

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

ШУВАЛОВА Надія Сергіївна

УДК.576.533+57.085.23

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

03.00.20 – біотехнологія

АВТОРЕФЕРАТ

дисертації на здобуття наукового ступеня

кандидата біологічних наук

Київ – 2021

Дисертацією є рукопис.

Роботу виконано у відділі регуляторних механізмів клітини Інституту молекулярної біології і генетики НАН України (м. Київ)

Науковий керівник: доктор біологічних наук, професор,
член-кореспондент НАН України
Кордюм Віталій Арнольдович,
Інститут молекулярної біології і генетики НАН України,
завідувач відділу регуляторних механізмів клітини.

Офіційні опоненти: доктор біологічних наук, професор кафедри екології та зоології ННЦ «Інститут біології та медицини»
Київського національного університету імені Т. Шевченка
Гарманчук Людмила Василівна;

доктор біологічних наук, професор,
завідувач лабораторії біохімії ДУ «Інститут отоларингології
ім. О.С. Коломійченка НАМН України»,
Верьовка Сергій Вікторович.

Захист відбудеться 27 квітня 2021 року о ____ годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.237.01 Інституту молекулярної біології і генетики НАН України за адресою: 03143, м. Київ, вул. Заболотного, 150.

З дисертацією можна ознайомитися в бібліотеці Інституту молекулярної біології і генетики НАН України за адресою: 03143, м. Київ, вул. Заболотного, 150.

Автореферат розіслано «__» березня 2021 року.

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради
кандидат біологічних наук, с.н.с.



I.V. Крупська

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Мезенхімальні стовбурові клітини (МСК) визнано одним з найбільш перспективних для використання у регенеративній медицині типів стовбурових клітин (Christodoulou et al., 2018, Keshtkar et al., 2018). Завдяки своїм унікальним біологічним властивостям та відсутності етичних протиріч для використання, особливу увагу привертають так звані перинатальні МСК, отримані з провізорних органів. Серед них одними з найбільш перспективних для використання у клітинній терапії, визнано МСК з Вартонова студня пупкового кантика (МСК-ВС), що виявляють унікальні секреторні та імуносупресивні властивості (Chen et al., 2010). Проте через недостатню кількість МСК у тканині-джерелі (ВС) перспектива їхнього використання залежить від розробки методів виділення та культивування клітин, що можуть забезпечити мультиплікацію в умовах *in vitro* зі збереженням їхніх терапевтичних характеристик. При цьому МСК, отримані від різних донорів, можуть розрізнятися за проліферативним потенціалом (Koltsova et al., 2018). Тому пошук універсальних методів оптимізації умов культивування залишається актуальним.

Відомо, що культивування МСК, отриманих з різних джерел у стандартних умовах CO_2 -інкубатора супроводжується старінням культури та втратою регенеративного потенціалу (Bonab et al., 2006, Yu et al., 2013). Це обмежує довготривале культивування МСК. Показано, що довготривале пасування МСК призводить до генетичної нестабільності клітин (Estrada et al., 2013), зменшення їхньої проліферативної активності та потенціалу диференціації, імунорегуляторних та секреторних властивостей (Yang et al., 2018).

Як відомо, концентрація кисню у тканинах організму, знаходиться в межах 2-9% відсотків (Mas-Bargues et al., 2019), тобто, умови CO_2 -інкубатора, де концентрація кисню майже дорівнює атмосферній, фактично, є "гіпероксичним" для клітинних культур. Однією з основних причин передчасного старіння культур в умовах *in vitro* є пошкодження ДНК реактивними формами кисню (РФК) (Choo et al., 2014). Численні дослідження показали, що рівень кисню у культуральних умовах здатний модулювати продукцію реактивних форм кисню: внутрішньоклітинний рівень РФК і пошкодження ДНК при атмосферній концентрації кисню виявлявся вищим, ніж за умов помірної гіпоксії (Damiani et al., 2018), тоді як культивування за помірної гіпоксії здатне подовжувати час проліферації різноманітних культур клітин гризунів та людини, в тому числі і ембріональних (Lu et al., 2008). Особливо важливими ці дані є для культивування МСК, оскільки відомо, що природні сайти локалізації МСК є віддаленими від судин, і можуть вважатися "гіпоксичними" у порівнянні до інших ділянок тканини-джерела (Kolf et al., 2007).

Тому на сьогоднішній день перспективним методом збереження унікальних нативних властивостей МСК з різних джерел вважається культивування за умов знижених концентрацій кисню, близьких до фізіологічних. Це було підтверджено низкою досліджень, які показали позитивний вплив культивування у фізіологічних концентраціях кисню на проліферацію МСК (Fotia et al., 2014) та їхню секреторну активність (Chen et al., 2014).

Найчастіше об'єктом досліджень ефектів культивування у гіпоксії є МСК,

отримані з кісткового мозку (Tsai et al., 2012) та інших тканин дорослого організму (Fotia et al., 2014). Питання впливу концентрацій кисню на життєдіяльність МСК-ВС є недостатньо висвітленим. Наприклад, існують відомості щодо особливостей мультиплікації в умовах *in vitro* (Nekanti et al., 2010), секреторної активності тощо (Zhao et al., 2018). Проте дані щодо одного параметру, зокрема, проліферативної активності, у різних авторів можуть суттєво відрізняються (Widowati et al., 2014, Drela et al., 2014). Крім того, питання сумісного впливу умов помірної гіпоксії на інші методи посилення терапевтичного потенціалу, як, наприклад, трансфекцію цільовими генами, є недослідженим. Окремим цікавим завданням також є пошук додаткових шляхів оптимізації методів культивування за фізіологічних концентрацій кисню. Існують дані щодо цитопротективного впливу інертних газів, зокрема аргону, на культури нейтрального походження (Loetscher et al., 2009), але відсутня інформація про біологічні ефекти інертних газів у культурах стовбурових клітин. Тому перспективними видається застосування та перевірка ефективності газової суміші зі зниженим вмістом кисню, в якій «основним» компонентом можуть бути інертні гази (зокрема, аргон), для культивування МСК.

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

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами

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

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

Для досягнення поставленої мети було поставлено наступні завдання:

1. Розробити метод створення сумішей зі зниженим вмістом кисню на основі аргону та азоту та спосіб культивування МСК-ВС в таких умовах.
2. Оптимізувати отримання первинних культур МСК-ВС методом експлантів, шляхом культивування за фізіологічних концентрацій кисню, та оцінити його ефективність.
3. Дослідити вплив газових сумішей із зниженим вмістом кисню, на основі аргону та азоту, на проліферативну активність МСК-ВС в процесі пасування культури.
4. Оптимізувати метод оцінювання морфологічних особливостей культури МСК-ВС та перевірити наявність та характер змін морфології в процесі культивування.
5. Дослідити вплив умов помірної гіпоксії на генетичну модифікацію культур МСК-ВС (невірусний метод трансфекції, за допомогою поліплексів).
6. Порівняти біологічні ефекти газових сумішей, створені на основі азоту і

аргону.

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

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

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

Наукова новизна одержаних результатів. У результаті проведеної роботи із застосуванням методів клітинної біології та біотехнології розроблено різні схеми створення газових сумішей для культивування клітин *in vitro*, зі зниженим вмістом кисню, на основі азоту та аргону, і протестовано культивування МСК-ВС. Вперше було оптимізовано методику отримання первинних культур МСК-ВС методом експлантів, за фізіологічних концентрацій кисню, показано позитивний вплив таких умов на кількість отриманих первинних культур МСК-ВС. Вперше визначено та оцінено проліферативну активність МСК-ВС за 3% кисню, в газових сумішах на основі азоту і аргону, і порівняно біологічні ефекти таких сумішей. Встановлено, що обидва склади виявляють позитивний вплив на біологічні характеристики МСК-ВС, але в суміші на основі азоту ці ефекти є більш вираженими. Завдяки розробленому та оптимізованому методу отримання культур МСК-ВС шляхом збереження та мультиплікації клітин, що спонтанно відкріпились, виявлено позитивний вплив фізіологічних концентрацій кисню, а саме збереження проліферативного потенціалу, при довготривалому культивуванні МСК-ВС. Вперше охарактеризовано морфологічні зміни МСК за умов культивування у різних газових сумішах, і встановлено, що умови помірної гіпоксії знижують кількість клітин з атипичним фенотипом при довготривалому культивуванні. Вперше культивування при фізіологічних концентраціях кисню застосовано як метод оптимізації невірусної трансфекції МСК-ВС, і показано підвищення ефективності трансфекції у таких умовах. Вперше виявлено різницю у біологічних ефектах сумішей зі зниженим вмістом кисню, створених на основі азоту і аргону.

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

бути рекомендованими для рутинного культивування МСК з метою покращення введення в культуру та мультиплікації клітин, як для наукових так і клінічних цілей. Оптимізований метод трансфекції за допомогою нанорозмірних поліплексів за умов помірної гіпоксії може бути застосований у лабораторних дослідженнях для інших клітинних культур.

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

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

Апробація матеріалів дисертації. Результати досліджень доповідалися і були представлені на 6 українських і міжнародних фахових конференціях: на міжнародній науково-практичній конференції "Генетична і регенеративна медицина: проблеми та перспективи" (Київ, Україна, 2010); на міжнародній конференції «International Life Sciences Students` Conference» (Неймеген, Нідерланди, 2010); на міжнародній конференції «The 4th international IMBG conference for young scientists "Molecular biology: advances and perspectives"» (Київ, Україна, 2011); на міжнародній науково-практичній конференції "Актуальні проблеми регенеративної медицини", (Київ, Україна, 2012); на міжнародній науково-практичній конференції «Fraunhofer Life Sciences Symposium» (Лейпциг, Федеративна Республіка Німеччина 2012); на міжнародній науково-практичній конференції «Інноваційні напрями в генетичній та регенеративній медицині» (Україна, Київ, 2017).

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

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

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Матеріали та методи дослідження

Отримання первинної культури МСК-ВС за фізіологічних концентрацій кисню. Первинні культури МСК-ВС отримували з Вартонового студню (ВС) методом експлантів. 6 випадково вибраних фрагментів ВС інкубували в чашці Петрі (35 мм) в газовій суміші, що містила 3% кисню, 5% вуглекислого газу та 92% азоту та в стандартних умовах CO₂-інкубатора. Після 17 днів культивування культури фіксували за допомогою 4% розчину формальдегіду, забарвлювали 0,1% розчином метиленового синього, та підраховували кількість та розмір колоній. Також, проводили МТТ-тест. У чашку Петрі (d=35mm) з клонами первинної культури МСК додавали розчин МТТ до фінальної концентрації 5 мг/мл. Після 4 годин інкубування середовище видаляли, додавали 1 мл ДМСО, і після розчинення у ньому кристалів формагану переносили в 96-лунковий планшет. За допомогою аналізатора Epsilon Research Limited MCC/ 340 визначали оптичну густину, при довжині хвилі 540 нм. Після пасування первинних культур підраховували кількість клітин у камері Горяєва і за допомогою забарвлення антитілами з флуоресцентними мітками (UsBiological, США) та проточного цитофлюориметра “BD FACSAria” аналізували рівні експресії поверхневих маркерних білків CD90, CD73, CD105, CD34 та CD45.

Дослідження проліферації МСК-ВС за умов помірної гіпоксії. Експериментальні групи МСК культивували в газових сумішах на основі азоту (кисень - 3%, вуглекислий газ - 4%, азот - 93%) і аргону (кисень - 3%, вуглекислий газ - 4%, аргон - 93%) і в умовах CO₂- інкубатора (атмосферна концентрація кисню, ≈20%, вуглекислий газ - 4%). На кожному пасажі МСК висівали в кількості 75x10³ на флакон, і культивували протягом 7 днів, після чого пасували і підраховували в камері Горяєва. Подвоєння популяції оцінювали за формулою: $PD = \log(N_f / N_i) / \log 2$, де N_f = кінцева кількість клітин; N_i = початкова кількість клітин (Basciano et al., 2011).

Отримання субпопуляцій МСК шляхом збереження клітин, що спонтанно відкрились. Кондиціоноване середовище обсягом 6 мл з культур на 0-2 пасажах МСК-ВС центрифугували 10 хв. при 1000 об\хв. Осад переносили у культуральні флакони з ростовим середовищем. Після досягнення достатніх розмірів, отримані клони пасували за стандартною методикою.

Морфометричний аналіз препаратів культур МСК-ВС. МСК висівали у кількості 5x10⁴ на чашку Петрі (d=35 мм) (CELLSTAR), і культивували протягом трьох днів у газових сумішах на основі азоту (кисень - 3%, вуглекислий газ - 4%, азот - 93%) і аргону (кисень - 3%, вуглекислий газ - 4%, аргон — 93%) і в CO₂-інкубаторі. Після чого фіксували в парах формаліну і забарвлювали гематоксиліном та еозином. Мікрофотографії препаратів були зроблені за допомогою інвертованого мікроскопа Leica DMIL і камери Cannon PowerShot 640A (x100, збільшення камери x1,4). На фотографіях за допомогою програми Image J вимірювали загальну площу клітини, площу ядра, довжину та ширину клітини, і розраховували ядерно-цитоплазматичне співвідношення (ЯЦС), і коефіцієнт «ширина / довжина», як відношення ширини клітини до її довжини. Активність бета-галактозидази, асоційованої зі старінням, виконували за допомогою Senescence Cells Histochemical Staining Kit (Sigma-Aldrich). Кількість забарвлених клітин підраховували на

мікрофотографіях культур.

Трансфекція МСК-ВС при фізіологічних концентраціях кисню. Для трансфекції було використано нанорозмірні поліплекси (0.4 нм), що містили плазмідну ДНК рEGFP-C1 (Clontech, США), з маркерним геном зеленого флюоресцентного білка (enhanced green fluorescent protein - EGFP), та полікатіонний носій (розгалужений поліетиленімін (ПЕІ, 25кДа) або препарат TurboFect) у ваговому співвідношенні 1:2. Культури МСК були висіяні в кількості 9×10^4 клітин на чашку Петрі, $d=35$ мм (TPP, Швейцарія) і культивовані протягом 48 годин в газових сумішах на основі азоту або аргону, що містили 3% кисню. Контрольні групи культивували в стандартних умовах CO_2 -інкубатора. Після проведення трансфекції МСК-ВС культивували за 3% кисню або в контрольних умовах. Ефективність трансфекції оцінювали за допомогою аналізу флюоресценції в трансфікованих клітинах через 48 годин на проточному цитофлюориметрі BD FACSAria (США).

Результати досліджень та їх обговорення

Для дослідження впливу умов помірної гіпоксії на життєдіяльність МСК-ВС в культурі було розроблено та перевірено два варіанти системи створення умов помірної гіпоксії.

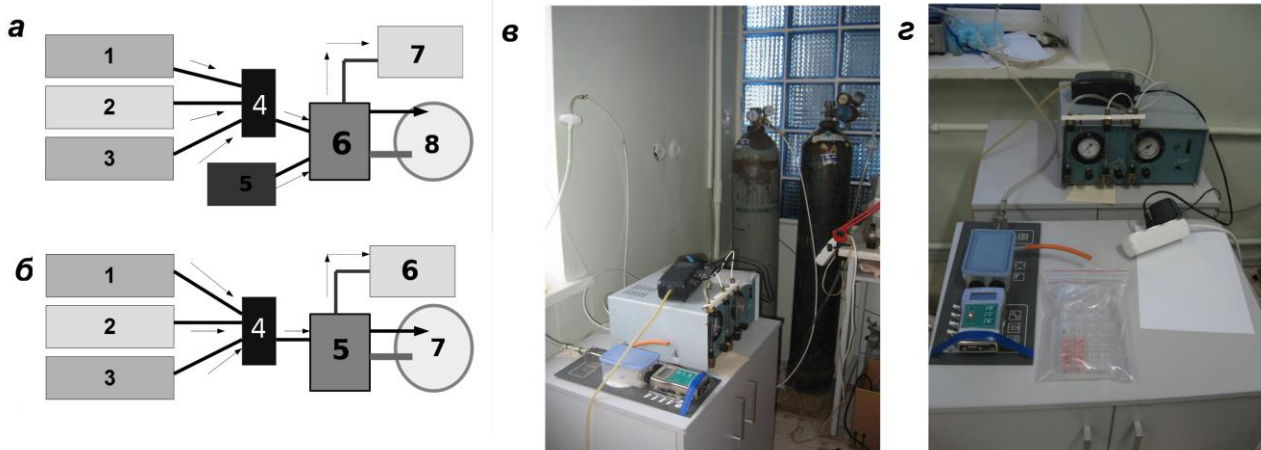


Рис. 1. Системи створення газових сумішей зі зниженим вмістом кисню. Стрілками вказаний напрямок подачі газів: *а* - схема №1: 1- балон з азотом, 2- балон з вуглекислим газом, 3- балон з аргонем, 4- ємність з ротаметрами для індикації подачі газу і клапан-перемикач для вуглекислого газу, 5- насос для подачі атмосферного повітря, 6- контрольний контейнер для вимірювання концентрації кисню та CO_2 , 7 - газовий аналізатор ПГА-200, 8- герметичний пакет із застіркою ZipLock; *б* - схема №2: 1- балон з азотом, 2- балон з вуглекислим газом, 3- балон з аргонем, 4- ємність з ротаметрами для індикації подачі газу і клапан-перемикач для вуглекислого газу, 5- контрольний контейнер для вимірювання концентрації кисню та CO_2 , 6 - газовий аналізатор ПГА-200, 8- герметичний пакет із застіркою ZipLock; *в* - загальний вигляд системи для створення газових сумішей, за схемою №1; *г* - газовий аналізатор та система змішування за схемою №2

Кожна зі схем складалась з двох "блоків": системи створення газової суміші, та контейнеру для культурального посуду. Джерелом кисню в обох системах було атмосферне повітря. Система №1 для створення газової суміші з потрібною

концентрацією кисню мала насос, який подавав атмосферне повітря у контейнер для створення газової суміші потрібного складу. Стосовно системи №2, газову суміш потрібної концентрації створювали шляхом повільної подачі азоту (або аргону) та вуглекислого газу у пакет з культуральним посудом, у якому було залишено невеликий об'єм атмосферного повітря, спостерігаючи за показниками на аналізаторі, приєднаному до "контрольного" контейнера. В ході виконання експериментів було також оптимізовано "конструкцію" контейнера для вміщення культурального посуду. Оптимальною виявилась двокомпонентна система: посуд з культурою вміщували в пакет з герметичною застібкою, який, після наповнення вміщували у вакуумний контейнер.

Другим етапом підготовки до основного дослідження стала оптимізація процедури отримання МСК-ВС за допомогою методу експлантів. При цьому виявлено, що серед пупкових канатиків спостерігалась значна морфологічна гетерогенність (рис. 2).



Рис. 2. Особливості будови пупкових канатиків: а - ПК із ділянками гелеподібної тканини ВС в надмірній кількості; б - ПК із наявністю "петель", утворених судинами, біля поверхні; в - наявність крововиливів

Встановлено, що отримані зразки значно варіюють за діаметром поперечного перерізу канатика (від 1 см до 2,3 см), щільністю та кольором студня (наприклад, напіврідкий гелеподібний, щільний, або гетерогенний, який містив ділянки різної щільності тощо), особливостями судин (діаметром, механічною міцністю при видаленні, наявністю внутрішніх ушкоджень і крововиливів у ВС) та наявністю нетипових елементів будови - наприклад, "петель", утворених судинами, ділянок з надлишковою кількістю гелеподібного студню тощо (рис. 3).

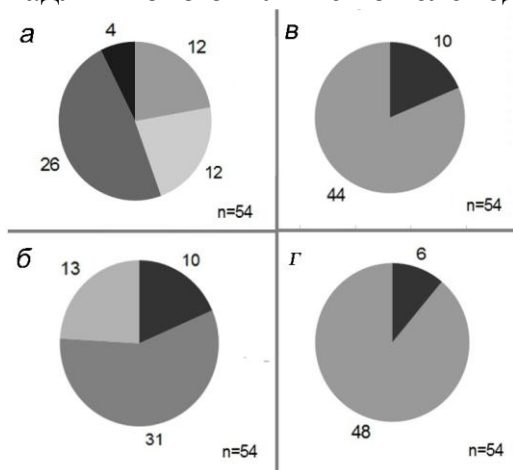


Рис. 3. а - розподіл особливостей типу тканини Вартонова студня серед оброблених зразків, кількість випадків серед досліджених (всього n=54): ■ - желеподібний, ■ - помірний, ■ - гетерогенний, ■ - щільний; б - діаметри пупкових канатиків (всього n=54): ■ - <1 см, ■ - 1-1,5 см, ■ - >1 см; в - ■ наявність крововиливу та інфільтрації тканини студню еритроцитами у тканині ВС, ■ - зразки ПК без особливостей; г - ■ - наявність особливостей будови ПК (аномалії судин та сполучної тканини студню) серед оброблених зразків, ■ - зразки ПК без особливостей, n=54

Враховавши виявлені особливості, вдалось оптимізувати відомі з літератури методи виділення МСК-ВС шляхом експлантів (Margossian et al., 2012, Yoon et al., 2013), і розробити універсальний протокол отримання МСК з ВС, який в подальшому було застосовано для отримання МСК-ВС для усіх наступних досліджень. Етапи обробки тканини ВС представлено на рис. 4.



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

Встановлено, що у більшості випадків приблизно на 5-14 добу від початку інкубування фрагментів на дні культурального посуду можна спостерігати окремі фібробластноподібні клітини, або групи кількістю до 10 клітин, час появи та початкова кількість яких значно варіювала у різних донорів. Так, за умови культивування однакової кількості фрагментів ВС (розподілених випадково з різних ділянок пупкового канатика), з культурального флакона 25 см² від різних донорів через 10 днів від появи перших клітин можна отримати від 50 до 300 тис. клітин первинної культури (рис 5).

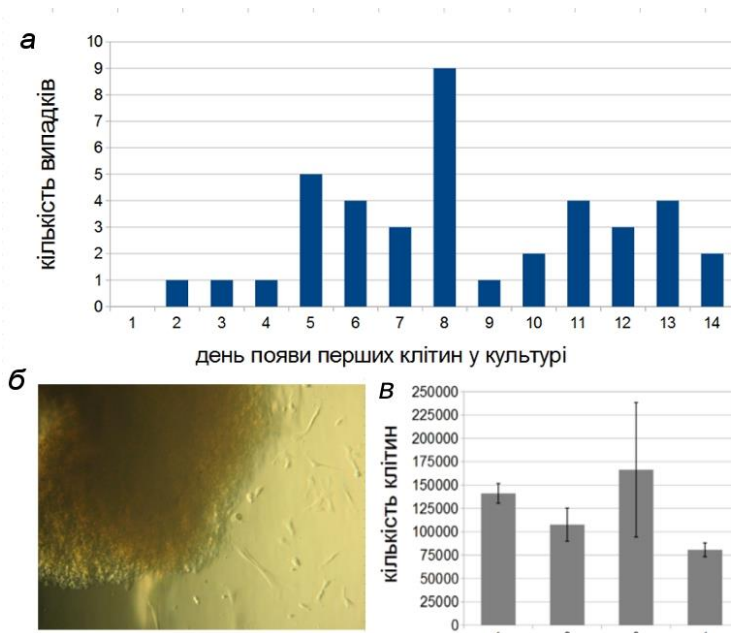


Рис. 5. Отримання первинної культури МСК-ВС: *а* - день появи перших адгезивних клітин; *б* - поодинокі клітини та фрагмент Вартонового студню, світлова мікроскопія (x40, збільшення камери 1,4); *в* - кількість клітин, яку можна отримати з флакону 25 см², 10 день після появи перших клітин, 4 незалежні досліди

Встановлено, що ВС може не втрачати здатності бути джерелом МСК до 30-35 днів. Виявлено, що фрагменти ВС, після 10-20 днів культивування (залежно від донорських особливостей), змінюють зовнішній вигляд: зменшуються в розмірах і

набувають округлої форми (рис. 6,а).

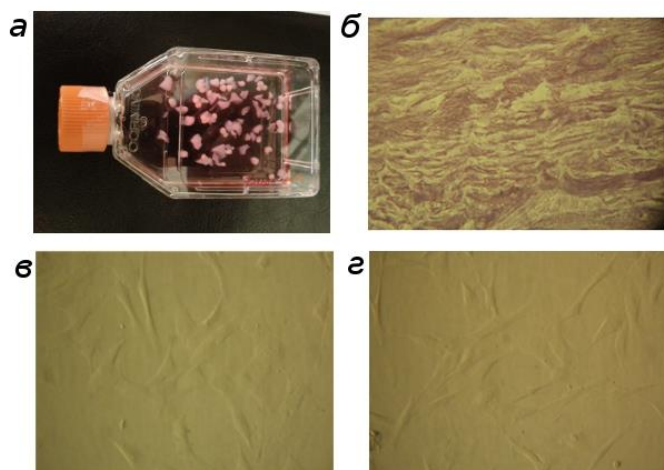


Рис. 6. Довготривале культивування фрагментів ВС: *а* - фрагменти ВС, що набули округлої форми (флакони 25 см²); *б* - тканина ВС, 20 доба інкубування (світлова мікроскопія, x200, збільшення камери 1,4); *в* - морфологія клонів МСК, 18 день інкубування фрагментів (від появи одиничних клітин - 10 день), x100, збільшення камери 1,4; *г* - морфологія клонів МСК, 36 день інкубування фрагментів (від появи одиничних клітин - 8 день), x100, збільшення камери 1,4

Гістологічний аналіз фрагментів свідчить про деградацію колагенових волокон студню (рис. 6, б). Варто зауважити, клітин виявлено не було, що може свідчити про їхню незначну вихідну кількість та нерівномірне розташування у міжклітинному матриксі ВС. Клітини, на початку та в кінці інкубування фрагментів ВС, не відрізняються за рівнем експресії поверхневих маркерів та особливостями морфології (рис. 6, в, г).

Наступним етапом роботи стало дослідження впливу умов помірної гіпоксії на отримання первинної культури МСК-ВС. Враховуючи нерівномірність розташування МСК в тканині ВС, було розроблено схему відбору фрагментів в експериментальні та контрольні групи (рис. 7, а).

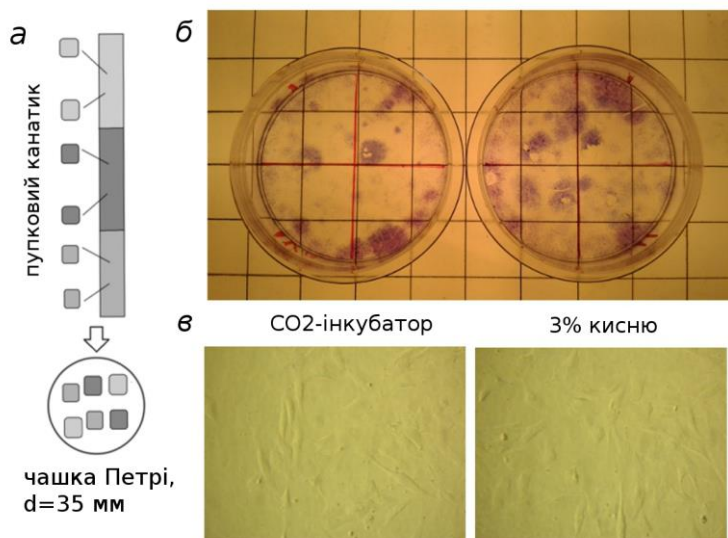


Рис. 7. Введення МСК-ВС в культуру при фізіологічних концентраціях кисню: *а* - схема відбору фрагментів ВС для порівняння різних умов культивування; *б* - зовнішній вигляд чашок Петрі (35 мм) з клонами, забарвлення метиленовим синім: зліва - культури зі стандартних умов CO₂-інкубатора, справа - культивовані у газовій суміші, 3% кисню (3% кисню, 5% CO₂, 92% азот), мікрофотографія; *в* - культури МСК-ВС (світлова мікроскопія x100, збільшення камери 1,4): зліва – з умов CO₂-інкубатора, справа - з газової суміші (3% кисню, 5% CO₂, 92% азот)

Фрагменти ВС з експериментальної групи було інкубовано в газовій суміші, що містила 3% кисню, 5% вуглекислого газу та 92% азоту, з контрольних груп - в стандартних умовах CO₂-інкубатора. Після 17 днів культивування за допомогою світлової мікроскопії було виявлено, що клони, культивовані при 3% кисню, мають

більший розмір (рис. 7, б). При цьому, клітини зберігали характерну для МСК морфологію. Клітин з атиповою морфологією не було виявлено в жодній експериментальній групі (рис. 7, в).

Встановлено, що кількість МСК-ВС, культивованих при 3% кисню, була більшою порівняно з контрольними умовами (рис. 8, а).

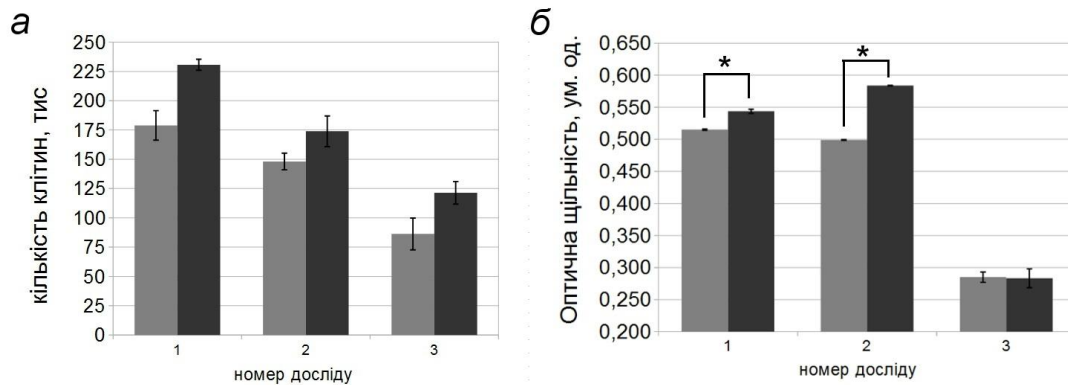


Рис. 8. Кількість клітин та активність метаболізму первинних культур МСК-ВС: *а* - кількість клітин після 17 днів інкубування фрагментів ВС, дані представлено як середнє \pm середнє квадратичне відхилення; *б* - МТТ-тест, оптична щільність, ум.од. Дані представлено як середнє \pm середнє квадратичне відхилення. ■ 3% кисню, 5% CO₂, 92% азот, ■ -CO₂-інкубатор, * - $p < 0,05$

Оптична щільність в МТТ-тесті відрізнялись у трьох незалежних дослідях, в яких було використано матеріал від різних донорів. У двох із трьох донорів інтенсивність утворення формагану була вищою у культур з умов помірної гіпоксії, що відповідало більшій кількості клітин при підрахунку (рис. 8, б). У одному варіанті, показник оптичної щільності був практично однаковим у групах, культивованих при 3% кисню, та в умовах CO₂-інкубатора. Це може свідчити про різний характер інтенсивності метаболічних процесів у культурах, отриманих від різних донорів.

Наступним етапом роботи стала оцінка впливу фізіологічних концентрацій кисню на проліферативну активність МСК-ВС (рис. 9).

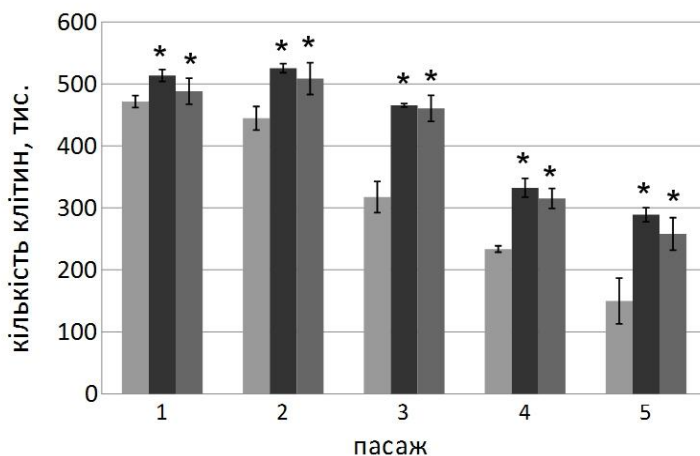


Рис. 9. Порівняння кількості клітин в культурах МСК на кожному пасажі, після 7 днів культивування: ■ в CO₂-інкубаторі, ■ - в газовій суміші на основі азоту (кисень - 3%, вуглекислий газ - 4%, азот - 93%), ■ в газовій суміші на основі аргону (кисень - 3%, вуглекислий газ - 4%, аргон - 93%); * - різниця між дослідним і контрольним варіантом достовірна ($p < 0,05$)

МСК-ВС культивували в газових сумішах, що містили 3% кисню, на основі азоту

або аргону. Контрольну групу культивували в стандартних умовах CO₂- інкубатора. Незважаючи на виявлене зниження проліферативної активності МСК-ВС в процесі пасування культури, на п'яти досліджених пасажах, кількість клітин після 7 днів культивування при 3% кисню була більшою, ніж у загальноприйнятих умовах CO₂-інкубатора. Підвищення проліферативної активності клітин у суміші на основі азоту було більш вираженим. Також, в цих умовах МСК-ВС після 7 днів культивування в середньому проходили більшу кількість поділів (табл. 1).

Таблиця 1

Кількість подвоєнь в культурах МСК-ВС

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

Після першого пасування поводити оцінювання рівнів. У досліді було використано культури, експресія маркерних білків у яких була вище 95%. У середньому, у культур, використаних у наших досліді, рівні були наступними: CD90 - 98,55±0,64%, CD73 - 98,25±0,49%, CD105 - 97,4±2,55 %. Додатковим дослідженням стало визначення експресії вказаних поверхневих маркерних білків у культур МСК-ВС, культивованих при 3% кисню, у різних газових сумішах та умовах CO₂- інкубатора, після п'ятого пасажу (рис. 10).

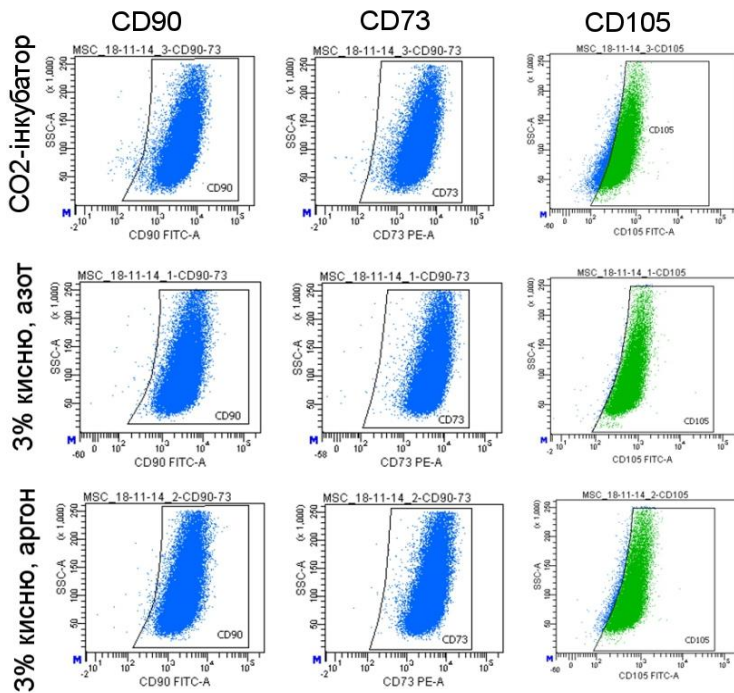


Рис. 10. Рівень експресії поверхневих маркерних білків, 5 пасаж, проточна цитофлуориметрія (FACSAria)

Отримані результати свідчать про те, що умови культивування не впливали на рівень експресії поверхневих маркерів (табл. 2).

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

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

Додатковим завданням була оптимізація культивування МСК-ВС, отриманих шляхом збереження та мультиплікації клітин, які спонтанно відкріплюються від субстрату, в стандартних умовах CO₂-інкубатора та за умов помірної гіпоксії. Відомо, що ступінь адгезії клітин до субстрату перед поділом знижується (They et al., 2006). Встановлено, що в культуральному посуді, куди перенесли кондиціоноване середовище, відібране з культури МСК-ВС, через 2-5 днів можна спостерігати прикріплені клітини, які з часом можна пасувати і отримувати життєздатні культури. За морфологією і маркерними характеристиками отримані таким чином клітини відповідають МСК-ВС вихідної культури. Для дослідження було потрібно стандартизувати початкову кількість клітин і час між пасуванням. Неіморталізовану лінію МСК-ВС, яку з етапу первинної культури пасували лише за допомогою розчину трипсину і версену (ТВ), умовно позначали як "основну". На кожному пасажі, починаючи з нульового, збирали кондиціоноване середовище, центрифугували і переносили на інший флакон 25 см². Культури МСК-ВС, отримані в результаті подальших пасувань отриманих клонів за допомогою ТВ, умовно називали "побічними".

Встановлено, що у стандартних умовах CO₂-інкубатора характер проліферації в "побічних" лініях був аналогічний такому в "основній". Рівень мультиплікації МСК з кожним пасуванням знижувався у всіх варіантах. Зниження проліферативної активності в "побічних" лініях, отриманих з 0го і 1го пасажів, відбувалось практично таким же чином, як і в культурах, пасованих за стандартною методикою. Для "побічних" культур, отриманих з МСК-ВС на другому пасажі, рівень проліферації був суттєво нижчим, ніж в "основній" лінії (табл. 3).

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

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

Виявлено, що на третьому і четвертому пасажах у культурах почали з'являтися клітини розпластаної форми, типової для старіючих клітин. Для культур "основної" та "побічних" ліній з нульового та першого пасажів ці явища проявлялись практично на одному рівні, тоді як їхня кількість у "побічній" лінії з другого пасажу була помітно більшою (рис. 11).

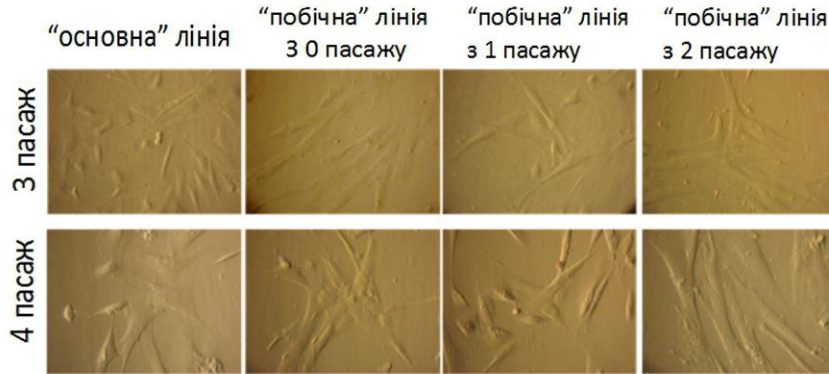


Рис. 11. Мікрофотографії культур на 3 та 4 пасажах, у «основній» і «побічних» ліній з 0, 1 і 2 пасажів (x100, збільшення камери x1,4)

З метою оцінки впливу культивування за умов помірної гіпоксії, "основні" та "побічні лінії" культивували у газових сумішах на основі азоту (кисень - 3%, вуглекислий газ - 4%, азот - 93%) і аргону (кисень - 3%, вуглекислий газ - 4%, аргон - 93%). Встановлено, що кількість МСК-ВС у обох газових сумішах, була достовірно більшою, порівняно з контрольними умовами. Позитивний ефект суміші на основі аргону був більш вираженим (рис. 12).

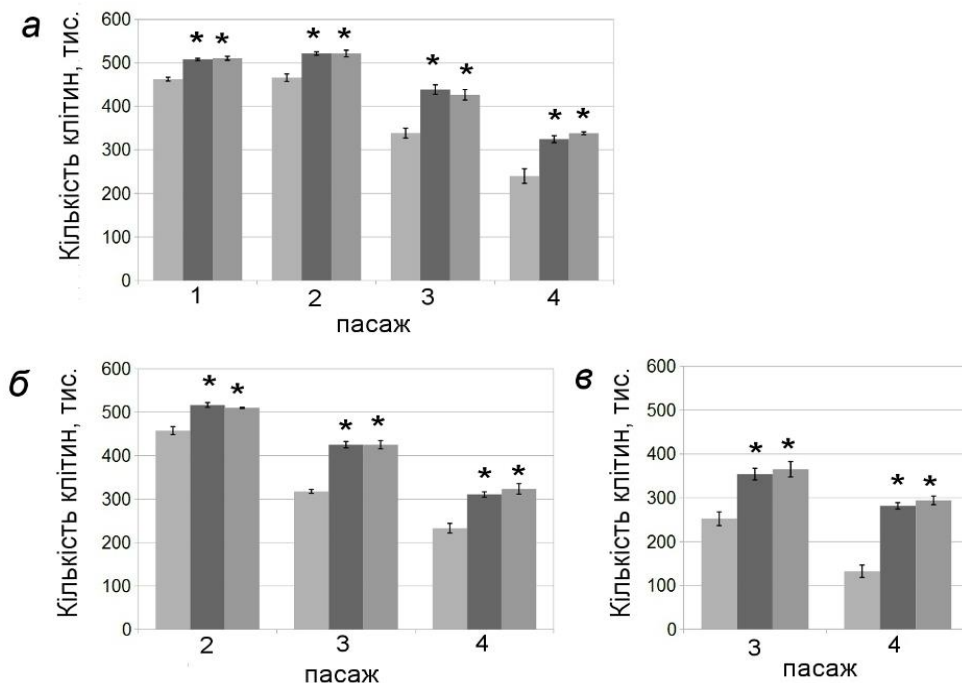


Рис. 12. Порівняння кількості клітин в культурах МСК-ВС, отриманих методом "самопересіву" на кожному пасажі, після 7 днів культивування, ■ в CO₂-інкубаторі, ■ газова суміш на основі азоту (кисень - 3%, вуглекислий газ - 4%, азот - 93%), ■ газова суміш на основі аргону (кисень - 3%, вуглекислий газ - 4%, аргон — 93%). а - з нульового пасажу, б - з першого пасажу, в - з другого пасажу; * - різниця між дослідним і контрольним варіантом достовірна (p<0.05)

Наступним етапом роботи став аналіз морфології МСК-ВС, культивованих в газових сумішах, що містять 3% кисню, на основі азоту і аргону. Встановлено, що у культурах на всіх досліджених пасажах домінували клітини з "класичною" фібробластоподібною морфологією і веретеновидною формою. На третьому пасажі в усіх групах можна було спостерігати появу клітин з атипичним фенотипом, притаманним старіючим клітинам. Вони мали більші розміри, і так звану «розпластану» форму: «полюса» веретена слабо виражені, співвідношення ширини клітини до її довжини більш високе (рис. 13).

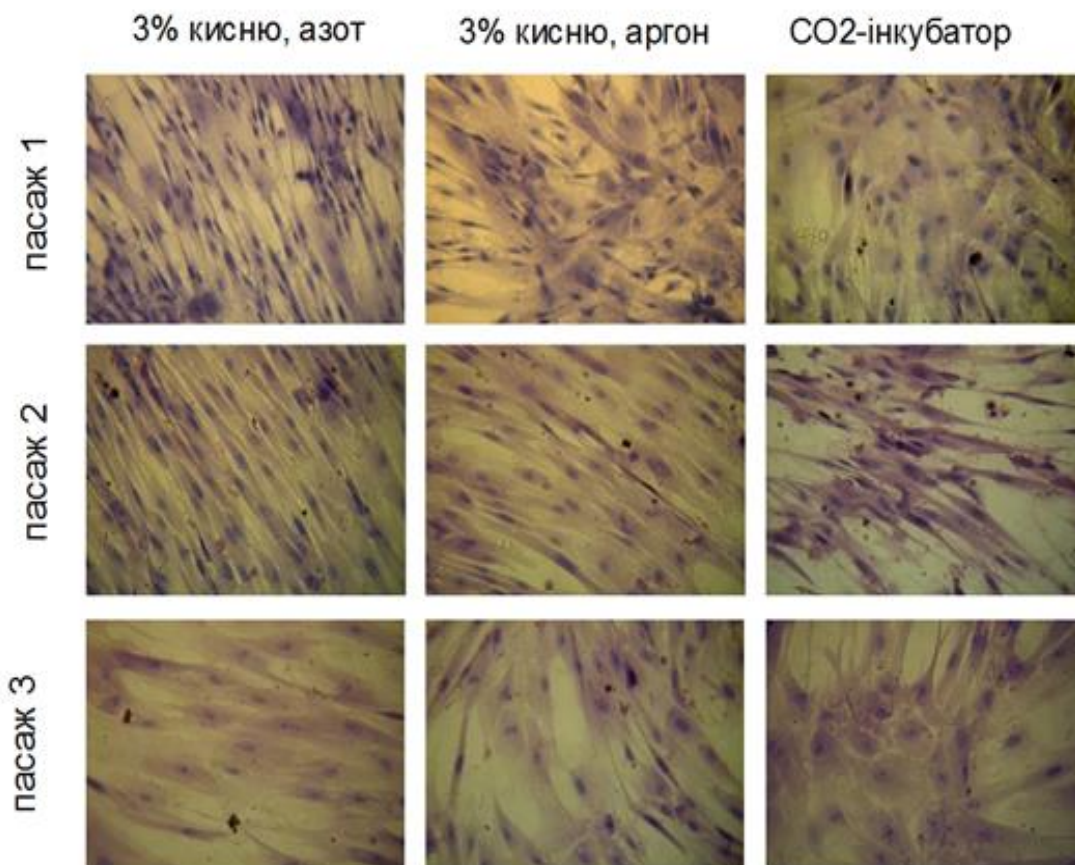


Рис. 13. Морфологічний аналіз культур МСК-ВС, фіксація 4% розчином формаліну, забарвлення гематоксиліном та еозином (x100, збільшення камери x1,4)

У ході досліджень було визначено ЯЦС і співвідношення "ширина/ довжина" для кожної клітини, розраховано коефіцієнти варіації. Встановлено, що ступінь гетерогенності за морфометричними показниками відрізнявся у МСК-ВС на різних пасажах (рис. 14).

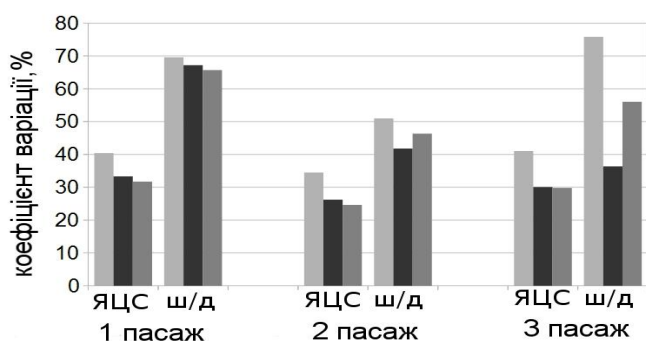


Рис. 14. Коефіцієнти варіації в культурах МСК-ВС, 1-3 пасажі: ■ в CO₂-інкубаторі, ■- в газовій суміші на основі азоту (кисень - 3%, вуглекислий газ - 4%, азот - 93%), ■ - в газовій суміші на основі аргону (кисень - 3%, вуглекислий газ - 4%, аргон — 93%)

Найвищий рівень морфологічної гомогенності можна було спостерігати у культурах на другому пасажі. Також, вдалось виявити вплив фізіологічних концентрацій кисню на рівень морфологічної гетерогенності культур. МСК-ВС, культивовані в газових сумішах при 3% кисню, були менш гетерогенними, ніж культури в стандартних умовах CO₂-інкубатора. На третьому пасажі, кількість МСК-ВС з фенотипом, типовим для старіючих клітин, у популяціях, культивованих при 3% кисню (в обох газових сумішах), була меншою, ніж у культурах зі стандартних умов CO₂-інкубатора. Найбільш морфологічно однорідними були МСК, культивовані в суміші на основі азоту. Найвищий рівень гетерогенності спостерігали при атмосферному вмісті кисню.

Було проведено дослідження активності асоційованої зі старінням бета-галактозидази (SA-в-gal) у культурах МСК-ВС на третьому пасажі, в стандартних умовах CO₂-інкубатора, та газових сумішах, що містять 3% кисню (рис. 15) та одночасно підраховано кількість клітин з "розпластаною" формою, з такими параметрами: коефіцієнтом "ш\д" більше 0,35 і ЯЦС менше 0,3.

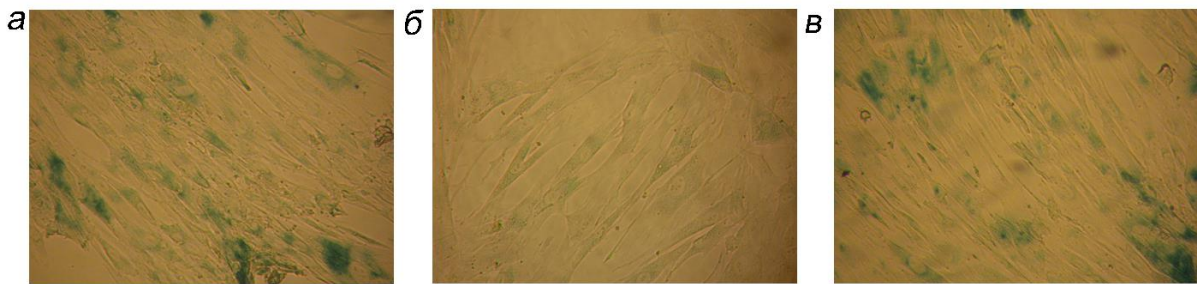


Рис 15. Мікрофотографії МСК-ВС (x100, збільшення камери x1,4), тест на активність асоційованої зі старінням бета-галактозидази (SA-β-gal): *а* - в CO₂-інкубаторі, *б* – в газовій суміші на основі азоту (кисень - 3%, вуглекислий газ - 4%, азот - 93%), *в* - в газовій суміші на основі аргону (кисень - 3%, вуглекислий газ - 4%, аргон — 93%)

Результати показали трьох незалежних дослідів показали значну гетерогенність у активності SA-в-gal. У популяціях, культивованих за 3% кисню, в суміші на основі азоту, рівень активності SA-в-gal був найнижчим, і розбіжність між показниками всередині одного варіанту була найменш вираженою (в середньому по досліді, 5,02±1,58%). У групах, культивованих у суміші на основі аргону, в цілому рівень експресії був меншим, ніж в контрольній групі: в середньому по досліді, 7,95±1,73% в групах із суміші на основі аргону і 11,43±4,18 % в стандартних умовах CO₂-інкубатора.

Встановлено, що відсоток МСК-ВС з високим рівнем активності SA-в-gal, у всіх варіантах був більшим за відсоток клітин з "розпластаною" формою. Найнижчі відсотки обох показників спостерігались у групах МСК-ВС, культивованих при 3% кисню, в суміші на основі азоту (рис 15,б). Показники культур із сумішей на основі аргону також були нижчими, ніж в умовах CO₂-інкубатора, але характеризувались значною гетерогенністю всередині груп. Можна зробити висновок, що культивування в суміші на основі азоту сприяло запобіганню процесам старіння в культурах МСК-ВС.

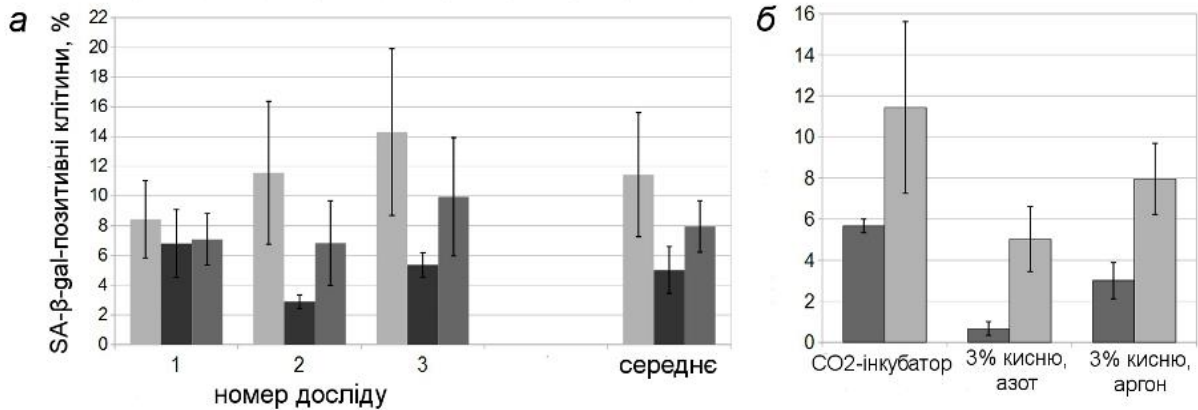


Рис. 16. а - активність SA-β-gal в культурах МСК-ВС, 3 пасаж, дані представлені як відсотки ± середнє квадратичне відхилення: ■ в CO₂-інкубаторі, ■- газова суміш на основі азоту (кисень - 3%, вуглекислий газ - 4%, азот - 93%), ■ газова суміш на основі аргону (кисень - 3%, вуглекислий газ - 4%, аргон — 93%); **б** - ■ відсоток МСК-ВС з "розпластаною формою" ■ відсоток клітин з вираженою активністю SA-β-gal, у групах, культивованих в умовах CO₂-інкубатора, та газових сумішах на основі азоту (кисень - 3%, вуглекислий газ - 4%, азот - 93%) та аргону (кисень - 3%, вуглекислий газ - 4%, аргон — 93%)

Оскільки було встановлено, що умови помірної гіпоксії (3% кисню) підвищують проліферативну активність культур МСК-ВС, і мають позитивний вплив на збереження нормальної морфології при довготривалому культивуванні, наступним етапом роботи стала розробка та перевірка ефективності оптимізації невірусної трансфекції МСК-ВС за допомогою умов помірної гіпоксії. МСК-ВС було культивовано в різних газових сумішах: на основі азоту (кисень - 3%, CO₂ - 5%, азот - 92%), і на основі аргону (кисень - 3%, CO₂ - 5%, аргон - 92%), до та після процедури трансфекції за допомогою нанорозмірних поліплексів рEGFP-C1/PEI та рEGFP-C1/TurboFect. Ефективність трансфекції оцінювали за допомогою проточної цитофлюориметрії, як кількість флюоресцентних клітин, що експресують eGFP.

Виявлено, що найбільшу інтенсивність флюоресценції візуально можна спостерігати через 48 годин. Виразених відмінностей у морфології клітин в контрольній та експериментальних групах протягом всього часу культивування після процедури трансфекції виявлено не було (рис. 17).



Рис.1 7. Флюоресценція в культурі МСК-ВС, 48 годин після трансфекції, x100, збільшення камери x1,4

Встановлено, що ефективність трансфекції значно варіювала в різних дослідях (рис 18).

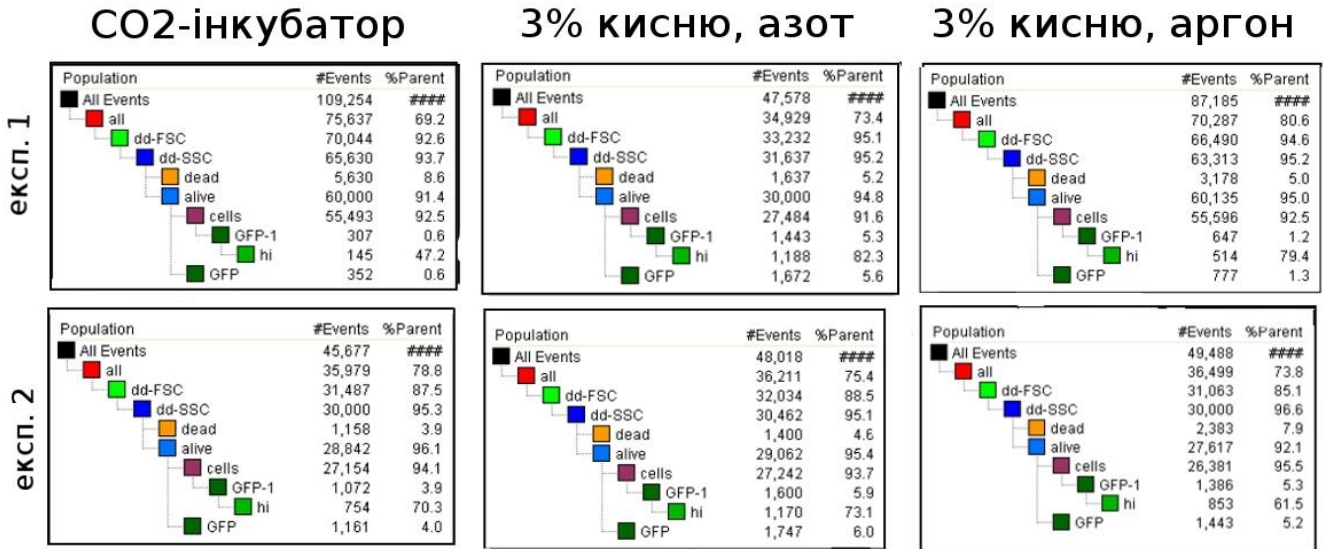


Рис. 18. Ефективність трансфекції, експерименти, проведені з ПЕІ, умови: CO₂-інкубатор, газова суміш на основі азоту (кисень - 3%, CO₂ - 5%, азот - 92%), газова суміш на основі аргону (кисень - 3%, CO₂ - 5%, аргон - 92%)

Згідно отриманих даних, у всіх дослідів відсоток трансфікованих МСК-ВС був достовірно більшим у суміші на основі азоту, ніж в контрольній групі зі стандартних умовах CO₂-інкубатора. Щодо культур МСК-ВС, які було культивовано в суміші на основі аргону, у 5 із 7 дослідів процент трансфікованих клітин в них виявився вищим, ніж у групах з CO₂ - інкубатора, хоча статистичний аналіз не показав значущої різниці між ними та культурами з контрольної групи. Співвідношення між відсотком eGFP-позитивних клітин в експериментальних групах та цим показником у контрольній групі наведено в таблиці 4.

Таблиця 4.

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

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

Загалом, культивування в суміші на основі азоту значно підвищувало ефективність трансфекції. У суміші на основі аргону також спостерігалось підвищення відсотку eGFP-позитивних клітин, порівняно з контролем, але цей ефект був менш вираженим, ніж в суміші на основі азоту (рис. 19).

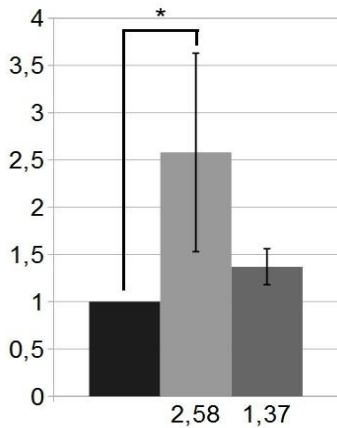


Рис. 19. Співвідношення між процентами eGFP-позитивних клітин в контрольній та експериментальних групах: ■ в CO₂-інкубаторі, ■- в газовій суміші на основі азоту (кисень - 3%, вуглекислий газ - 4%, азот - 93%), ■ в газовій суміші на основі аргону (кисень - 3%, вуглекислий газ - 4%, аргон — 93%), дані наведено як середнє ± середнє квадратичне відхилення, n=7; різниця з контролем достовірна, *p < 0.05

Встановлено, що відмінності між відсотком живих і мертвих клітин у різних групах були незначними. В середньому, відсоток живих клітин після 48 годин після трансфекції сягав $89,6 \pm 5,29\%$ в контрольній групі, $85,85 \pm 7,4\%$ в суміші на основі азоту і $88,4 \pm 5\%$ в суміші на основі аргону.

ВИСНОВКИ

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

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

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

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

4. Встановлено, що культивування МСК в газових сумішах, що містять 3% кисню, призводить до зниження гетерогенності клітинної культури в ході її пасування, і зниження кількості клітин з фенотипом, притаманним старіючим клітинам, у порівнянні з культивуванням у стандартних умовах CO₂-інкубатора. Встановлено, що в суміші на основі азоту ступінь гетерогенності і кількість МСК-ВС із фенотипом, характерним для старіючих клітин, були найнижчими.

5. Вперше показано, що культивування МСК-ВС у газових сумішах зі зниженим містом кисню сприяє підвищенню ефективності трансфекції таких клітин плазмідною ДНК. Відсоток eGFP-позитивних клітин, був більшим в середньому у 2,58 в суміші на основі азоту, та 1,37 рази в суміші на основі аргону, у порівнянні з умовами CO₂-інкубатора.

6. Вперше виявлено різницю у біологічних ефектах сумішей з однаковим

вмістом кисню, створених на основі азоту або аргону, на проліферативні і морфологічні особливості та ефективність невірусної трансфекції МСК-ВС.

СПИСОК РОБІТ, ЩО ОПУБЛІКОВАНІ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

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

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

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

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

5. **Shuvalova N. S.,** Toporova E. K., Kordium V. A. Transfection of mesenchymal stem cells at physiological oxygen concentrations // *Biopolym. Cell.* - 2020. - Vol.36 №6. - P. 433 - 445 (*Особистий внесок здобувача: аналіз літературних джерел, проведено отримання, культивування та дослідження морфології МСК-ВС, аналіз результатів, підготовка роботи до публікації*).

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

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

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

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

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

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

АНОТАЦІЯ

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

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук (доктора філософії) за спеціальністю 03.00.20 «Біотехнологія» (09 – біологічні науки) – Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, Київ, 2021.

Дисертація присвячена оптимізації культивування мезенхімальних стовбурових клітин Вартонова студня людини (МСК-ВС), шляхом застосування умов фізіологічних концентрацій кисню, та дослідженню впливу цих умов на життєдіяльність МСК-ВС. У результаті роботи розроблено схеми створення сумішей зі знизеним вмістом кисню, на основі аргону та азоту. Виявлено, що введення МСК-ВС у культуру методом експлантів за фізіологічних концентрацій кисню (3%) сприяє підвищенню кількості отриманих клітин, незалежно від особливостей тканини Вартонова студня. Встановлено, що культивування при 3% кисню підвищує рівень

проліферації МСК-ВС на всіх досліджених пасажах і не впливає на рівень експресії поверхневих маркерних білків. Вперше показано, що на всіх досліджених пасажах МСК-ВС, культивовані в газових сумішах з 3% кисню, були більш гомогенними за морфологією та містили меншу кількість клітин з фенотипом, типовим для старіючих, у порівнянні з культурами з умов CO₂-інкубатора. В суміші на основі азоту культури були найбільш гомогенними і містили найменшу кількість МСК-ВС з фенотипом, притаманним старіючим клітинам. Вперше встановлено, що культивування та проведення процедури трансфікування МСК-ВС невірусними методами, за допомогою нанорозмірних поліплексів, у газових сумішах зі зниженим вмістом кисню (3%) сприяє підвищенню ефективності трансфекції. Найбільший відсоток трансфікованих клітин виявлено у суміші на основі азоту.

Розроблені в результаті роботи оптимізації мають позитивний вплив на життєдіяльність МСК-ВС в умовах *in vitro*. Вперше виявлено наявність різниці у ефектах газових сумішей, створених на основі азоту і на основі аргону.

Ключові слова: мезенхімальні стовбурові клітини, Вартонов студень, клітинні культури, гіпоксія, фізіологічні концентрації кисню, аргон, первинні культури, морфологія клітинних культур, невірусна трансфекція.

АННОТАЦІЯ

Шувалова Н.С. Оптимизация кислородного состояния для культивирования мезенхимальных стволовых клеток пупочного канатика человека. - Квалификационный научный труд на правах рукописи.

Диссертация на соискание учёной степени кандидата биологических наук (доктора философии) по специальности 03.00.20 «Биотехнология» (09 – биологические науки) – Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины, Киев, 2021.

Диссертация посвящена оптимизации культивирования мезенхимальных стволовых клеток Вартонова студня человека (МСК-ВС) с помощью применения условий физиологических концентраций кислорода, и исследованию влияния этих условий на жизнедеятельность МСК-ВС. В результате работы разработаны схемы создания (приготовления) газовых смесей с пониженным содержанием кислорода, на основе азота и аргона. Обнаружено, что введение МСК-ВС в культуру методом эксплантов при физиологических концентрациях кислорода (3%) способствует повышению количества полученных клеток, независимо от особенностей ткани Вартонова студня. Установлено, что культивирование МСК-ВС при 3% кислорода повышает уровень пролиферации МСК-ВС на всех исследованных пассажах, и не влияет на уровень экспрессии поверхностных маркерных белков. Впервые показано, что на всех исследованных пассажах МСК-ВС, культивированные в газовых смесях с 3% кислорода, были более гомогенными, и содержали самый низкий процент клеток с фенотипом, характерным для стареющих. Впервые определено, что культивирование и проведение процедуры трансфекции МСК-ВС невірусними методами, з допомогою нанорозмірних поліплексів, в газових сумішах з пониженим вмістом кисню (3%) сприяє підвищенню ефективності трансфекції. Самий найбільший відсоток трансфікованих клітин було отримано в

смеси на основе азота.

Разработанные в результате работы оптимизации позитивно влияют на жизнедеятельность МСК в условиях *in vitro*. Впервые обнаружено наличие разницы в эффектах газовых смесей на основе азота и аргона.

Ключевые слова: мезенхимальные стволовые клетки, Вартонов студень, культуры клеток, гипоксия, физиологические концентрации кислорода, аргон, первичные культуры, морфология клеточных культур, невирусная трансфекция.

SUMMARY

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

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

The present PhD thesis is dedicated to the study of cultivation of mesenchymal stem cells (MSC) derived from Wharton jelly (WJ-MSC) under physiologic oxygen concentrations.

In present work, two systems for composing the gas mixtures with low oxygen concentrations and two protocols for gas mixture creation, based either on nitrogen or argon, were developed and tested for cultivation of WJ-MSC. We also optimized the method of umbilical cord processing for explant obtaining.

The obtaining of WJ-MSC primary cultures by explant method in gas mixtures with 3% oxygen showed, that the number and size of WJ-MSC colonies were higher under conditions of mild hypoxia, comparing to standard CO₂-incubator conditions. The number of cells in primary cultures was $137,76 \times 10^3 \pm 27,27 \times 10^3$ standard conditions of CO₂-incubator, and $175,31 \times 10^3 \pm 21,34 \times 10^3$ in 3% oxygen. On average, the number of WJ-MSC in conditions of mild hypoxia was 1,27 fold higher. The study of metabolic activity of primary WJ-MSC cultures showed the high level of heterogeneity between populations, obtained from different donors. On average, the optical density in MTT-test was 1,35 fold higher under 3% oxygen, comparing to standard CO₂-incubator conditions.

The study of WJ-MSC proliferative activity in gas mixtures, containing 3% oxygen, based either on nitrogen or argon, showed, that after 7 days of cultivation, at passages 1 to 5, the numbers of cells in WJ-MSC cultures maintained in 3% oxygen gas mixtures were larger, than in control group from standard CO₂-incubator conditions, even after slight decrease in proliferative activity after passage 3. At passage 1, multiplication in cell number in groups from nitrogen-based gas mixtures was 6,8-fold, in argon-based mixture - 6,4, and 6,1 in control group. At passage 2, the cell number has grown 6,9 times in nitrogen-based mixture, 6,8 times in argon-based mixture, in control group - 6 times. At passage 3 we observed 6,6, and 4,1 fold multiplication respectively. The present work is the first to reveal the difference in biological effects of gas mixtures, with nitrogen and argon as "base" component, on WJ-MSC. The nitrogen-based gas mixture appeared to be the most effective in all variants.

We also developed the method of multiplication of WJ-MSC, spontaneously detached from substrate, presumably, before or during cell division. The study revealed

that the proliferative activity in "side lines", obtained from spontaneously detached cells (SDC) at passage 0 and 1, was nearly similar to one of cultures, passed with trypsin-EDTA solution. The proliferation level in cultures, obtained from SDC collected on passage 2, appeared to be significantly lower, than that in the trypsin-EDTA passed line. We also found, that WJ-MS-C cultures of "main" and "side" lines from 0 and 1 passage, contained similar numbers of cells with senescent phenotype, while their numbers in "side line" from passage 2 was significantly higher. The study showed, that under physiological oxygen concentrations (3%), the number of MSC-WJ in cultures, obtained from SDC was higher comparing to the standard CO₂ incubator conditions. It should be noted, that the effect of argon-based gas mixture was slightly more pronounced. For example, at passage 4, the numbers of cells in "side" cultures from SDC collected at passages 0 and 1, was $338,3 \times 10^3 \pm 3,3 \times 10^3$ in argon-based mixture, $324,7 \times 10^3 \pm 8,0 \times 10^3$ in nitrogen-based gas mixture and $239,9 \times 10^3 \pm 16,7 \times 10^3$ in standard CO₂-incubator conditions.

The analysis of WJ-MS-C morphology revealed, that the degree of heterogeneity in nuclear-cytoplasmic ratio and "width\length ratio" in cultures, changed during cultivation period. For all groups, the highest level of homogeneity was observed at passage 2. Comparing the effects of gas mixtures, the highest level of homogeneity was observed in nitrogen-based gas mixtures. We also showed the heterogeneity in the activity of senescence-associated - β -galactosidase at passage 3 in all conditions. The lowest level of SA- β -gal activity was detected in nitrogen-based gas mixture, containing 3% oxygen ($5,02 \pm 1,58\%$). For the WJ-MS-C, cultivated in argon-based mixture, and CO₂-incubator conditions the levels were $7,95 \pm 1,73\%$ and $11,43 \pm 4,18\%$ respectively. We also showed that the number of SA- β -gal was on average, greater, than the number of cells with flattened shape. For the first time it was found that positive effects in hypoxic gas mixtures differed: the most pronounced effect was observed in nitrogen-based gas mixture.

In this study, the novel optimization for methods of non-viral WJ-MS-C transfection was developed, by conducting all the stages of transfection procedure under physiological oxygen tensions. The transfection with nano-sized polyplexes containing plasmid DNA with marker gene (enhanced green fluorescent protein - eGFP), in gas mixtures with 3% oxygen, showed, that the percent of eGFP-positive cells was significantly higher under mild hypoxia, than in control group, maintained in standard CO₂-incubator conditions. The difference between the effects of nitrogen-based and argon-based gas mixtures was detected. In general, the number of eGFP-positive cells was 2,58-time higher in nitrogen-based mixture, and 1,37 in argon-based mixture, comparing to CO₂-incubator conditions.

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