступними пасажами тенденція до зменшення білків мезенхімальності не зберігається як в МСК, що виділені з менструальної крові так і в МСК з нервового гребня (рис.3.3. та 3.4.). Адже на 9 пасажі МСК активно продовжували ділитися та зберігалася експресія на маркери CD73+, CD90+, CD105+.

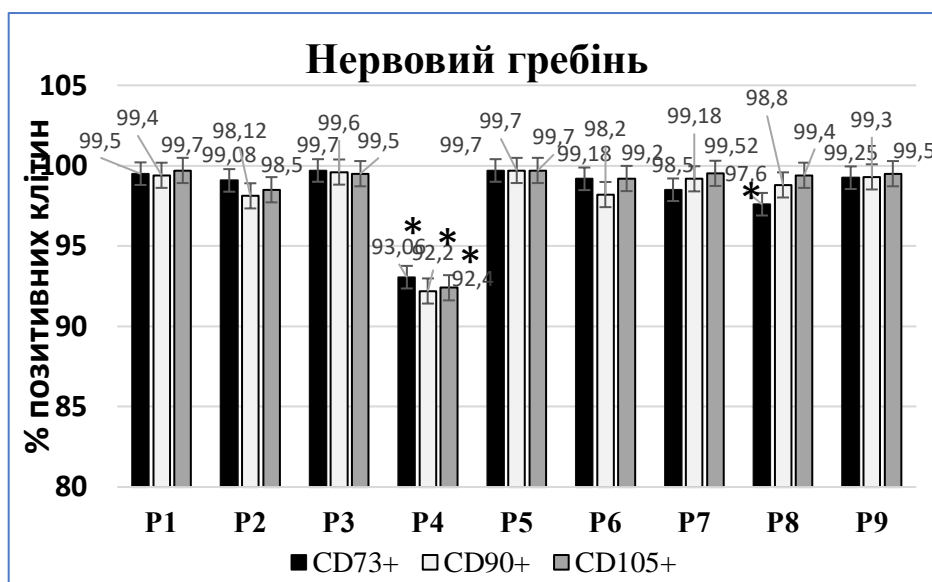


Рис.3.4. Порівняння показників популяцій по пасажах мезенхімальних стовбурових клітин виділених з нервового гребня, проточна цитометрія, фільтр 585/42 із довжиною хвилі емісії при 575 нм. *P≤0,05- в порівнянні з попереднім пасажем.

Мезенхімальні стовбурові клітини, що виділені з кісткового мозку позитивні на маркери CD73+ в середньому в 97,11% клітинах, CD90+ в середньому 98,4% клітин, а CD105+ 99,6% клітин (Рис.3.5). На першому пасажі експресія маркеру CD73+ була найменшою серед всіх клітин на різних

пасажах. Так 10% мезенхімальних стовбурових клітин не були позитивними на маркер CD73+. Це можна пояснити з тим, що вік та стать донорів може грати велику роль в фенотипі клітин [35].

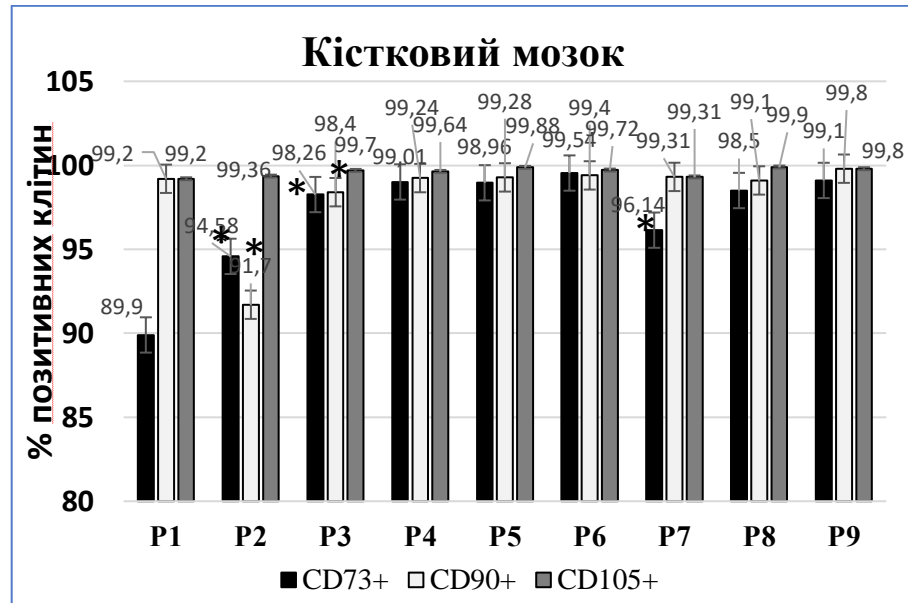


Рис.3.5. Порівняння показників популяцій по пасажам мезенхімальних стовбурових клітин виділених з кісткового мозку, проточна цитометрія, фільтр 585/42 із довжиною хвилі емісії при 575 нм. *P<0,05- в порівнянні з попереднім пасажем.

Позитивна експресія маркерів CD73+ в середньому в 99,2% клітинах, CD90+ в середньому 99,2% клітин, а CD105+ 99,6% клітин джерелом виділення яких є жирова тканина (Рис.3.6.). Зокрема, протягом всього культивування фенотип мезенхімальних стовбурових клітин є стабільним з першого по дев'ятий паж.

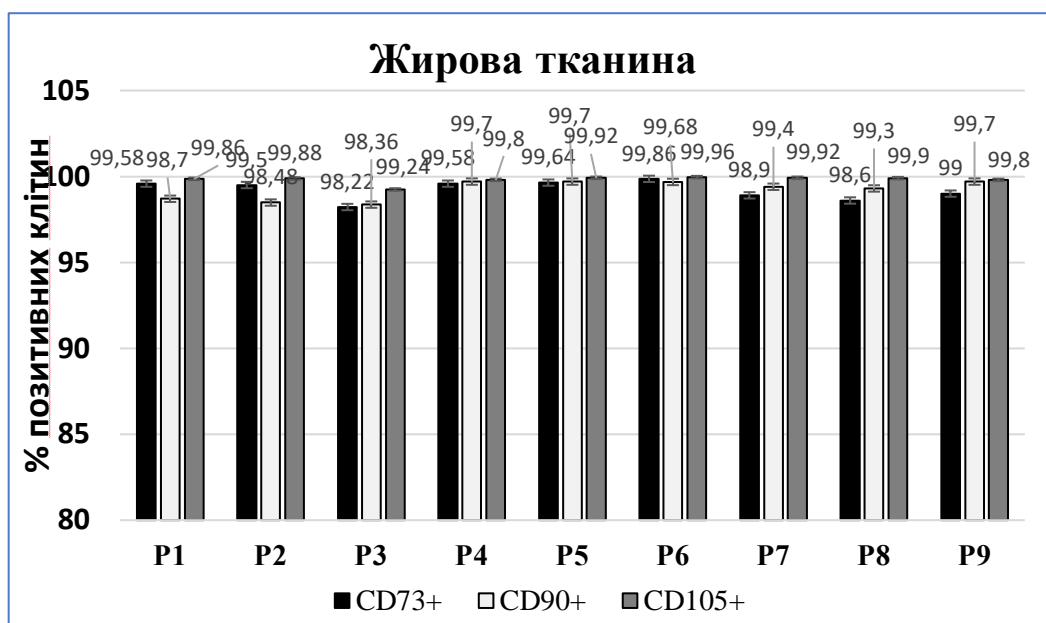


Рис.3.6. Порівняння показників популяцій по пасажах мезенхімальних стовбурових клітин виділених з жирової тканини, проточна цитометрія, фільтр 585/42 із довжиною хвилі емісії при 575 нм.

Якщо ж розглядати культури по пасажах та порівнювати з клітинами виділеними з різних джерел, то спостерігається подібність між культурами. Так видно, що на перших пасажах, порівняно з іншими культурами, МСК виділені з кісткового мозку мають найменшу кількість клітин позитивних на білки CD73+, CD90+, CD105+. Це можна пояснити тим, що джерело отримання МСК, а саме кістковий мозок є різномірною тканиною, що містить в собі не лише попередники мезенхімальних стовбурових клітин, а й попередників мієлоїдного та лімфоїдного ряду. Характерним є те, що кістковий мозок багатий на гемопоетичні стовбурові клітини, що не можна сказати про мезенхімальні стовбурові клітини, адже їх відсоток, який міститься в кістковому мозку складає 0,001-0,01% від загальної кількості [36]. Процес виділення МСК базується на здатності МСК до адгезії на відміну від гемопоетичних клітин. Проте необхідний час, аби з пасажуванням всі клітини гемопоетичного ряду відмилися та втратили остаточно здатність прикріплення до субстрату. Цим можна пояснити такий результат проточної цитометрії, де

спотерігається найменша кількість клітин, що позитивні за маркерами мезенхімальних стовбурових клітин.

Якщо ж говорити про самі стабільні за фенотипом мезенхімальні стовбурові клітини, то ними будуть за даними проточної цитометрії клітини, що виділені з жирової тканини. Так порівняно з іншими культурами, ці клітини є найменш вразливими щодо умов *in vitro*.

Отримані результати свідчать, що незалежно від джерела виділення МСК, клітини були позитивними за маркерами мезенхімальності, а саме CD73+, CD90+, CD105+. Крім того, було отримано підтвердження динаміки росту, що спостерігалася в культурах по пасажах, а саме зберігаються сформовані диференційні маркери з першого по дев'ятий пасаж в МСК, що виділені з менструальної крові, нервового гребня, кісткового мозку та жирової тканини. На фенотиповому рівні ми не спостерігали старіння культури МСК жодного джерела виділення з першого по дев'ятий пасаж. Вважаємо, що описані дані демонструють, що для біотехнологічного виробництва для використання в клітинній терапії неважливо з якого джерела виділяти мезенхімальні стовбурові клітини, адже в середньому, що менструальна кров, нервовий гребінь, жирова тканини, кістковий мозок демонструють схожі результати між собою. Всі пули клітин виділені з різних джерел відповідають до одного з трьох мінімальних критеріїв для мезенхімальних стовбурових клітин визначеним Міжнародною спільнотою клітинної терапії.

3.2. Багатолінійний потенціал до диференціації ізольованих мезенхімальних стовбурових клітин

Для підтвердження того, що мезенхімальні стовбурові клітини мають потенціал до диференціювання клітин, МСК виділені з менструальної крові, нервового гребня, кісткового мозку та жирової тканини стимулювали для

проходження диференціювання в різних напрямках, таких як адипогенній, хондрогенній та остеогенній.

За результатами диференціювання МСК, що виділені з чотирьох джерел успішно продиференціювалися у всіх трьох напрямках (Табл.3.1.).

Таблиця 3.1

Порівняння потенціалу мезенхімальних стовбурових клітин до диференціації в різних напрямленнях у вигляді бальної шкали

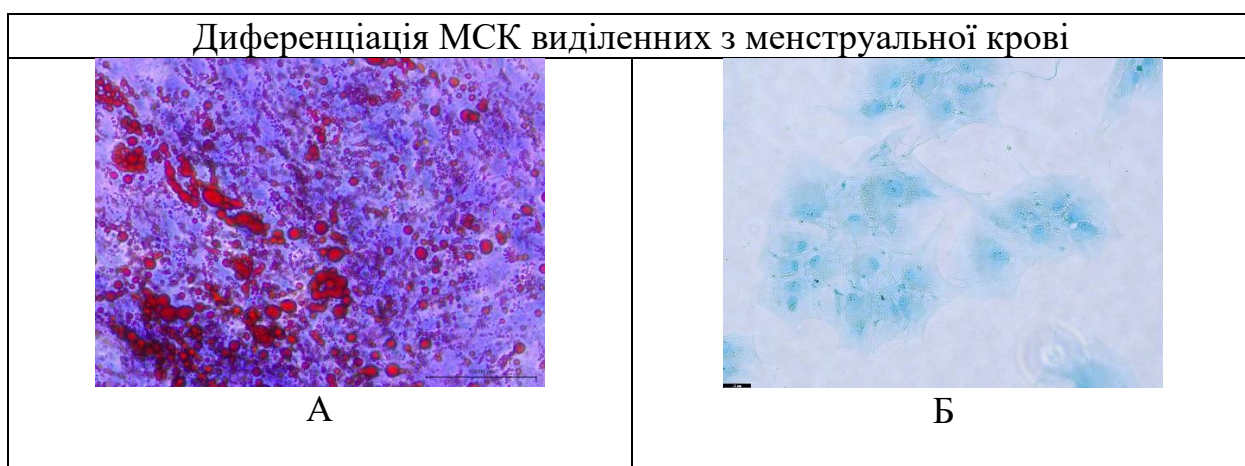
	Остеогенна диференціація	Хондрогенна диференціація	Адипогенна диференціація
МСК виділені з менструальної крові	+++	++	+++
МСК виділені з нервового гребня	++	+++	+++
МСК виділені з кісткового мозку	++	+++	++
МСК виділені з жирової тканини	+++	+++	+++

За бальною характеристикою, що виражається в «-», «+/-», «+», «++», «+++» середньому не було культури, що мала бал менше за «++». Так остеогенне диференціювання найбільш краще відбулося в МСК, які були виділені з менструальної крові та жирової тканини (Рис.3.7. В, Г та Рис.3.9. В, Г). На другий тиждень культивування МСК помітно знизилася проліферативна активність клітин, так зниження реплікації ДНК при остеодиференціюванні пов'язують з початком експресії маркерів остеобластів, а саме появою лужної фосфатази, процесінгом проколагену 1 типу в колаген 1 під впливом аскорбінової кислоти, що входить до складу поживного середовища. Так поклади колагенового позаклітинного матриксу є важливим етапом остеогенної диференціації, зокрема на останніх етапах диференціації МСК в остеобласти, колагеновий позаклітинний матрикс мінералізується та утворюється поклади Ca^{2+} [37]. Так в продиференційованих

в остеогенному напрямку МСК з менструальної крові спостерігалися чіткі включення Ca^{2+} , формування фрагментів окостеніння.

Адипогенне диференціювання можна було спостерігати в культурі клітин за 7 днів після початку диференціації. Так в клітинах МСК вже почали накопичуватися жирові включення, які з часом диференціації збільшилися в розмірі в середині клітини. Так за допомогою каскаду реакцій відбувається зниження експресії генів стовбуровості та активація генів, що відповідають більш зрілому фенотипу соматичної клітини та надають характерну морфологію клітині. Так багато досліджень показали, що при індукції адипогенезу в культурі МСК ті фактори, що запускаються в клітині інгібують диференціювання МСК в остеогенному напрямку [38]. Найменша кількість клітин, що мала позитивне диференційне забарвлення за Red Oil O, була в МСК, джерелом яких був кістковий мозок (Рис.3.9.А).

Хондрогенне диференціювання пройшло успішно у всіх чотирьох культурах МСК, зокрема найбільша кількість глікозаміногліканів, що підтверджена барвником толуїдиновим блакитним, спостерігалася в МСК виділених з нервового гребня, кісткового мозку та жирової тканини (Рис.3.8. Б, 3.9.Б, 3.10.Б).



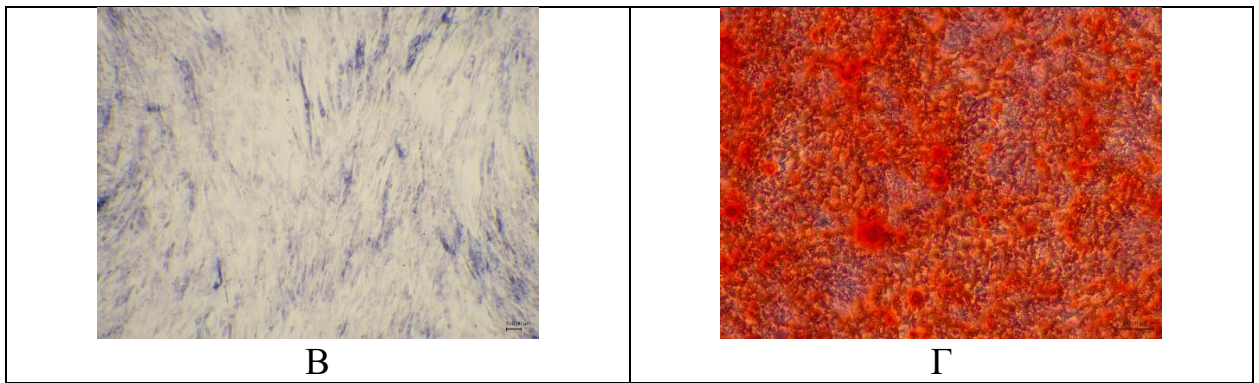


Рис.3.7. Мікрофотографія культури клітин МСК А – Адипогенне диференціювання (зabarвлення Red Oil O та азур-еозином за Романовським); Б – Хондрогенне диференціювання (зabarвлення Toluidine Blue); В – Остеогенне диференціювання (визначення активності лужної фосфатази); Г – Остеогенне диференціювання (зabarвлення Alizarin Red S), збільшення об'єктів 40х, окуляр 10х.

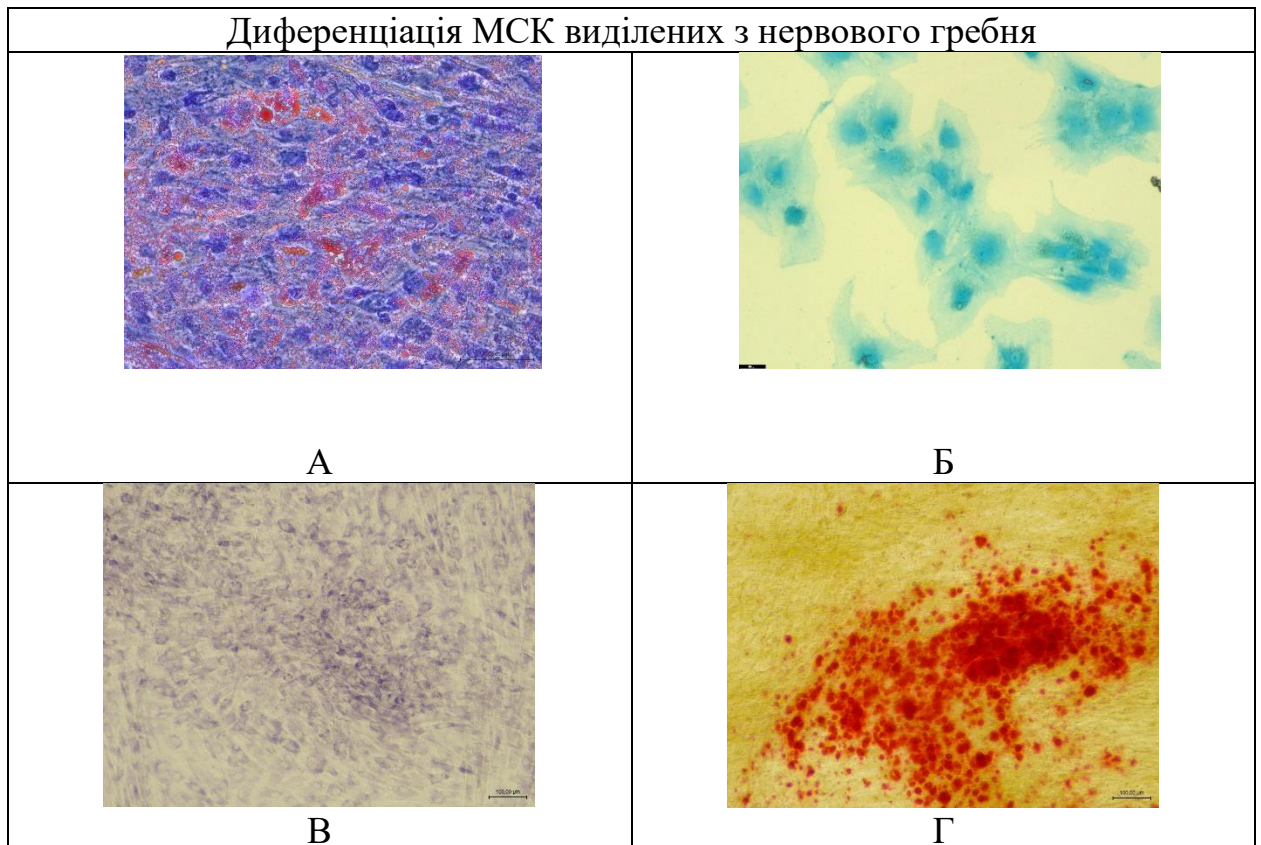


Рис.3.8. Мікрофотографія культури клітин А – Адипогенне диференціювання (зabarвлення Red Oil O та азур-еозином за Романовським); Б – Хондрогенне диференціювання (зabarвлення Toluidine Blue); В – Остеогенне диференціювання (визначення активності лужної фосфатази); Г –

Остеогенне диференціювання (зabarвлення Alizarin Red S), збільшення об'єктив 40x, окуляр 10x.

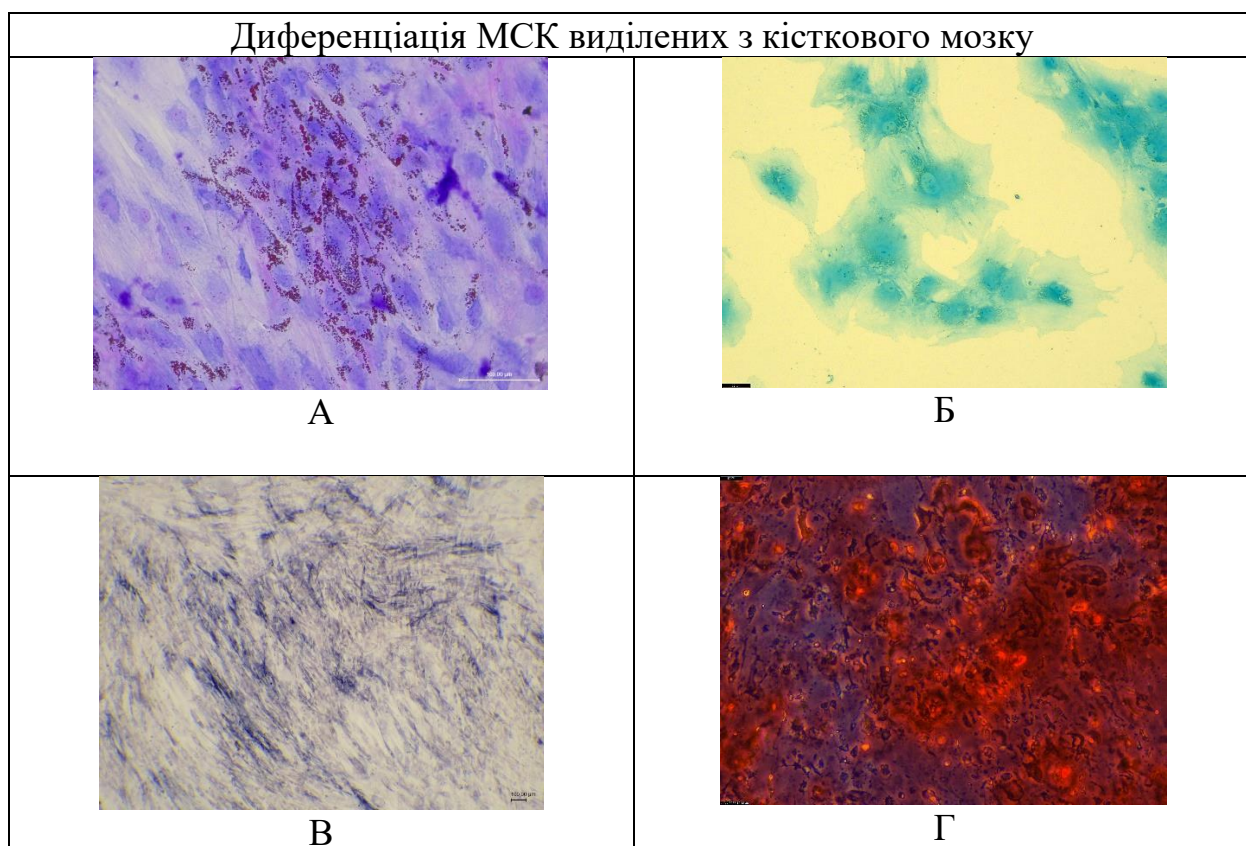
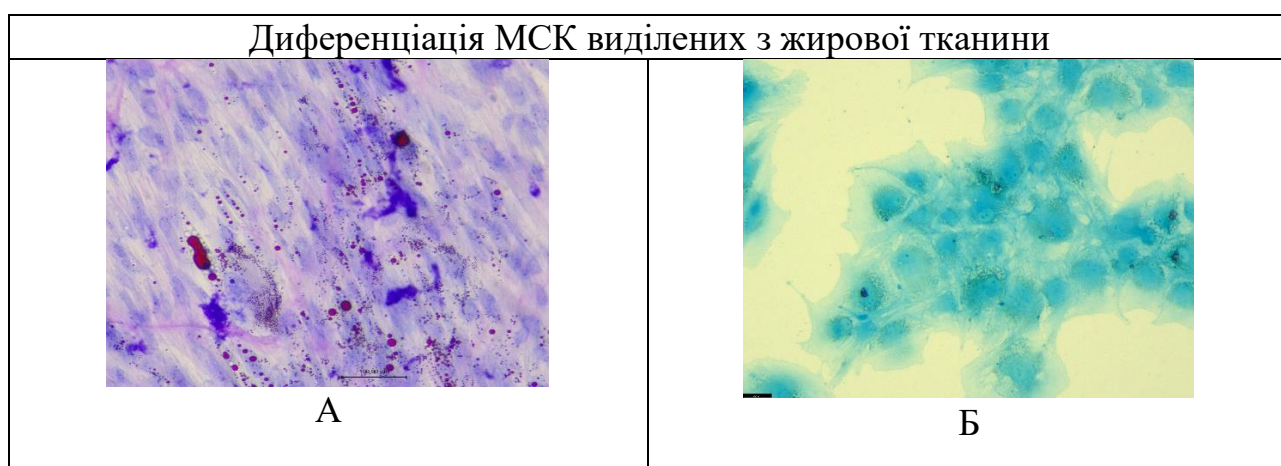


Рис.3.9. Мікрофотографія культури клітин А – Адипогенне диференціювання (зabarвлення Red Oil O та азур-еозином за Романовським); Б – Хондрогенне диференціювання (зabarвлення Toluidine Blue); В – Остеогенне диференціювання (визначення активності лужної фосфатази); Г – Остеогенне диференціювання (зabarвлення Alizarin Red S), збільшення об'єктив 40x, окуляр 10x.



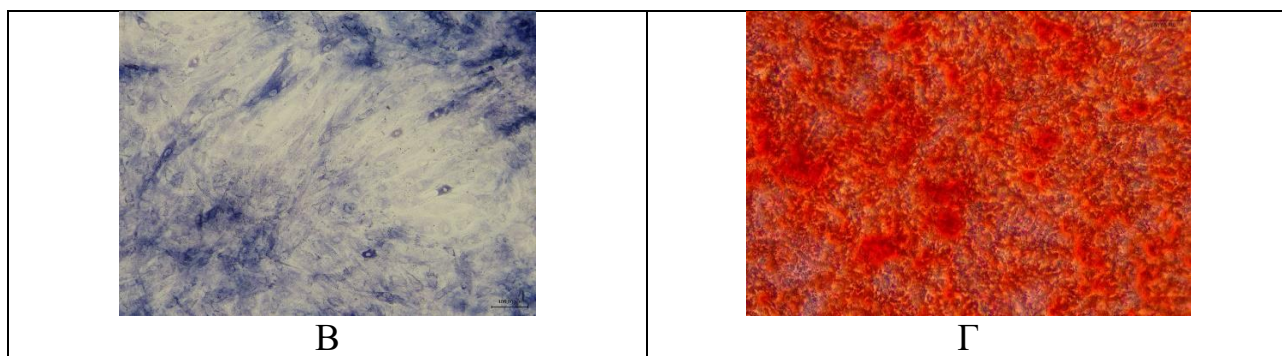


Рис.3.10. Мікрофотографія культури клітин А – Адипогенне диференціювання (зabarвлення Red Oil O та азур-еозином за Романовським); Б – Хондрогенне диференціювання (зabarвлення Toluidine Blue); В – Остеогенне диференціювання (визначення активності лужної фосфатази); Г – Остеогенне диференціювання (зabarвлення Alizarin Red S), збільшення об'єктів 40х, окуляр 10х.

3.3. Вплив терміну культивування при біотехнологічному процесі на клітинний цикл мезенхімальних стовбурових клітин

На наступному етапі роботи було проаналізовано ріст та динаміку клітинної культури людини різного походження за різного терміну культивування. Дослідження проводилися з використанням методів культивування в умовах 7 днів, 14 та 21 день без заміни культурального середовища. В результаті в досліджуваних культурах клітин було визначено відсоток клітин, що перебувають на стадії мітозу відносно загальної кількості клітин за допомогою методу проточної цитометрії.

Так, було показано, що при культивуванні МСК виділених з менструальної крові клітинний цикл змінюється залежно від умов культивування. Якщо мезенхімальні стовбурові клітини культивувати безперервно 7 днів, то кількість клітин, що знаходиться в стадії мітозу є найбільшою в порівнянні з безперервним культивуванням без заміни поживного середовища 14 та 21 день (Рис.3.11). Кількість клітин, що активно проліферують становила 95,3% клітин, 4,1% клітин, що перебували у фазі

спокою G0-G1 в культурі без заміни середовища 7 днів. Найменша кількість клітин, що знаходилася на стадії мітозу була 78% МСК якщо 21 день безперервно культивувати. Таку зміну в кількості активно проліферуючих клітин можна пояснити тим, що мезенхімальні стовбурові клітини виділені з менструальної крові активно ростуть та діляться в перші дні адгезії на пластику. За рахунок цього ці клітини достатньо швидко досягають конфлюентного шару. Характерним для МСК з менструальної крові є те, що ці клітини не здатні рости та ділитися один на одному. Ця культура достатньо стабільно знаходиться в моношарі, на відміну, наприклад від клітин жирової тканини, що налазять один на одного за відсутності місця на культуральному пластику. Тобто за рахунок контактного гальмування відбувається зменшення кількості клітин, що ділиться. Культура клітин, джерелом яких є менструальна кров, стає нахшталт фідерного шару, проте здатність до розмноження повністю не втрачається, адже клітини під час розмноження не нашаровуються один на одного в даному типі культури, а зменшують свою розпластаність, ущільнюючись (Рис.3.11). Проте слід зауважити, що дана культура являє собою приклад того, що площа росту обмежує кількість отримання клітин з кожного пасажу.

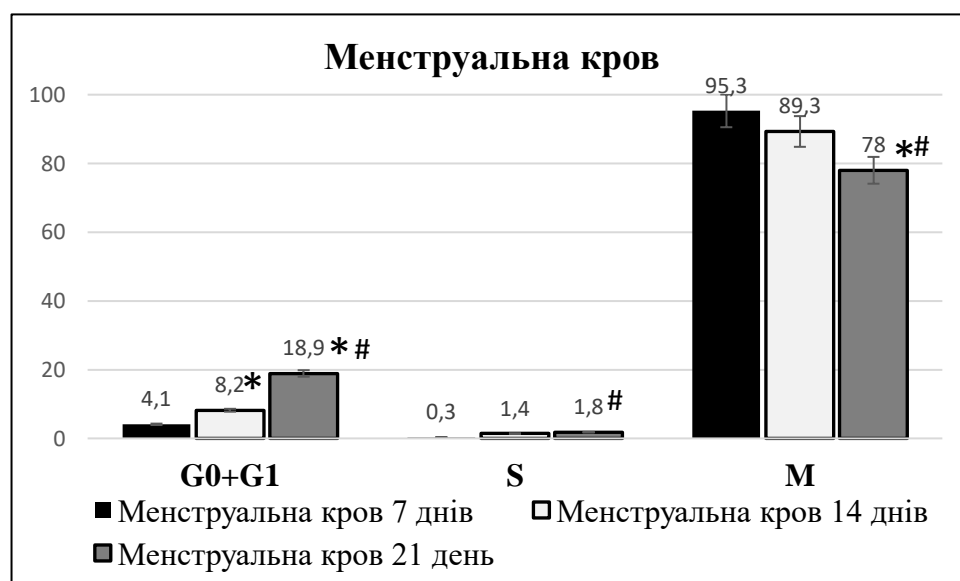


Рис. 3.11. Відсоток мезенхімальних стовбурових клітин, виділених з менструальної крові, що перебувають на різних стадіях клітинного циклу під

час безперервного культивування 7, 14 та 21 день. * - $P \leq 0,05$ - в порівнянні з 7 днем, # - $P \leq 0,05$ - в порівнянні з 14 днем

Наступним етапом експерименту було дослідити лабільність клітинного циклу та залежність його від умов культивування. Після безперервного культивування 7, 14 та 21 день, прокультивувати МСК виділені з різних джерел двома видами культивування: перша модель – це замінювати поживне середовища кожні 2 дні, друга – знову безперервно культивувати до досягнення клітин предконфлюентного шару першої моделі. Так було показано, що часта заміна поживного середовища, в якому знаходяться всі поживні речовини для нормального росту та проліферації клітинної культури, зокрема амінокислоти, вітаміни, солі, гормони, фактори росту, призводить до збільшення кількості клітин, що перебувають у фазі мітозу. Так в МСК виділених з менструально крові, після 21 дня безперервного культивування, регулярна заміна поживного середовища кожні 2 дні призвела до того, що збільшився відсоток клітин, що активно проліферують на 10%. Натомість в МСК, де не проводилася заміна середовища, відсоток клітин, що знаходяться в стадії мітозу становив 76,8%, це на 12% менше в культурі МСК, що регулярно змінювали поживне середовище і такий самий відсоток клітин, як і в МСК, що безперервно культивували 21 день. Зокрема збільшується майже на 10% кількість клітин, що знаходиться на стадії спокою G0-G1 в МСК де не проводилася заміна середовища після 21 дня безперервного культивування (Рис.3.12).

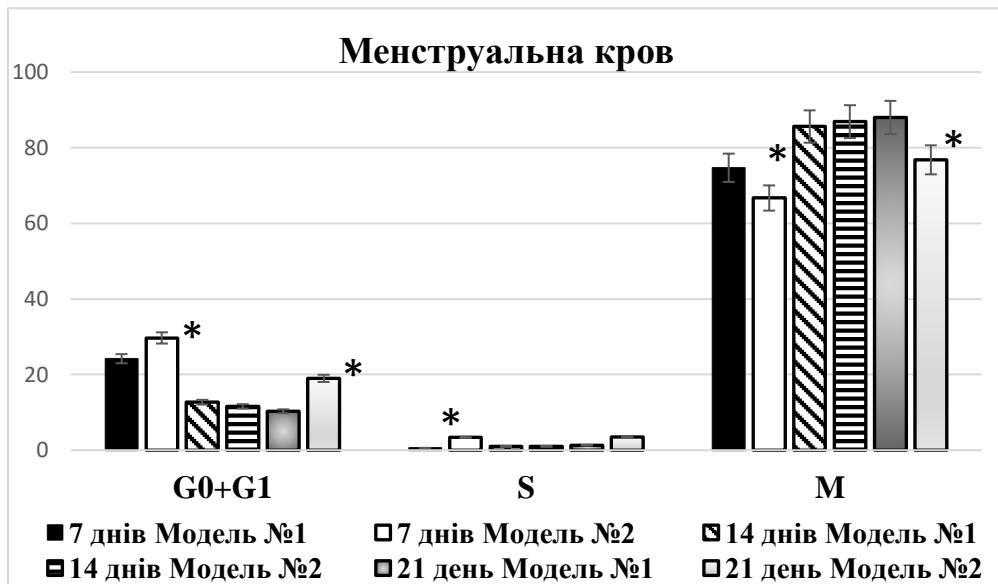


Рис. 3.12. Клітинний цикл мезенхімальних стовбурових клітин, виділених з менструальної крові, після безперервного культивування 7, 14 та 21 день. Модель №1 – заміна поживного середовища кожні 2 дні. Модель №2 – без заміни поживного середовища до досягання предконфлюентного шару моделі №1. * - $P \leq 0,05$ - в порівнянні з моделлю №1

Дослідження клітинного циклу МСК виділених з нервового гребня показало, що на відміну від МСК з менструальної крові, чим довше культивувати МСК без заміни середовища, тим більше клітин буде вступати в стадію мітозу. Так за 7 днів безперервного культивування 90,1% клітин знаходилися в процесі реплікації ДНК на S-фазі, а от кількість клітин, що ділиться становила 1,8% (Рис.3.13.). За 14 днів безперервного культивування відсоток МСК виділених з нервового гребня збільшився до 74,5% клітин, тим самим різко зменшився відсоток клітин, що знаходяться на S-стадії та трохи збільшилася кількість клітин на стадії G0-G1. Найбільша кількість клітин, що активно ділилися була після 21 дня безперервного культивування – 82,2% клітин. Таку динаміку можна пояснити тим, що клітини виділені з нервового гребня здатні активно ділитися та проліферувати з часом, коли наросте певна кількість клітин. Даній культурі властиве явище контактної взаємодії клітин та груповому стимулюванню до поділу.

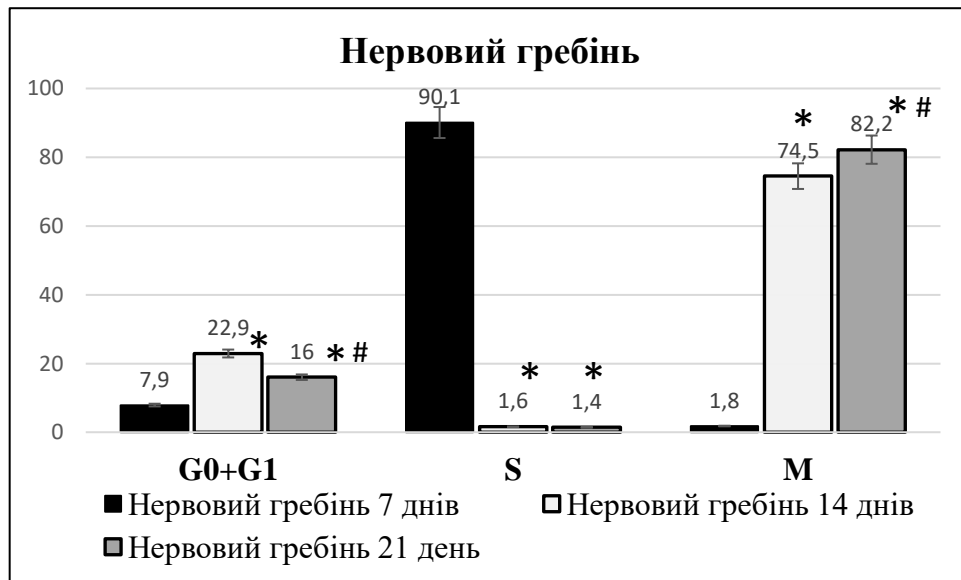


Рис.3.13. Відсоток мезенхімальних стовбурових клітин, виділених з нервового гребня, що перебувають на різних стадіях клітинного циклу під час безперервного культивування 7, 14 та 21 день. * - $P \leq 0,05$ - в порівнянні з 7 днем, # - $P \leq 0,05$ - в порівнянні з 14 днем

Після закінчення безперервного культивування 7,14 та 21 день, МСК з нервового гребня піддавалися дослідженню на залежність клітинного циклу від умов культивування. Так за результатами дослідження кількість клітин в культурі, що вступили в стадію мітозу після 7 діб безперервного культивування з наступною постійною заміною поживного середовища (модель №1) складала 61,9%, натомість в тій культурі, де поживне середовище не змінювалося (модель №2) кількість клітин, що перебувала в М-фазі в 2 рази менше (Рис.13.13.).

Схожа тенденція зберігається в культурі клітин, що культивувася 14 діб безперервно, так за моделлю №2 відсоток МСК, що ділиться становить 51,1%, а культура клітин в якій продовжували змінювати поживне середовище кожні 2 дні мала 75,6% клітин, що перебувають в стадії мітозу. Якщо ж порівнювати це з даними клітинного циклу отриманими після 14 днів безперервного культивування, то ми бачимо що кількість клітин в мітозі практично не змінилися, якщо до клітин весь час вносити поживні речовини та фактор росту фібробластів (Рис.3.14). Цікавим є той факт, що після 21 дня безперервного

культивування, МСК, що росли за обидвома моделями мають однакову кількість активно проліферуючих клітин, що знаходяться в стадії мітозу.

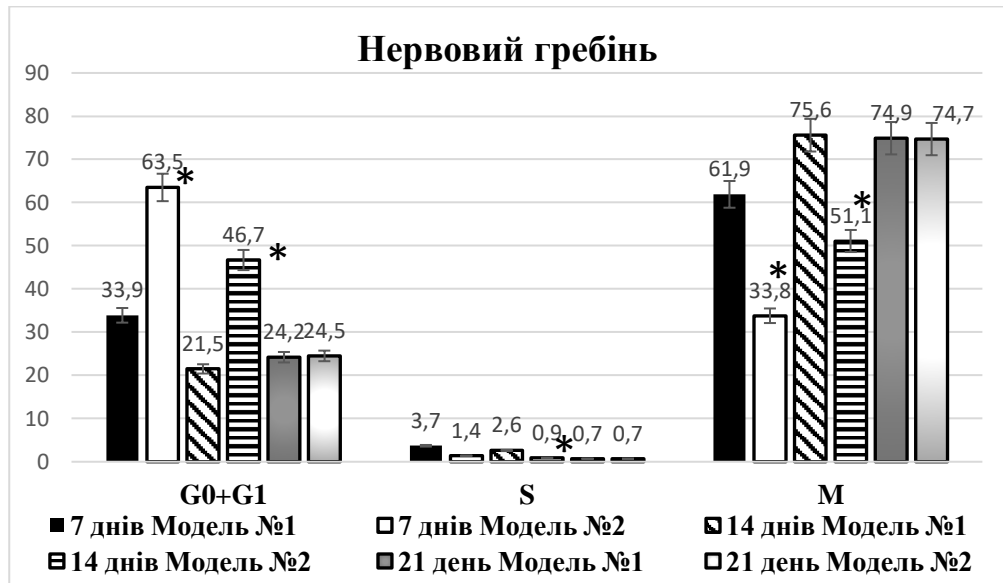


Рис. 3.14. Клітинний цикл мезенхімальних стовбурових клітин, виділених з нервового гребня, після безперервного культивування 7, 14 та 21 день. Модель №1 – заміна поживного середовища кожні 2 дні. Модель №2 – без заміни поживного середовища до досягання предконфлюєнтного шару моделі №1. * - $P \leq 0,05$ - в порівнянні з моделлю №1

МСК, джерелом яких був кістковий мозок, не залежно від того скільки безперервно проводилося культивування чи то 7 чи 14 чи 21 день, кількість клітин, що перебували на стадії мітозу становило в середньому близько 41% (Рис.3.15). Кількість клітин в стані спокою варіювалася, так найменша кількість клітин в фазі G0-G1 28% була в МСК 7 діб безперервного культивування. А от при культивуванні 14 діб та 21 день відсотки клітин, що перебувають в G0-G1 становили 55,1% та 52,5% відповідно. Таку тенденцію клітин до проліферації можна пояснити тим, що культура МСК виділена з кісткового мозку є стабільною, адже у всіх трьох випадках кількість клітин, що активно ділиться трохи менше за 50%. Це може свідчити, що умови культивування не впливають на ріст та розмноження клітин і ця культура є

стабільною до таких факторів, як заміна поживного середовища з надходженням поживних речовин, вітамінів, амінокислот, FGF-2. Проте, якщо порівнювати цю культуру МСК зі стовбуровими клітинами, що виділені з менструальної крові чи нервового гребня, можна побачити, що в середньому близько 75% клітин виділених з цих джерел перебувають в мітотичній активності. Зокрема це в 1,8 разів більше, ніж в МСК виділених з кісткового мозку (Рис.3.11, 3.12). Також мезенхімальні стовбурові клітини виділені з кісткового мозку морфологічно відрізняються від культури МСК, що виділена з інших джерел. Так, дані клітини є менш проліферативно активними, вони більше розпластані на пластику і мають відростки, на відміну, наприклад, від МСК, що виділені з нервового гребня, які мають вузьку веретеноподібну форму та клітини схожі за морфологією на фібробласти (Рис.3.1.Б).

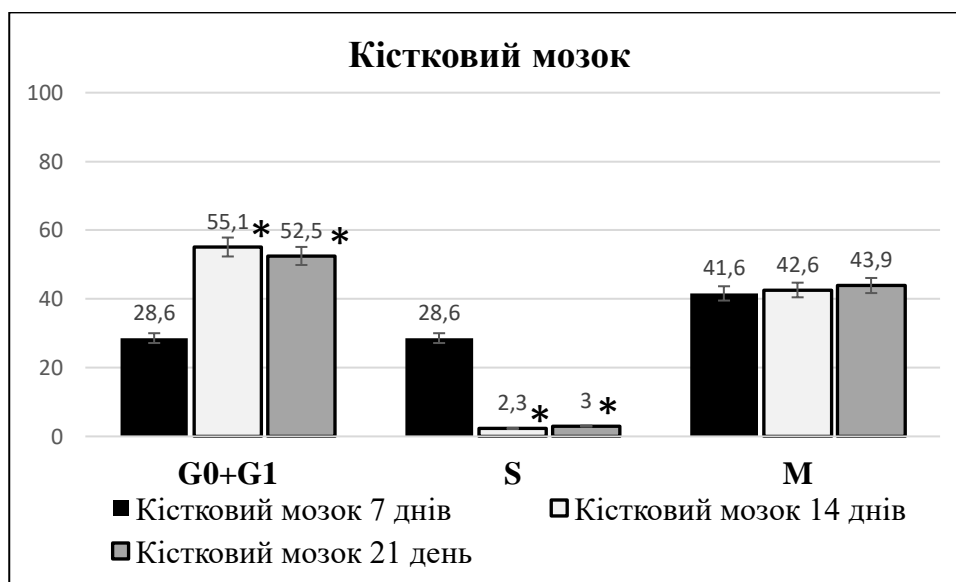


Рис.3.15. Відсоток мезенхімальних стовбурових клітин, виділених з кісткового мозку, що перебувають на різних стадіях клітинного циклу під час безперервного культивування 7, 14 та 21 день. * - $P \leq 0,05$ - в порівнянні з 7 днем, # - $P \leq 0,05$ - в порівнянні з 14 днем

Після закінчення безперервного культивування 7, 14 та 21 день, МСК з кісткового мозку піддавалися дослідженню на залежність клітинного циклу від умов культивування. Так за результатами дослідження кількість клітин в

культури, що вступили в стадію мітозу після 14 та 21 доби безперервного культивування з наступною постійною заміною поживного середовища (модель №1) складала в середньому 61,4%, натомість в тій культурі, де поживне середовище не змінювалося (модель №2) кількість клітин, що перебувала в М-фазі менше на 10% (Рис.13.16.). Цікавим є той факт, що зберігається тенденція стабільної культури, де кількість активно проліферуючих клітин майже однакова, що при культивуванні за моделлю №1, що за моделлю №2. Проте ми бачимо, що в даному експерименті прослідковується залежність клітин від заміни поживного середовища. Це можна пояснити тим, що до складу поживного середовища на якому культивуються МСК входить фактор росту фібробластів 2 типу в концентрації 7нг/мл. Так, за даними літератури, FGF-2 діє на клітину через свої специфічні рецептори. Активовані рецептори FGF-2 передають сигнали всередину клітину двома шляхами: RAS-мітоген активуючою протеїнкіназою, яка відповідає за плюрипотентність та розмноження або фосфотидилінозитол-4,5-біфосфат-3-кіназа, яка активна коли стовбурові клітини стають більш комітованими [39].

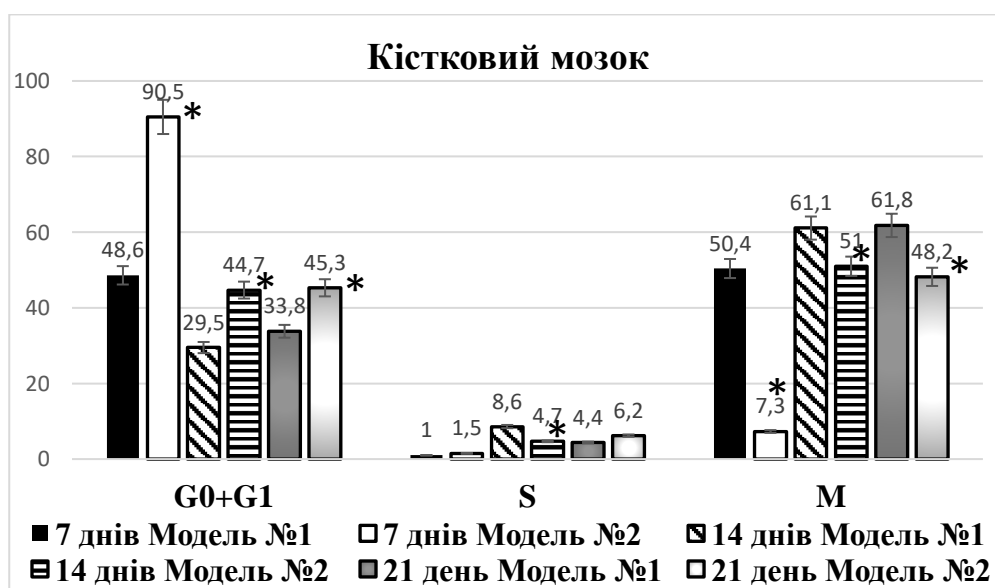


Рис. 3.16. Клітинний цикл мезенхімальних стовбурових клітин, виділених з кісткового мозку після безперервного культивування 7, 14 та 21 день. Модель

№1 – заміна поживного середовища кожні 2 дні. Модель №2 – без заміни поживного середовища до досягання предконфлюентного шару моделі №1.
* $P \leq 0,05$ - в порівнянні з моделлю №1

Мезенхімальні стовбурові клітини, що виділені з жирової тканини, без заміни поживного середовища 7 днів мали 40% клітин, що перебувають в мітотичній активності (Рис.3.17). Культивувавши клітини 14 та 21 день безперервно кількість клітин, що перебувають в мітозі була однаковою – 66%. Дані результати дослідження свідчать, що дана культура вийшла на певне плато і зміни в умовах культивування не значно позначиться на клітинній проліферації. Найбільша кількість клітин, що перебуває в синтетичній фазі була в МСК, що безперервно культивувалися 7 днів, і дорівнювало 40%. МСК з жирової тканини є менш стабільною культурою, ніж МСК з кісткового мозку, проте ці клітини мають більшу проліферативну активність. Ми пов'язуємо це з певною морфологією клітин та типом росту даних культур. Якщо МСК з кісткового мозку більш розпластане та росте в один шар, залишаючи певні прогалини між клітинами, то МСК з жирової тканини за своєю морфологією більш схожі на фібробласти, є набагато менш розпластаними на пластику та здатні рости одна клітина на одній, дуже часто утворюючи так звані «зірки з клітин» (Рис.3.1.В, Г). Дана морфологія клітин, виділених з МСК дозволяє наростити більшу кількість клітин за той самий час, що і МСК виділені з кісткового мозку.

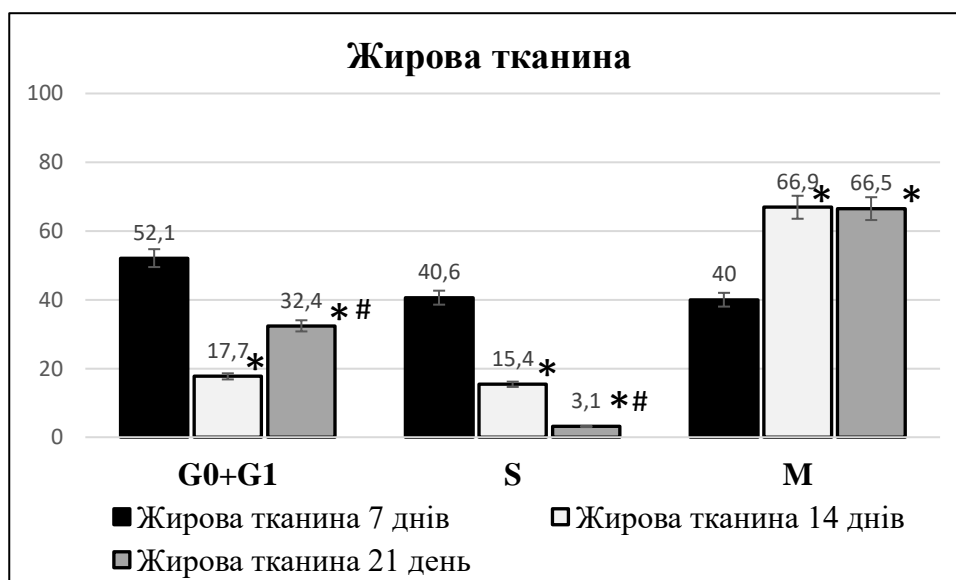


Рис.3.17. Відсоток мезенхімальних стовбурових клітин, виділених з жирової тканини, що перебувають на різних стадіях клітинного циклу під час безперервного культивування 7, 14 та 21 день. * - $P \leq 0,05$ - в порівнянні з 7 днем, # - $P \leq 0,05$ - в порівнянні з 14 днем

Після закінчення безперервного культивування 7, 14 та 21 день, спостерігається схожа тенденція, що в МСК виділених з менструальної крові, нервового гребня на те, що постійна зміна середовища приводить до збільшення кількості клітин, що перебувають в стані ділення. Так МСК, що виділені з жирової тканини і росли за моделлю №1 (зміна поживного середовища кожні 2 дні) після 7 діб безперервного культивування мають 75% клітин, що перебувають в стадії мітозу (Рис.3.18). 28% клітини, що росли за моделлю №2 (без заміни поживного середовища) після 7 діб безперервного культивування були в фазі мітозу. Схожа тенденція зберігається в культурі клітин, що росли після безперервного культивування 14 діб, так за моделлю №1 відсоток МСК, що ділиться становить 67%, а культура клітин в якій не змінювали поживне середовище кожні 2 дні мала 45% клітин, що перебувають в стадії мітозу. У всіх трьох випадках росту клітин після безперервного культивування 7, 14 та 21 день спостерігається мінімальна кількість клітин в яких відбувається реплікація ДНК і вони перебувають в S-фазі.

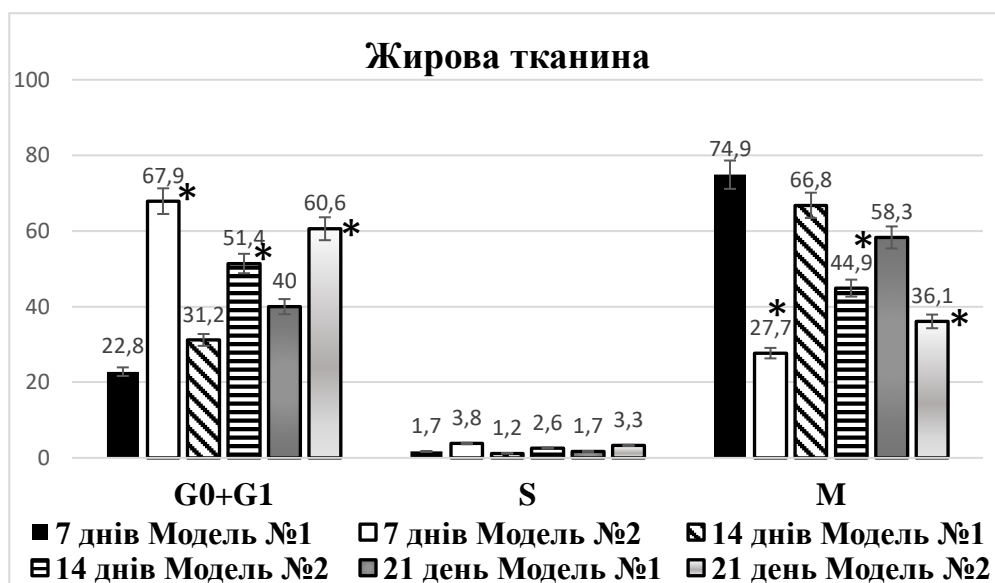


Рис.3.18. Клітинний цикл мезенхімальних стовбурових клітин, що виділені з жирової тканини, після безперервного культивування 7, 14 та 21 день. Модель №1 – заміна поживного середовища кожні 2 дні. Модель №2 – без заміни поживного середовища до досягання предконфлюентного шару моделі №1. * - $P \leq 0,05$ - в порівнянні з моделлю №1

3.4. Біохімічні показники кондиціонованого середовища

Терапевтичні властивості мезенхімальних стовбурових клітин пов'язані не лише з мультипотентністю клітин, але й тим, що вони виділяють так званий секретом стромальної клітини. Мезенхімальні стовбурові клітини секретують в поживне середовище білки, мікроРНК, фактори росту, антиоксиданти, екзосоми [6].

На цьому етапі дослідження увага була зосереджена на паракринних продуктах, що секретуються МСК, уникаючи впливу живих клітин. Тому було досліджено поживне середовище в якому росли мезенхімальні стовбурові клітини різного джерела походження на наявність факторів росту та макрофагального колонієстимулюючого фактору. Було проведено порівняння чи є різниця між кондиціонованим середовищем в якому росли МСК виділені з менструальної крові, нервового гребня, кісткового мозку та жирової тканини.

Крім того метою етапу було отримання даних щодо того чи є кондиційоване середовище джерелом прозапальних цитокінів та в якій кількості вони там містяться для майбутнього лікування опіків та ран, що ведуть до запалення.

За методом Бредфорда було визначено концентрацію білка у весь період культивування з першого по дев'ятий пасаж в кондиціонованому середовищі з МСК виділених з менструальної крові, нервового гребня, жирової тканини, кісткового мозку. Багато біоактивних речовин виділяються в кондиціоноване середовище, тому к-середовище за рахунок великої кількості виділених білків може сприяти такому ж ефекту як мезенхімальні стовбурові клітини, а саме протизапальний ефект, ангиогенез [40]. Так було показано, що концентрація білка в середньому зростає з пасажем в кожному з чотирьох видів к-середовищ (Рис.3.19). На перших пасажах клітини майже не утилізують білок, що може говорити про наявність певного адаптаційного періоду для культур *in vitro*. І період з 1 по 3 пасаж ми можемо назвати адаптаційним. При чому слід помітити, що є різниця між продуктивністю МСК, що виділені з різних джерел. Так МСК з нервового гребня та менструальної крові є більш адаптованими і вже починаючи з перших пасажів утилізують білок. Найменш адаптованими серед всіх клітин є МСК виділені з жирової тканини. Разом з МСК з кісткового мозку ці культури мають більший адаптаційний період, що пояснюють загальну тривалість культивування із цих джерел. Адже швидкість наростання клітинної біомаси дуже відрізняється. Починаючи з 4 по 6 пасаж різко збільшується споживання білка (Рис.3.19). Це говорить нам про те, що в цей період клітини є метаболічно та фізіологічно активними.

Зі збільшенням номеру пасажу, а відповідно і зі збільшенням часу життя клітин в умовах *in vitro* падає показник споживання білка клітинами у МСК виділених з усіх джерел. В цьому випадку це говорить нам про сенильні зміни в клітинах. Так на восьмому та дев'ятому пасажах в к-середовищі з МСК жирової тканини на дев'ятому пасажі концентрація білка дорівнювала 1,88мкг/мл. Найменший вміст білка на останніх пасажах культивування був в кондиціонованому середовищі з МСК кісткового мозку і становив 1,80мкг/мл.

Цікавим є той факт, що в к-середовищі з МСК жирової тканини на першому пасажі спостерігається найвища концентрація загального білку, в порівнянні з к-середовищем МСК менструальної крові, нервового гребня та кісткового мозку і становила 1,85мкг/мл.

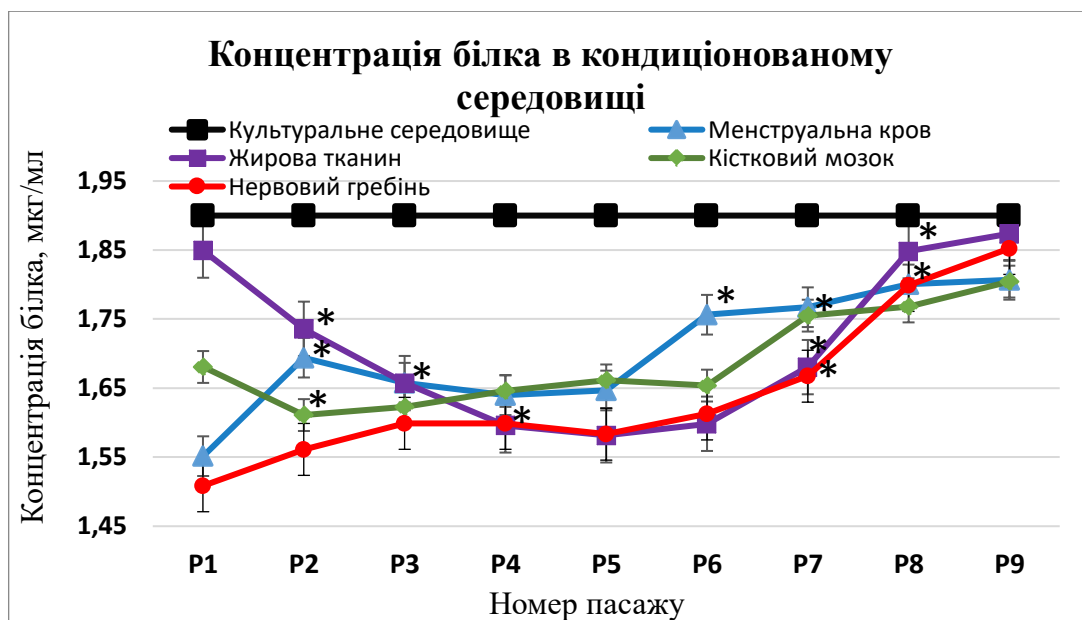


Рис.3.19. Загальна концентрація білка визначена за методом Бредфорда в кондиціонованому середовищі з МСК виділених з різних джерел: менструальна кров, нервовий гребінь, кістковий мозок, жирова тканина. * $P \leq 0,05$ - в порівнянні з попереднім пасажем.

Було проаналізовано загальні концентрації певних білків та факторів росту, які можуть міститися в кондиційованому середовищі на кожному пасажі культивування. На основі літературних даних було вибрано 5 ключових факторів росту, зокрема фактор росту фібробластів 2 (FGF2), епідермальний фактор росту (EGF), фактор росту ендотелію судин (VEGF), гранулоцитарний колонієстимулюючий фактор (M-CSF). Як показано в літературних джерелах саме ці фактори, що виділяють МСК, позитивно впливають на репарацію та регенераційні процеси при поверхневих ураженнях шкіри, спричинених хронічними ранами, опіками різного ступеню тяжкості, дистрофічними процесами шкіри (включаючи виразки метаболічного характеру), дефекти

слизової оболонки (включаючи лікування тріщин заднього проходу); інволюційно-дистрофічні зміни слизової піхви.

Найвищий рівень концентрації в кондиціонованому середовищі серед всіх факторів, що досліджувалися спостерігався в М-CSF. Так його концентрація в кондиціонованому середовищі з МСК менструальної крові зростала протягом всього часу культивування від 233пг/мл при першому пасажі і сягала максимуму 8701мкг/мл при дев'ятому пасажі (Рис.3.20). М-CSF відноситься до розчинних факторів, що опосередковують МСК-залежну імунну регуляцію. Так мезенхімальні стовбурові клітини або конститутивно, або при стимуляції виділяють велику кількість розчинних факторів в кондиціоноване середовище [41]. За даними літератури, при великій проліферативній активності, що приводить до високої щільності клітин, МСК починають перебувати в гіпоксичних умовах за яких вони можуть синтезувати велику кількість макрофагального колонієстимулюючого фактора [42]. Тим самим мезенхімальні стовбурові клітини завдяки М-CSF піддаються безконтактному стимулюванню, що відіграє важливу роль в біології клітинного циклу в організмі людини. М-CSF грає значну роль в диференціації та виживанні МСК. Так у зв'язку зі старінням культури наступним етапом розвитку стовбурових клітин є спонтанна диференціація в різні клітинні типи, чим і пояснюється підвищена концентрація цього фактору в усіх культурах МСК виділених з різних джерел. Також в МСК виділених з менструальної крові збільшена продуктивність М-CSF пов'язана з тим, що ендометріальним МСК за достатньо короткий термін необхідно наростити шар ендометрію нового циклу на базальній мембрані.

Концентрація FGF-2 була стабільно низькою, в порівнянні з іншими факторами, проте кількість фактору росту фібробластів була приблизно однаковою протягом всього культивування МСК. Ці дані результатів говорять про те, що клітина популяції мезенхімальних стовбурових клітин є стабільною і здатна сама себе підтримувати в культурі та підтримувати свій потенціал до мезенхімальності (Рис.3.20).

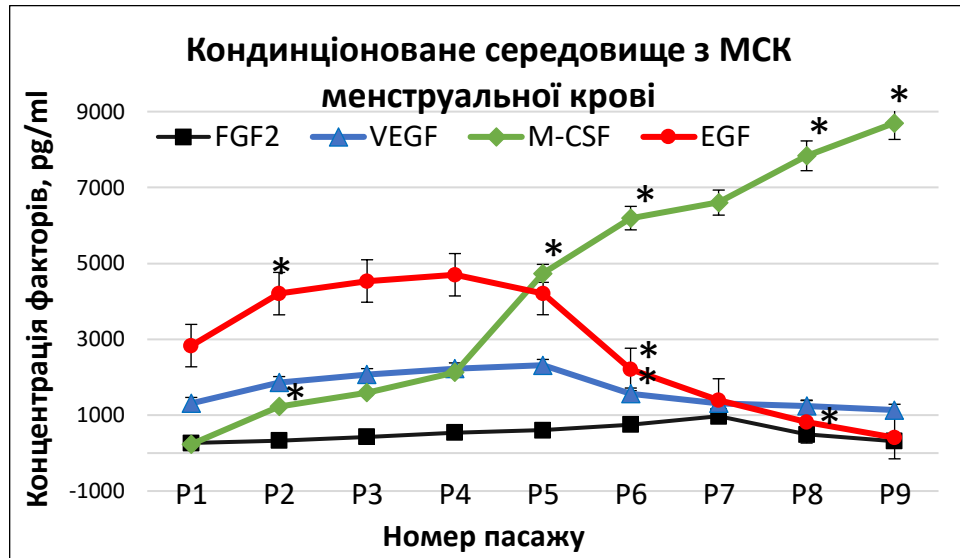


Рис.3.20. Динаміка змін вмісту факторів росту в кондиціонованому середовищі від МСК виділених із менструальної крові на різних стадіях культивування по пасажах. * - $P \leq 0,05$ - в порівнянні з попереднім пасажем.

Найменша кількість виділених факторів в к-середовище була в МСК з нервового гребня. Так пік вмісту EGF був на 9 пасажі і становив 470 пг/мл (Рис.3.21). Найбільша концентрація VEGF в культурі була на сьомому пасажі і становила 400пг/мл, характерним є те, що вміст фактору росту ендотелію судин в к-середовищі поступово збільшувався і з процесом тривалого культивування на восьмому та дев'ятому пасажі концентрація фактору почала падати. Також найменша кількість фактору росту фібробластів була в кондиціонованому середовищі з МСК нервового гребня, так найбільша концентрація цього фактору була на п'ятому пасажі зі значеннями 380пг/мл. При довготривалому культивуванні кількість FGF-2, що синтезується в к-середовищі почала падати, що може говорити про зменшення здатності МСК з нервового гребня до підтримки мезенхімальності з більш пізнім пасажем. Так зі зменшенням концентрації FGF-2 можливий початок спонтанного диференціювання МСК в культурі.

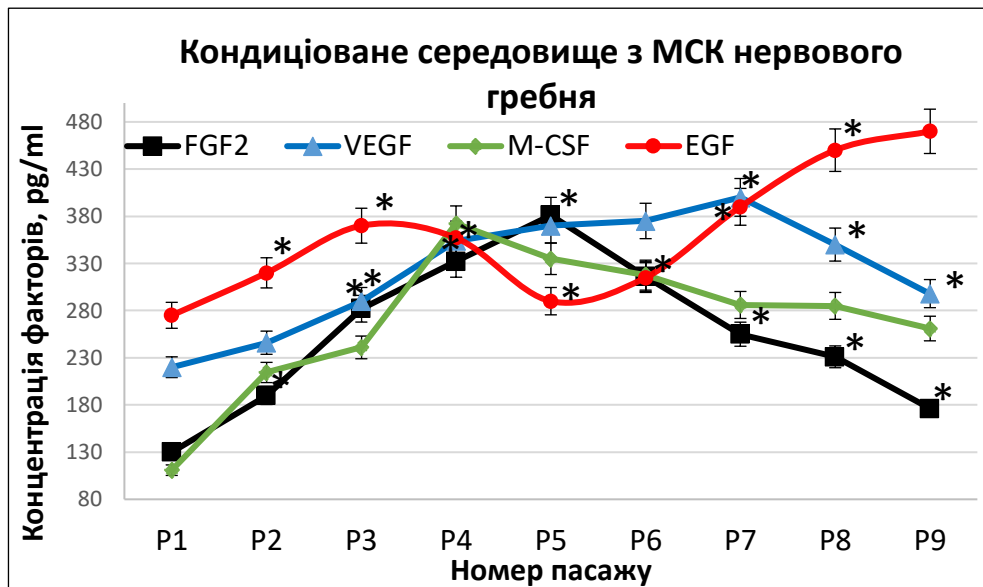


Рис.3.21. Динаміка змін вмісту факторів росту в кондиціонованому середовищі від МСК виділених із нервового гребня на різних стадіях культивування по пасажах. * - $P \leq 0,05$ - в порівнянні з попереднім пасажем

Найбільша концентрація M-CSF, що синтезується МСК виділеними з кісткового мозку, була в культурі третього пасажу і сягала 5692нг/мл, проте з часом культивування, зі збільшенням кількості пасажів макрофагальний колонієстимулюючий фактор почав різко знижуватися і починаючи вже з п'ятого пасажу був стабільно низьким. З цим може бути пов'язана понижена проліферативна діяльність МСК з кісткового мозку на пізніх пасажах (Рис.3.22). Так концентрація FGF-2 була більш стабільною при довготривалому культивуванні МСК, на відміну від M-CSF та VEGF. Вміст фактору росту фібробластів коливався від 504пг/мл на першому пасажі до 254пг/мл на дев'ятому пасажі. Так найбільш відомим хемоатрактантом, що синтезують МСК в к-середовище є фактор росту ендотелію судин. VEGF виконує одну із головних функцій МСК – це сприяє хоумінгу та міграції речовин та факторів, що синтезують мезенхімальні стовбурові клітини в потрібні тканини [43]. Найбільший пік вмісту VEGF в к-середовищі був в середині циклу культивування на п'ятому пасажі і складав 2313пг/мл. Також схожі дані були отримані при дослідженні к-середовища з менструальної крові, так на четвертому пасажі концентрація VEGF становила 2224пг/мл, а

вже на п'ятому пасажі 2317пг/мл (Рис.3.19). Таким чином, на підставі отриманих нами даних слід розробити рекомендації, щодо введення клітин МСК з кісткового мозку та менструальної крові на п'ятому пасажі для внутрішньовенного ведення при лікуванні таких захворювань, як стареча астения, опіки, що довго не загоюються, ішемічні захворювання нижніх кінцівок, або інші захворювання, що супроводжуються станом ішемічного ураження тканин (внаслідок недостатнього розвитку мікроваскуляризації тканин).

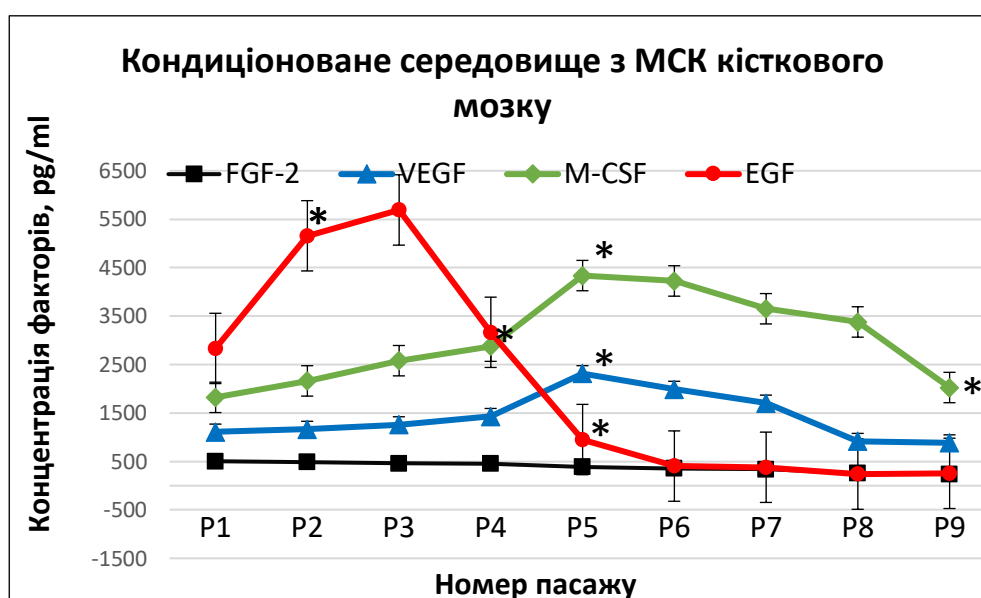


Рис.3.22. Динаміка змін вмісту факторів росту в кондиціонованому середовищі від МСК виділених із кісткового мозку на різних стадіях культивування по пасажах. * $P \leq 0,05$ - в порівнянні з попереднім пасажем.

При дослідженні к-середовище з МСК жирової тканини було отримано такі результати. Концентрація фактору росту фіброblastів другого типу збільшувалася до шостого пасажу, тоді найбільший пік концентрації FGF-2 сягав 3219пг/мл, з сьомго по дев'ятий пасаж вміст фактору росту почав поступового знижуватися (Рис.3.23). Так високий вміст FGF-2 стимулює клітинну проліферацію, самовідновлення та ріст МСК в культурі. Так було показано, що зниження концентрації FGF-2 в культуральному середовищі

МСК жирової тканини збільшує час подвоєння клітин, що може говорити про старіння клітин. Також фактор росту фібробластів 2 типу може впливати на диференціацію МСК з жирової тканини, зокрема він стимулює МСК в адипогенному напрямку, і навпаки інгібує диференціювання в остеогенному напрямленні через зниження експресії остеокальцеїна в клітинах МСК [44].

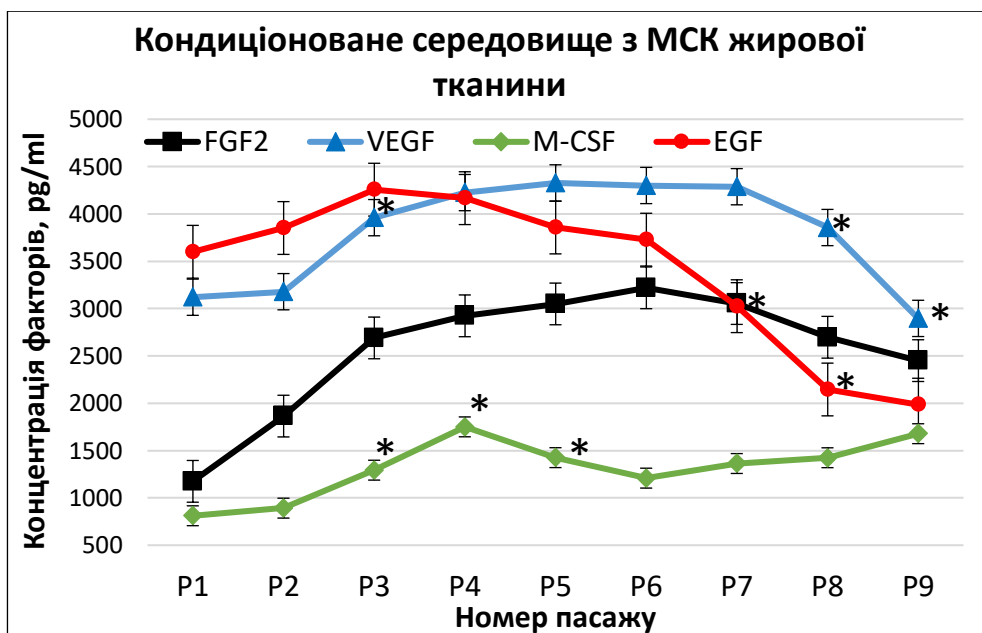


Рис.3.23. Динаміка змін вмісту факторів росту в кондиціонованому середовищі від МСК виділених із жирової тканини на різних стадіях культивування по пасажах. * $P \leq 0,05$ - в порівнянні з попереднім пасажем.

На наступному етапі дослідження було проведено вимірювання концентрації білка в кондиціонованому середовищі на різних днях безперервного культивування, а саме ми робили вимірювання в 7, 14 та 21 день культивування. Загальна концентрація білка була виміряна фотометричним способом за методом Бредфорда. Отриманні результати показують, що найменша концентрація протеїну була під час 7 доби культивування незалежно від джерела отримання МСК. З часом безперервного культивування концентрація білка поступово збільшувалася в к-середовищі з МСК виділених з менструальної крові, кісткового мозку (Рис.3.24). Різке збільшення вмісту білка між 14 днем та 21 днем безперервного культивування було в к-середовищі з МСК жирової тканини і дорівнювало 1,81 та 2,34мкг/мл

відповідно. Найменший вміст білка на 21 дні культивування був в кондиціонованому середовищі з МСК нервового гребня, і дорівнював 1,63мкг/мл. З цього можна зробити висновок, що найменш багате к-середовище на різноманітні фактори росту та білки є к-середовище з нервового гребня.

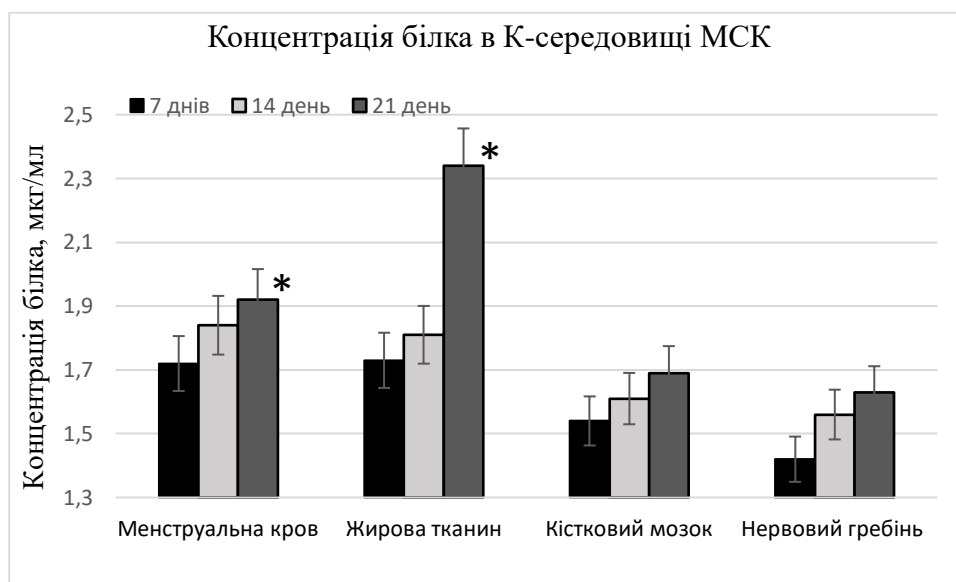


Рис.3.24. Загальна концентрація білка визначена за методом Бредфорда в кондиціонованому середовищі з МСК виділених з різних джерел: менструальна кров, нервовий гребінь, кістковий мозок, жирова тканина. * $P \leq 0,05$ - в порівнянні з 7 днем, # - $P \leq 0,05$ - в порівнянні з 14 днем

Також ми досліджували к-середовище на білки та фактори росту після того як прокультивували клітини без заміни культурального середовища 7, 14 та 21 добу. З отриманих даних, було видно що у всіх чотирьох к-середовищ з культур мезенхімальних стовбурових клітин на всіх трьох етапах безперервного культивування спостерігається збільшення концентрації факторів росту зі збільшенням часу культивування. Так видно з динаміки росту макрофагального колонієстимулюючого фактору, що за 7 днів культивування його концентрація в к-середовищі з МСК менструальної крові становила 21462пг/мл, а на 14 добу безперервного культивування цей показник збільшився в 3 рази і становив 66965пг/мл. Концентрація М-CSF на

21 добу в к-середовищі складала 94940пг/мл (Рис.3.25). Також значно змінилася концентрація VEGF, порівнюючи з 7 днями і 21 днями безперервного культивування, так концентрація білка збільшилася в 11,5 разів.

К-середовище з МСК менструальної крові				
Період культивування	FGF-2, пг/мл	VEGF, пг/мл	EGF, пг/мл	М-CSF, пг/мл
7 діб	245,2±2	311,1±4	2,9±0,03	21462,3±14
14 діб	920,9±3,6	1725,7±6,9	4,2±0,02	66965,5±13
21 доба	1632,3±4,1	3579,7±8,8	6,3±0,05	94940,9±25

Рис.3.25. Динаміка змін вмісту факторів росту в кондиціонованому середовищі від МСК виділених із менструальної крові на різних стадіях культивування 7, 14 та 21 день.

При дослідженні к-середовища з МСК нервового гребня не спотерігалось сильного збільшення концентрації білків з часом культивування. Так вміст фактору росту фібробластів 2 типу незначно збільшився між 7 добами та 14 добами культивування і становив 460пг/мл та 475пг/мл відповідно (Рис.3.26). Зокрема різниці не спостерігалось в концентрації FGF-2 на 14 добу та 21 добу безперервного культивування.

К-середовище з МСК нервового гребня				
Період культивування	FGF-2, пг/мл	VEGF, пг/мл	EGF, пг/мл	М-CSF, пг/мл
7 діб	460,2±3,9	811,4±3	15,7±1,6	33566,2±15,3
14 діб	475,1±5,2	1321,5±4,9	30,5±2,3	40369,3±18,1
21 доба	475,9±5,2	2419,3±9,7	33,2±2,6	45578,6±19

Рис.3.26. Динаміка змін вмісту факторів росту в кондиціонованому середовищі від МСК виділених із нервового гребня на різних стадіях культивування 7, 14 та 21 день.

Якщо ж говорити про к-середовище МСК кісткового мозку, то можна прослідкувати чітку тенденцію між періодами культивування. Так концентрація FGF-2, VEGF, EGF та M-CSF збільшується приблизно в 1,5 при 14 діб безперервного культивування в порівнянні з к-середовищем при 7 діб культивування (Рис.3.27). Найбільша концентрація EGF серед всіх к-середовищ від МСК отриманих з різних джерел була в кондиціонованому середовищі з МСК кісткового мозку і становив 61,3пг/мл при 21 дні культивування без заміни поживного середовища. А от мінімальна концентрація EGF була в к-середовищі з МСК менструальної крові при культивуванні 7 днів.

К-середовище з МСК кісткового мозку				
Період культивування	FGF-2, пг/мл	VEGF, пг/мл	EGF, пг/мл	M-CSF, пг/мл
7 діб	1684,3±2,9	5230,1±6	37,6±0,6	55891,3±18,6
14 діб	2794,6±3,3	7135,2±7,2	54,2±1,3	70756,3±21,3
21 доба	4089,6±6,2	8638,6±8,1	61,3±1,9	102715,3±24,1

Рис.3.27. Динаміка змін вмісту факторів росту в кондиціонованому середовищі від МСК виділених із кісткового мозку на різних стадіях культивування 7, 14 та 21 день.

Після закінчення безперервного культивування 21 день найбільша концентрація макрофагального колонієстимулюючого фактора була в к-середовищі з МСК жирової тканини і становила 123279пг/мл (Рис.3.28). Також достатньо високий вміст в к-середовищі був VEGF та FGF-2 на 21 добу і становив 12835,9пг/мл та 10982,3пг/мл. На 7 добу культивування найбільша кількість FGF-2 серед всіх к-середовищ була від МСК з жирової тканини і становив 3006,6пг/мл.

К-середовище з МСК жирової тканини				
Період культивування	FGF-2, пг/мл	VEGF, пг/мл	EGF, пг/мл	M-CSF, пг/мл
7 діб	3006,6±4	3871,1±3,1	1,2±0,01	41142,6±17,6
14 діб	5567,1±8,1	7215,6±9,9	6,9±0,01	96309,2±22
21 доба	10982,3±12,3	12835,9±12,6	11,2±0,3	123279,6±31

Рис.3.28. Динаміка змін вмісту факторів росту в кондиціонованому середовищі від МСК виділених із кісткового мозку на різних стадіях культивування 7, 14 та 21 день.

Як показали наші результати, зокрема за визначенням загального білку в досліджених кондиціонованих середовищах в процесі культивування спостерігається тенденція до збільшення загального вмісту білку залежно від тривалості культивування. Чим старіша культура, тим більше мезенхімальні стовбурові клітини продукують білок в культивуєчій розчин, що відповідають літературним даним, в процесі довготривалого культивування МСК збільшується в культуральному середовищі концентрація М-CSF, враховуючи його проімунну активність, слід очікувати, що к-середовище від МСК з менструальної крові буде проявляти ранозагоюючий ефект. Також за отриманими даними можна зробити висновок, що найбільша концентрація факторів в к-середовищі спостерігається в середині циклу культивування МСК на третьому – шостому пасажах.

ВИСНОВКИ

У кваліфікаційній роботі було порівняно ключові морфологічні, фенотипові, біохімічні характеристики культури мезенхімальних стовбурових клітин людини, що виділені з менструальної крові, клітин похідних нервового гребня та жирової тканини.

1. МСК виділені з менструальної крові, нервового гребня, кісткового мозку та жирової тканини мають різний характер та динаміку росту, синтетичну активність та метаболічний профіль.
2. Всі досліджені культури МСК мають однаковий фенотип мезенхімальних стовбурових клітин (CD73+, CD90+, CD105+), що зберігається з 1 по 9 пасаж.
3. МСК виділені з менструальної крові, нервового гребня, кісткового мозку та жирової тканини характеризуються різним адаптивним періодом. МСК виділені з менструальної крові та нервового гребня активно метаболізують білок з 1 по 7 пасаж, а з 8 по 9 пасаж спостерігається зменшення утилізації білка в культуральному середовищі. МСК з жирової тканини та кісткового мозку активно споживають білок лише з 4 по 6 пасаж, що свідчить про їх синтетичну активність в цей період.
4. Фактори росту, що синтезуються культурами МСК залежить від пасажів та джерела виділення. МСК з менструальної крові продовжують активно секретувати M-CSF на 7-9 пасажах. Найвищий рівень концентрації VEGF був в к-середовищі МСК з жирової тканини, найбільша концентрація EGF спостерігалася на 3 пасажі МСК з кісткового мозку. Культура МСК з нервового гребня продукувала найбільшу кількість FGF-2 на 5 пасажі.
5. МСК виділені з менструальної крові піддаються синхронізації на 7 добу безперервного культивування, МСК виділені з жирової тканини та кісткового мозку піддаються синхронізації на 14 та 21 добу.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Jossen, V., van den Bos, C., Eibl, R., Eibl, D. (2018). Manufacturing human mesenchymal stem cells at clinical scale: process and regulatory challenges. *J. Applied Microbiology and Biotechnology*, [online]. Available at: doi:10.1007/s00253-018-8912-x [Accessed 22 Mar. 2018].
2. PromoCell (2020). *Mesenchymal stem cells: why optimizing manufacturing processes is key for a successful application*. [online] Available at: <https://promocell.com/blog/mesenchymal-stem-cells-why-optimizing-manufacturing-processes-is-key-for-a-successful-application/> [Accessed 31 Jul. 2020].
3. Bieback, K., Brinkmann, I. (2010). Mesenchymal stromal cells from human perinatal tissues: From biology to cell therapy. *World J Stem Cells*, 2(4), pp.81-92.
4. Hernandez, R., Perales-Adan, J. et al (2020). Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells towards Neuronal Lineage: Clinical Trials in Nervous System Disorders. *J. Biomolecules & Therapeutics*, 28(1), pp. 34-44.
5. Dominici, M., Le, Blanc, K., Mueller, I. et al (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. *J. The International Society for Cellular Therapy position statement*, 8(4), pp. 315–317.
6. Sagaradze, G., Grigorieva, O., Nimiritsky, P., Basalova, N, et al. (2019). Conditioned Medium from Human Mesenchymal Stromal Cells: Towards the Clinical Translation. *J. International Journal of Molecular Sciences*, 20(7), 1656–1668.
7. Margiana, R., Markov A., Zekiy A. et al (2022). Clinical application of mesenchymal stem cell in regenerative medicine: a narrative review. *J. Stem Cell. Res. Ther.* [online].

8. Mohamed-Ahmed, S., Fristad, I., Lie, S., Suliman, S. et al (2018). Adipose-derived and bone marrow mesenchymal stem cells: a donor-matched comparison. *J. Stem Cell Research & Therapy*, 9(1), pp. 168–180.
9. Markov, A., Thangavelu, L., Aravindhan, S. et al (2021). (2021). Mesenchymal stem/stromal cells as a valuable source for the treatment of immune-mediated disorders. *J. Stem Cell Research & Therapy*, 12 (192).
10. Chan, R., Schwab, K., and Gargett, C. (2004). Clonogenicity of human endometrial epithelial and stromal cells. *J. Biology of Reproduction*, 70(6), pp. 1738–1750.
11. Meng, X., Ichim, T., Zhong J. et al. (2007). Endometrial regenerative cells: a novel stem cell population. *Journal of Translational Medicine*, [online]. Available at: doi: 10.1186/1479-5876-5-57. [Accessed 15 Nov. 2007].
12. Zong, Ch., Zhao, L., Huang, Ch. al. (2022). Isolation and Culture of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells from the Human Mandible. *Journal of visualized experience*. 13 (182).
13. Zhang, P., Dong, J., Fan, X. et al. (2023). Characterization of mesenchymal stem cells in human fetal bone marrow by single-cell transcriptomic and functional analysis. *J. Transduct Target Ther.*, [online]. Available at: doi: 10.1038/s41392-023-01338-2. [Accessed 31 Mar. 2023].
14. Miana, V., Prieto, G., Elio A. (2018). Adipose tissue stem cells in regenerative medicine. *J. ecancermedicalscience*, [online]. Available at: doi: doi:10.3332/ecancer.2018.822. [Accessed 28 Mar. 2018].
15. Czerwiek, K., Zawrzykrai, M., Deptula, M. (2023). Adipose-Derived Mesenchymal Stromal Cells in Basic Research and Clinical Applications. *Int. J. Mol. Sci.* 24(4), pp. 3888-3901.
16. Zeuner, M., Didenko, N., Humphries, D., Stergiadis, S. et al. (2018). Isolation and Characterization of Neural Crest-Derived Stem Cells From Adult Ovine Palatal Tissue. *J. Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 6, pp.39–56.

17. Soto, J., Ding, X., Wang, A., Li, S. (2021). Neural crest-like stem cells for tissue regeneration. *J. Stem Cells Translational Medicine*, 10(5), pp. 681-693.
18. Masuda, K., Han X., Kato, H. Et al. (2021). Dental Pulp-Derived Mesenchymal Stem Cells for Modeling Genetic Disorders, *J. International Journal of Molecular Sciences*, 22(5), pp. 2269-2281.
19. Dave, J., Tomar, G. (2018). Dental Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells: Applications in Tissue Engineering. *J. Critical Reviews in Biomedical Engineering*, 46(5), 429–468.
20. Solis, C., Rivolta, M., Boissonade, F. (2022). Neural Crest-Derived Stem Cells (NCSCs) Obtained from Dental-Related Stem Cells (DRSCs): A Literature Review on Current Knowledge and Directions toward Translational Applications. *J. Mol. Sci.*, 23(5), pp. 2714-2725.
21. Egger, D., Tripisciano, C., Weber, V. et al. (2018). Dynamic Cultivation of Mesenchymal Stem Cell Aggregates. *J. Bioengineering*, 5(2), pp. 48–66.
22. Hoang, D., Pham, Ph., Bach T. et al (2022). Stem cell-based therapy for human diseases. *J. Signal Transduct Target Ther.*, 7(1), pp. 272-291.
23. Siramulu, S., Benerjee, A., Liddo, R. et al. (2018). Concise Review on Clinical Applications of Conditioned Medium Derived from Human Umbilical Cord-Mesenchymal Stem Cells (UC-MSCs). *J. Hematol. Oncol. Stem Cell Res.*, 12(3), pp. 230-234.
24. Mehrabadi, S., Shahabeddin, S. (2019). Stem Cell Conditioned Medium as a Novel Treatment for Neuroinflammation Diseases. *Int J Med Invest.*, 8 (3), pp. 1- 12.
25. Kou, M., Huang, L., Yang, J. et. al. (2022). Mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles for immunomodulation and regeneration: a next generation therapeutic tool? *J. Cell Death Dis.*, [online]. Available at: doi: doi: 10.1038/s41419-022-05034-x [Accessed 4 Jul. 2022].
26. Hu, C., Zhao, L., Zhang, L. et al. (2020). Mesenchymal stem cell-based cell-free strategies: safe and effective treatments for liver injury. *J. Stem Cell Research & Therapy*, 11(1), pp. 377–388.

27. Yano, F., Takeda, T., Kurokawa, T. et al (2022). Effects of conditioned medium obtained from human adipose-derived stem cells on skin inflammation. *J. Regen Ther.*, 20, pp. 72-77.
28. dos Santos, F., Campbell, A., Fernandes-Platzgummer, A. et al. (2014). A xenogeneic-free bioreactor system for the clinical-scale expansion of human mesenchymal stem/stromal cells. *J. Biotechnology and Bioengineering*, 111(6), pp. 1116–1127.
29. Mushahary, D., Spittler, A., Kasper, C. et al. (2017). Isolation, cultivation, and characterization of human mesenchymal stem cells. *J. Cytometry Part A.*, 93(1), pp. 19-31.
30. Kang, J., Rajangam, T., Rhie, J. et al. (2020). Characterization of cell signaling, morphology, and differentiation potential of human mesenchymal stem cells based on cell adhesion mechanism. *J. of Cellular Physiology*, 235(10), pp. 6915-6928.
31. Parua, K., Sengupta, S., Saha, P. et al. (2017). Standardization of cell culture conditions and comparison of methods for assessing cell viability in tissue engineering. *J. of Biomaterials Applications*, 31(7), pp. 1036-1046.
32. Baghaei, K., Hashemi, S., Tokhanbigli, S. et al. (2017). Isolation, differentiation, and characterization of mesenchymal stem cells from human bone marrow. *J. Gastroenterol Hepatol Bed Bench.*, 10(3), pp. 208–213.
33. García-Muñoz, E., Joaquim V. (2021). Towards the standardization of methods of tissue processing for the isolation of mesenchymal stromal cells for clinical use. *J. Cytotechnology*, 73(3), pp. 513–522.
34. Alves-Paiva, R., Nascimento, S., Oliveira, D. et al. (2022). Senescence State in Mesenchymal Stem Cells at Low Passages: Implications in Clinical Use. *J. Front. Cell Dev. Biol.*, [online]. Available at: doi: 10.3389/fcell.2022.858996. [Accessed 4 Apr. 2022].
35. Rojewski, M., Weber, B., Schrezenmeier, H. (2008). Phenotypic Characterization of Mesenchymal Stem Cells from Various Tissues. *J. Transfusion Medicine and Hemotherapy*, 35(3), pp. 168–184.

36. Drela, K., Stanaszek, L., Snioch, K., et al. (2020). Bone marrow-derived from the human femoral shaft as a new source of mesenchymal stem/stromal cells: an alternative cell material for banking and clinical transplantation. *J. Stem Cell Research & Therapy*, [online]. Available at: doi: 10.1186/s13287-020-01697-5. [Accessed 30 Jan. 2020].
37. Hanna, H., Mir, L., Andre, F. (2018). In vitro osteoblastic differentiation of mesenchymal stem cells generates cell layers with distinct properties. *J. Stem Cell Research & Therapy*, 9(1), pp.203–213.
38. Robert, A., Marcon, B., Dallagiovanna, B. (2020). Adipogenesis, Osteogenesis, and Chondrogenesis of Human Mesenchymal Stem/Stromal Cells: A Comparative Transcriptome Approach. *J. Front. Cell Dev. Biol.*, [online]. Available at: doi: 10.3389/fcell.2020.00561. [Accessed 8 Jul. 2020].
39. Luo, L., Zhang, Y., Chen, H. et al. (2020). Effects and mechanisms of basic fibroblast growth factor on the proliferation and regenerative profiles of cryopreserved dental pulp stem cells. *J. Cell Proliferation*, [online]. Available at: doi: 10.1111/cpr.12969. [Accessed 17 Dec. 2020].
40. Wang, Y., Zhang, L., Wu, Y. et al. (2020). Peptidome analysis of umbilical cord mesenchymal stem cell (hUC-MSC) conditioned medium from preterm and term infants. *J. Stem Cell Research & Therapy*, 11(1), pp. 414–428.
41. Hass, R., Kasper, C., Böhm, S., Jacobs, R. (2011). Different populations and sources of human mesenchymal stem cells (MSC): A comparison of adult and neonatal tissue-derived MSC. *J. Cell Commun Signal.*, 9(1), pp. 12–26.
42. Nagai, H., Miwa, A., Yoneda, K. et al. (2023). Optimizing the Seeding Density of Human Mononuclear Cells to Improve the Purity of Highly Proliferative Mesenchymal Stem Cells. *J. Bioengineering*, 10(1), pp.102.
43. Setaiwan, E., Purwanto, B., Wasita, B. et al. (2022). Locally injected Mesenchymal Stem Cells optimize angiogenesis by regulating VEGF and CD31 expression in duodenal perforation. *J. Ann Med Surg (Lond)*, [online]. Available at: doi: 10.1016/j.amsu.2022.104529. [Accessed 2 Sep. 2022].

44. Cheng, Y., Lin, K., Young, T. (2019). The influence of fibroblast growth factor 2 on the senescence of human adipose-derived mesenchymal stem cells during long-term culture. *J. Stem Cells Transl. Med.*, 9(4), pp.518-530.