

ІНСТИТУТ ГЕНЕТИЧНОЇ ТА РЕГЕНЕРАТИВНОЇ МЕДИЦИНИ
ДЕРЖАВНА УСТАНОВА "НАЦІОНАЛЬНИЙ НАУКОВИЙ ЦЕНТР
"ІНСТИТУТ КАРДІОЛОГІЇ, КЛІНІЧНОЇ ТА РЕГЕНЕРАТИВНОЇ МЕДИЦИНИ
ІМЕНІ АКАДЕМІКА М. Д. СТРАЖЕСКА
НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ МЕДИЧНИХ НАУК УКРАЇНИ"

БУКОВИНСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ

Кваліфікаційна наукова праця
на правах рукопису

Кирик Віталій Михайлович

УДК616-092Л8:612.683

ДИСЕРТАЦІЯ

**Патогенетичні механізми реалізації регенеративного потенціалу соматичних
стовбурових клітин з урахуванням критеріїв їх якості та ефективності**

14.03.04 "Патологічна фізіологія" (222 - Медицина)

22 - Охорона здоров'я

Подається на здобуття наукового ступеня доктора медичних наук

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

 Віталій КИРИК

Київ – 2023

АНОТАЦІЯ

Кирик В. М. Патогенетичні механізми реалізації регенеративного потенціалу соматичних стовбурових клітин з урахуванням критеріїв їх якості та ефективності. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора медичних наук за спеціальністю 14.03.04 "Патологічна фізіологія" (222 – Медицина, 22 – Охорона здоров'я). – Інститут генетичної та регенеративної медицини ДУ "Національний науковий центр "Інститут кардіології, клінічної та регенеративної медицини імені академіка М. Д. Стражеска Національної академії медичних наук України", Київ. – Буковинський державний медичний університет, Чернівці, 2024.

Доклінічна оцінка та подальше клінічне застосування соматичних стовбурових клітин різних типів потребує валідації їх відповідності певним стандартам, що залежать як від багатьох факторів з боку донора, так і від особливостей клітинних препаратів та умов їх трансплантації.

Результатом дисертаційної роботи є вирішення важливої наукової та прикладної проблеми – встановлення патогенетичних механізмів реалізації регенеративного потенціалу соматичних стовбурових клітин різного походження з врахуванням їхніх критеріїв якості та ефективності застосування. Ключовими механізмами реалізації регенеративного потенціалу стовбурових клітин належної якості є їх міграція у вогнище пошкодження, диференціювання для заміщення втрачених структурних елементів; імуномодулюючі ефекти, спрямовані на пригнічення локального запалення; проангіогенний вплив для неоваскуляризації та відновлення перфузії в зоні ішемії; запобігання апоптозу; пригнічення фіброзоутворення. На підставі цього визначено концепцію оцінки критеріїв якості соматичних стовбурових клітин, яка дозволить підвищити безпеку та ефективність клітинної терапії при пошкодженнях різних типів тканин та органів.

У дисертаційній роботі наведено результати зі встановлення критеріїв якості та оцінки доклінічної ефективності соматичних стовбурових клітин на моделях пошкодження тканин у лабораторних тварин, для чого були розроблені технології виділення, дво- та тривимірного культивування мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин (ММСК) з кісткового мозку, жирової тканини, плаценти, тканиноспецифічних ендотеліальних та кардіальних прогеніторів мишей, а також ММСК з плаценти та прогеніторів з міокарда людини. Первинні культури соматичних стовбурових клітин досліджували *in vitro* за морфологічними характеристиками, проліферативною активністю, здатністю до колонієутворення, потенціалом до спрямованого диференціювання; проводили мультипараметричне імунофенотипування клітин методами проточної цитометрії та імуноцитохімії, а також тривимірне культивування в культурі мікрмаси та гідрогелі на основі карбомеру 974Р. Для доклінічної оцінки регенеративного потенціалу соматичних стовбурових клітин *in vivo* за допомогою гістологічних (морфометрія), імунологічних (імуногістохімія), інструментальних (електрокардіографія, лазерна доплерівська флоуметрія) та функціональних (толерантність до фізичного навантаження) методів валідовано експериментальні моделі та встановлено терапевтичні ефекти клітинної терапії при пошкодженні кісткової тканини, критичній ішемії кінцівок, кардіоміопатії в мишей. Для моделювання умов пошкодження ніші стовбурових клітин жирової тканини вперше використана модель оваріоектомії. У ході пілотного клінічного дослідження пацієнтам з ішемічною кардіоміопатією та серцевою недостатністю III-IV функціонального класу під час хірургічної реваскуляризації проводили інтраміокардіальну трансплантацію ММСК плаценти людини з оцінкою фракції викиду та регіонарної скоротливості міокарда методом speckle-tracking-ехокардіографії, а також якості життя за опитувальниками.

За допомогою розроблених протоколів мультипараметричної лазерної проточної цитометрії та поетапного спрямованого диференціювання визначено комплексні імунофенотипічні та морфофункціональні критерії якості та відповідності досліджуваних культур соматичних стовбурових клітин, залежно від їхнього типу та походження.

Встановлено, що культури ММСК жирової тканини мають більший проліферативний потенціал та питому швидкість приросту популяції в порівнянні з культурами кісткового мозку, що обґрунтовує ефективність їх подальшого застосування. При цьому оваріоектомія в мишей у молодому віці, як модель дисфункції ніші стовбурових клітин жирової тканини, порушує їхні властивості, збільшуючи час подвоєння популяції, знижуючи потенціал до колонієутворення та остеогенного диференціювання, а також посилюючи адипогенез в культурі *in vitro*.

Продемонстровано, що трансплантати мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин жирової тканини, спрямовано диференційованих в остеогенному напрямі в тривимірних культурах мікрмаси, забезпечують регенерацію пошкодженої кісткової тканини завдяки заміщенню втрачених структур кістки та мають кращі морфологічні показники її відновлення, в порівнянні із трансплантатами мікрмаси без попереднього диференціювання.

На моделі критичної ішемії кінцівки в мишей показано, що трансплантати гідрогелів з карбомеру 974Р, заселені мультипотентними мезенхімальними стромальними клітинами жирової тканини, здатні до васкуляризації в організмі реципієнта, забезпечують виживання клітин, а також покращують перфузію та морфофункціональний стан пошкодженої м'язової тканини.

На моделі критичної ішемії кінцівок у мишей за допомогою морфологічних та інструментальних методів дослідження підтверджено регенеративний потенціал ендотеліальних клітин-попередників з аорти мишей, що проявлявся у відновленні перфузії ішемізованих кінцівок та покращенні гістологічних показників м'язової тканини. При цьому встановлено, що використання матриксу Matrigel та фібронектину, як субстратів росту, сприяє проліферації прогеніторів з аорти та експресії ними ендотеліальних маркерів для подальшої реалізації терапевтичних ефектів.

Встановлено, що зі збільшенням віку донора тканини міокарда зменшується проліферативна та скоротлива активність культур прогеніторних клітин серця *in vitro*, що впливає на прогнозування їхньої подальшої ефективності. При цьому

прогенітори, отримані з вушка передсердя, мають кращий проліферативний потенціал та відрізняються за морфологічними та імунофенотипічними характеристиками від клітин зі стінок шлуночків. Визначено, що для формування кардіосфер належної якості зі скоротливою активністю *in vitro*, які експресують тропонін I, VEGFR-2 і CD31, необхідною умовою є наявність кардіотрофіну, як ростового фактора, та послідовна зміна полі-Д-лізину і фібронектину, як субстратів росту.

На моделі ішемічної кардіоміопатії в мишей продемонстровано, що трансплантовані ММСК плаценти здатні заселяти міокард та реалізовувати регенеративні ефекти на тканину міокарда та функціональні показники серця. При трансляції результатів експериментальних досліджень у клініку вперше у світі підтверджено безпеку та ефективність інтраміокардіальної трансплантації стовбурових клітин плаценти людини в комплексному лікуванні пацієнтів з ішемічною кардіоміопатією, що проявлялось відновленням скоротливої функції серця швидким та істотним зменшенням симптомів серцевої недостатності та покращенням якості життя пацієнтів.

Наукова новизна роботи полягає в з'ясуванні нових аспектів патогенетичних механізмів реалізації регенеративного потенціалу соматичних стовбурових клітин, які відповідають комплексним критеріям якості та доклінічної ефективності, з врахуванням типу клітин, їх походження та віку донора. Практичне значення одержаних результатів полягає в тому, що впровадження новітніх високотехнологічних підходів клітинної терапії з доведеною безпекою та ефективністю дозволить покращити якість комплексного лікування пацієнтів з багатьма важкими захворюваннями. Це матиме суттєве соціальне та економічне значення завдяки підвищенню ефективності надання медичної допомоги, а також зниженню показників інвалідизації та смертності працездатного населення, що є важливим аспектом підтримання національної безпеки держави.

Ключові слова: соматичні стовбурові клітини, регенерація, культура клітин, спрямоване диференціювання, трансплантація клітин, критерії якості клітинних препаратів

ANNOTATION

Kyryk V. M. Pathogenetic mechanisms of realizing the regenerative potential of somatic stem cells, taking into account the criteria of their quality and efficiency – Qualifying scientific work as a manuscript.

Dissertation for the academic degree of Doctor of medical sciences, specialty 14.03.04 "Pathological physiology" (222 - Medicine). – Institute of Genetic and Regenerative Medicine of the State Institution "National Scientific Center "Institute of Cardiology, Clinical and Regenerative Medicine named after acad. M. D. Strazhesko of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine".

The defense will take place in a specialized academic council 76.600.02 at the Bukovinian State Medical University, the Ministry of Health of Ukraine, Chernivtsi, 2024.

Preclinical evaluation and subsequent clinical application of various types of somatic stem cells require validation of their compliance with specific standards. These standards depend on various factors, including the donor source and the peculiarities of the cell products and the conditions of their transplantation.

The outcome of the dissertation work is the resolution of a crucial scientific and practical issue: comprehending the pathogenetic mechanisms underpinning the realization of regenerative potential of somatic stem cells derived from diverse origins, considering their criteria for their quality and efficiency of application. The fundamental mechanisms underlying the realization of regenerative potential of stem cells of proper quality include their targeted migration to the site of injury, differentiation to substitute lost structural components, immunomodulatory effects aimed at dampening local inflammation, proangiogenic effects for neovascularization and restoration of perfusion in ischemic zones, prevention of apoptosis, and suppression of fibrosis. Based on these findings, a comprehensive framework has been devised to augment the safety and efficacy of cell therapy in the context of various tissue and organ injuries.

The dissertation presents the results of establishing quality criteria and evaluating the preclinical effectiveness of somatic stem cells in laboratory animal models of tissue injury. To accomplish this, technologies for isolating, cultivating, directing differentiation, and multiparametric immunophenotyping of multipotent mesenchymal stromal cells (MMSCs) from adipose tissue, placenta, tissue-specific endothelial cells, and cardiac progenitor cells were developed. The primary cultures of somatic stem cells underwent comprehensive *in vitro* studies, focusing on morphological characteristics, proliferative activity, colony-forming ability, and potential for directed differentiation. Furthermore, multiparametric immunophenotyping of the cells was conducted using flow cytometry and immunocytochemistry. Three-dimensional cultivation was carried out using micromass culture and a hydrogel based on carbomer 974P. To preclinically assess the regenerative potential of somatic stem cells *in vivo*, modern methods were employed, including histological (morphometry), immunological (immunohistochemistry), instrumental (electrocardiography, laser Doppler flowmetry), and functional (tolerance to exercise) approaches. Experimental models were validated for bone tissue injury, critical limb ischemia, and cardiomyopathy in mice. Additionally, an ovariectomy model was used to simulate adipose tissue stem cell niche dysfunction. In a pilot clinical study, patients with ischemic cardiomyopathy and heart failure of the III-IV functional class underwent intramyocardial transplantation of human placental MMSCs during surgical revascularization. The evaluation of therapeutic effects included assessing the ejection fraction and regional myocardial contractility using speckle-tracking-echocardiography, along with analyzing the patients' quality of life using questionnaires.

Using developed protocols of multiparametric laser flow cytometry and stepwise directional differentiation, comprehensive immunophenotypic and morphofunctional criteria were determined to assess the quality and suitability of the studied cultures of somatic stem cells, depending on their type and origin. It was observed that adipose-derived MMSC cultures demonstrate a higher proliferative potential and population growth rate in comparison to bone marrow stromal cells, which supports their effectiveness for further application.

However, when modelling the dysfunction of the stem cell niche in adipose tissue of young mice, an increase in the population doubling time and a decrease in the potential for colony formation were observed, along with an enhancement of adipogenesis in MMSC cultures *in vitro*. Transplants of adipose-derived MMSCs, differentiated in the osteogenic direction in three-dimensional micromass cultures, provide regeneration of damaged bone tissue due to the replacement of lost bone structures and have better morphological indicators of its restoration, compared to micromass transplants without prior differentiation.

In a mouse model of critical limb ischemia, hydrogel grafts based on carbomer and agarose, engrafted with adipose-derived MMSCs, have shown the ability to vascularize within the recipient's body. These grafts promote the survival of transplanted cells and significantly improve perfusion and the morpho-functional state of damaged muscle tissue.

The regenerative potential of endothelial progenitor cells from the murine aorta was confirmed in a model of critical limb ischemia using morphological and instrumental research methods. This regenerative potential was demonstrated by the restoration of perfusion in ischemic limbs and the improvement of histological indicators of muscle tissue. Moreover, it was observed that the use of Matrigel matrix and fibronectin as growth substrates promotes the proliferation of aortic progenitor cells and enhances their expression of endothelial markers for further implementation of therapeutic effects.

It has been established that the proliferative potential and contractile activity *in vitro* of cardiac-derived progenitor cells decrease with an increasing age of the myocardial tissue donor, which affects the prediction of their further effectiveness. However, tissue-specific myocardial stem cells obtained from the atrial appendage exhibit a better proliferative potential and display distinct morphological and immunophenotypic characteristics compared to cell cultures isolated from the ventricular tissue. Furthermore, it was determined that the formation of cardiospheres of appropriate quality with contractile activity *in vitro*, expressing troponin I, VEGFR-2, and CD31, requires the presence of cardiotrophin as a growth factor and a sequential change of poly-D-lysine and fibronectin as growth substrates.

In the model of ischemic cardiomyopathy in mice, it was demonstrated that transplanted human placenta-derived MMSCs successfully engrafted the myocardium and exerted regenerative effects on the myocardial tissue and functional indicators of the heart. When experimental studies were translated into a pilot clinical trial, the safety and efficacy of intramyocardial transplantation of human placental stem cells during surgical revascularization in patients with ischemic cardiomyopathy was confirmed. This innovative approach resulted in the restoration of the heart's contractile function, a rapid and significant reduction in heart failure symptoms, and an overall improvement in the patients' quality of life.

The scientific novelty of this work lies in uncovering new aspects of the pathogenetic mechanisms behind the realization of the regenerative potential of somatic stem cells, meeting complex criteria of quality and preclinical efficiency, considering the cell type, origin, and donor age. The practical significance of the findings is the introduction of advanced cell therapy methods, proven to be safe and effective, which will enhance the quality of comprehensive treatment for patients with various serious diseases, contributing to the advancement of both basic science and clinical medicine. This will hold considerable social and economic importance by improving the efficiency of medical care provision and reducing disability and mortality rates among the working population, thereby playing a crucial role in maintaining national security.

Key words: somatic stem cells, regeneration, cell culture, directed cell differentiation, cell transplantation, quality criteria of cell product

Список публікацій за темою дисертації

в яких опубліковані основні наукові результати дисертації:

1. Кирик ВМ, Бутенко ГМ. Стволовые клетки из жировой ткани: основные характеристики и перспективы клинического применения в регенеративной медицине. Журн АМН України. 2010; 16(4):576-604. *Фахове видання.*
2. Кучук ОВ, Цупиков ОМ, Кирик ВМ. Культивирование и направленная остеогенная дифференцировка мультипотентных стромальных клеток костного мозга в культуре микромассы. Проблемы остеології. 2010; 13(4):36-41. *Фахове видання.*
3. Бутенко ГМ, Кирик ВМ. Регенеративная медицина и стволовые клетки – проблемы и решения. Журн АМН України. 2011; 17(1):62-66. *Фахове видання.*
4. Shablil V, Kuchma M, Kyryk V, Onishchenko G, Tsypukov O, Klymenko P, Kuchuk O, Gabrielyan A, Domanskiy T, Onischenko V, Lukash L, Lobyntseva G. Mesenchymal stromal cells from native and cryopreserved human placenta: phenotype, multipotency and in vivo migration potential. Problems of Cryobiology and Cryomedicine. 2012; 22(2):157-160. *Фахове видання.*
5. Шаблій ВА, Кучма МД, Кирик ВМ, Онищенко ГМ, Цупиков ОМ, Клименко ПП, Арешков ПО, Кучук ОВ, Лукаш ЛЛ, Лобинцева ГС. Фенотип і міграційний потенціал мультипотентних мезенхімних стромальних клітин з нативної та кріоконсервованої плаценти людини. Biotechnologia Acta. 2012; 5(5):34-44. *Фахове видання.*
6. Шаблій ВА, Кучма МД, Кирик ВМ, Онищенко ГМ, Цупиков ОМ, Клименко ПП, Арешков ПО, Кучук ОВ, Салютін РВ, Лукаш ЛЛ, Лобинцева ГС. Вплив мезенхімальних стромальних клітин з нативної та кріоконсервованої плаценти людини на деякі морфо-функціональні особливості міокарда у мишей з кардіоміопатією. Вісник невідкладної і відновної медицини. 2012; 13(1):133-138. *Фахове видання.*
7. Kuchuk OV, Kyryk VM. Stepwise differentiation of multipotent cells from murine adipose tissue in osteogenic direction. Problems of Cryobiology and Cryomedicine. 2012; 22(2):161-164. *Фахове видання.*
8. Поляченко ЮВ, Запольська КМ, Салютін РВ, Кучук ОВ, Кирик ВМ, Клименко ПП, Онищенко ГМ, Шаблій ВА. Перспективи застосування алогенних мультипотентних мезенхімальних стовбурових клітин для захисту жирових трансплантатів від резорбції. Клінічна хірургія. 2013; 2:60-63. *Фахове видання, індексація в Scopus.*

9. Kyryk VM. Phenotyping and sorting of murine bone marrow haematopoietic stem cells using flow cytometry. *Biotechnologia Acta*. 2014; 7(6):51-56. DOI: <http://dx.doi.org/10.15407/biotech7.06.051> *Фахове видання*.
10. Shablii VA, Kuchma MD, Kyryk VM, Svitina HM, Shablii YuM, Lukash LL, Lobintseva GS. Mesenchymal and trophoblast immunophenotype of multipotent stromal cells from human placenta. *Biopolymers and Cell*. 2014; 30(2):118-121. DOI: <http://dx.doi.org/10.7124/bc.000889> *Фахове видання, індексація в Scopus*.
11. Квитницькая-Рьжова ТЮ, Клименко ПП, Хаблак ГВ, Парамонова ГИ, Кирик ВМ. Структурные изменения миокарда при моделировании кардиомиопатии и ее коррекции с помощью стволовых клеток у животных разного возраста. *Світ медицини та біології*. 2014; 4(47):130-134. *Фахове видання*.
12. Kuchma MD, Kyryk VM, Svitina HM, Shablii YuM, Lukash LL, Lobintseva GS, Shablii VA. Comparative analysis of the hematopoietic progenitor cells from placenta, cord blood, and fetal liver, based on their immunophenotype. *BioMed Res Int*, 2015; 2015:418752. DOI: <https://doi.org/10.1155/2015/418752> *Індексація в Scopus та WoS, квартал Q2*.
13. Tsupykov O, Kyryk V, Ustymenko A, Yatsenko K, Butenko G, Skibo G. Effect of transplantation of adipose-derived multipotent mesenchymal stromal cells on the nervous tissue and behavioral responses in a mouse model of periventricular leukomalacia. *Cell Organ Transpl*. 2015; 3(1):68-73. DOI: <https://doi.org/10.22494/COT.v3i1.22> *Фахове видання*.
14. Tsupykov O, Ustymenko A, Kyryk V, Smozhanik E, Yatsenko K, Butenko G, Skibo G. Ultrastructural study of mouse adipose-derived stromal cells induced towards osteogenic direction. *Microsc Res Tech*. 2016; 79(6), 557-564. DOI: <https://doi.org/10.1002/jemt.22670> *Індексація в Scopus та WoS, квартал Q1*.
15. Svitina H, Kyryk V, Skrypkina I, Kuchma M, Bukreieva T, Areshkov P, Shablii Yu, Klymenko P, Garmanchuk L, Ostapchenko L, Lobintseva G, Shablii V. Placenta-derived multipotent cells have no effect on the size and number of DMH-induced colon tumors in rats. *Experimental and Therapeutic Medicine*. 2017; 14(3):2135-2147. DOI: <https://doi.org/10.3892/etm.2017.4792> *Індексація в Scopus та WoS, квартал Q3*.
16. Tsupykov O, Lushnikova I, Ustymenko A, Kyryk V, Nikandrova Y, Patseva M, Yatsenko K, Butenko G, Skibo G. Protective effects of adipose-derived multipotent mesenchymal stromal cells of

mice on periventricular leukomalacia model in vitro. *Cell Organ Transpl.* 2017; 5(1):28-32. DOI: <https://doi.org/10.22494/cot.v5i1.66> *Фахове видання.*

17. Kyryk V, Kuchuk O, Mamchur A, Ustymenko A, Lutsenko T, Tsuprykov O, Yatsenko K, Skibo G, Bilko D, Bilko N. 3D culture of murine adipose-derived multipotent mesenchymal stromal cells in hydrogel based on carbomer 974P. *Cell Organ Transpl.* 2018; 6(2):195-201. DOI: <https://doi.org/10.22494/cot.v6i2.91> *Фахове видання.*
18. Ustymenko A, Kyryk V, Lutsenko T, Tsuprykov O, Butenko G. Morphofunctional properties of adipose-derived multipotent mesenchymal stromal cells in vitro in ovariectomized mice of different ages. *Cell Organ Transpl.* 2019; 7(2):158-167. DOI: <https://doi.org/10.22494/cot.v7i2.102> *Фахове видання, кат. А, індексація в Scopus.*
19. Lykhumus O, Koval L, Voytenko L, Uspenska K, Komisarenko S, Deryabina O, Shuvalova N, Kordium V, Ustymenko A, Kyryk V, Skok M. Intravenously injected mesenchymal stem cells penetrate the brain and treat inflammation-induced brain damage and memory impairment in mice. *Front Pharmacol.* 2019;10:355. DOI: <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.00355> *Індексація в Scopus та WoS, квартиль Q1.*
20. Shablii V, Kuchma M, Svitina H, Skrypkina I, Areshkov P, Kyryk V, Bukreeva T, Nikulina V, Shablii Iu, Lobyntseva G. High proliferative placenta-derived multipotent cells express cytokeratin 7 at low level. *BioMed Res Int.* 2019; 2019:2098749. DOI: <https://doi.org/10.1155/2019/2098749> *Індексація в Scopus та WoS, квартиль Q2.*
21. Golovynska I, Kalmukova O, Svitina H, Kyryk V, Shablii V, Senchylo N, Ostrovska G, Dzerzhynskiy M, Stepanov Yu, Golovynskiy S, Ohulchanskyy T, Liwei Liu, Garmanchuk L, Junle Qu. Morpho-functional characteristics of bone marrow multipotent mesenchymal stromal cells after activation or inhibition of epidermal growth factor and toll-like receptors or treatment with DNA intercalator cisplatin. *Cytometry Part A.* 2019; 95A:24-33. DOI: <https://doi.org/10.1002/cyto.a.23593> *Індексація в Scopus та WoS, квартиль Q2.*
22. Lykhumus O, Kalashnyk O, Koval L, Voytenko L, Uspenska K, Komisarenko S, Deryabina O, Shuvalova N, Kordium V, Ustymenko A, Kyryk V, Skok M. Mesenchymal stem cells or Interleukin-6 improve episodic memory of mice lacking $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptors. *Neuroscience.* 2019; 413:31-44. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2019.06.004> *Індексація в Scopus та WoS, квартиль Q2.*

23. Ivanischev V, Ustymenko A, Kyryk V, Butenko G. Comparative morphometric study of adipose tissue in ovariectomized mice of different ages. *Cell Organ Transpl.* 2020; 8(1):64-69. DOI: <https://doi.org/10.22494/cot.v8i1.108> *Фахове видання кат. А, індексація в Scopus, квартал Q3.*
24. Yatsenko K, Lushnikova I, Ustymenko A, Patseva M, Govbakh I, Kyryk V, Tsupukov O. Adipose-derived stem cells reduce lipopolysaccharide-induced myelin degradation and neuroinflammatory responses of glial cells in mice. *J Pers Med.* 2020; 10(3): 66. DOI: <https://doi.org/10.3390/jpm10030066> *Індексація в Scopus та WoS, квартал Q1.*
25. Rubtsov V, Govbakh I, Ustymenko A, Kyryk V, Tsupukov O. The effects of adipose-derived multipotent mesenchymal stromal cells transplantation on locomotor activity and function of the sciatic nerve in mice with peripheral neuropathy. *Cell Organ Transpl.* 2020; 8(2): 159-165. DOI: <https://doi.org/10.22494/cot.v8i2.111> *Фахове видання кат. А, індексація в Scopus, квартал Q3.*
26. Kyryk V, Ustymenko A. Isolation and phenotyping of cardiac-derived progenitor cells from neonatal mice. *Cell Organ Transpl.* 2021; 9(2):126-133. DOI: <https://doi.org/10.22494/cot.v9i2.125> *Фахове видання кат. А, індексація в Scopus.*
27. Govbakh I, Kyryk V, Ustymenko A, Rubtsov V, Tsupukov O, Bulgakova N, Zavodovskiy D, Sokolowska I, Maznychenko A. Stem cell therapy enhances motor activity of triceps surae muscle in mice with hereditary peripheral neuropathy. *Int J Mol Sci.* 2021; 22(21):12026. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms222112026> *Індексація в Scopus та WoS, квартал Q1.*
28. Kyryk V, Kuchuk O, Klymenko P. Regenerative effects of mouse adipose-derived multipotent stromal cells in a micromass graft for the treatment of bone injury model. *Anti-Aging Eastern Europe.* 2022; 1(1):75-86. DOI: <https://doi.org/10.56543/aaeeu.2022.1.1.11>
29. Ustymenko A, Kyryk V, Butenko G. Morphofunctional characteristics of adipose-derived multipotent mesenchymal stromal cells from CBA/Ca mice of different ages in cell culture in vitro. *Cell Organ Transpl.* 2022; 10(1):46-51. DOI: <https://doi.org/10.22494/cot.v10i1.137> *Фахове видання кат. А, індексація в Scopus, квартал Q4*
30. Kyryk V, Ustymenko A, Lutsenko T, Klymenko P, Tsupukov O. Regenerative effects of mouse aortic endothelial cells in a murine model of critical limb ischemia. *Cell Organ Transpl.* 2022; 10(2):90-96. DOI: <https://doi.org/10.22494/cot.v10i2.143> *Фахове видання кат. А, індексація в Scopus, квартал Q4.*
31. Kyryk V, Tsupukov O, Ustymenko A, Govbakh I, Smozhanik E, Butenko G, Skibo G. Age-related

ultrastructural changes in spheroids of the adipose-derived multipotent mesenchymal stromal cells from ovariectomized mice. *Front Cell Neurosci.* 2023; 17. DOI: <https://doi.org/10.3389/fncel.2023.1072750> Індексція в *Scopus та WoS*, *квартиль Q1*.

які засвідчують апробацію матеріалів дисертації:

32. Кучук ОВ, Цупиков ОМ, Кирик ВМ. Культура мікромаси мультипотентних стромальних клітин кісткового мозку та можливості її застосування для регенерації кісткової тканини. Тези доп. наук. конф. мол. вчених з міжнар. уч. "Актуальні питання геронтології та геріатрії", Київ. 2011:25-26.
33. Сушко ОМ, Кирик ВМ. Юридичні аспекти застосування стовбурових клітин в Україні. Тези доп. наук. конф. мол. вчених з міжнар. уч. "Актуальні питання геронтології та геріатрії", Київ. 2011:54-55.
34. Kuchuk O, Kyryk V. Osteogenic induction of multipotent stromal cells of mice adipose tissue. 4th International IMBG Conference for young scientists "Molecular biology: advances and perspectives", Kyiv. 2011:166.
35. Kuchma M, Shablii V, Kyryk V, Onishchenko A, Lobitseva G. Cryopreserved human placental tissue as source of hematopoietic and mesenchymal stem cells. World Cord Blood Congress III "Cord blood transplantation and immunobiology of haematopoietic stem cell transplant", Rome (IT). 2011:171.
36. Kuchuk O, Tsypukov O, Kyryk V. Cultivation and osteogenic differentiation of murine bone marrow multipotent stromal cells in micromass culture. Abstracts of the World Conference on Regenerative Medicine, Leipzig (DE). 2011. *Regenerative Medicine.* 2011; 6(6, Suppl. 2):274-276. DOI: <https://doi.org/10.2217/rme.12.16>
37. Shablii V, Kuchma M, Kyryk V, Onishchenko A, Lukash L, Lobintseva G. Characteristics of hematopoietic and mesenchymal stem cells isolated from cryopreserved human placental tissue. ISSCR 10th Annual Meeting, Poster Session Abstracts. Vol. 2. Yokohama (JP). 2012:95.
38. Безруков ВВ, Бутенко ГМ, Парамонова ГИ, Ськало НВ, Холин ВА, Олар ВВ, Лабунец ИФ, Кирик ВМ, Родниченко АЕ, Клименко ПП, Балла ИА. Влияние трансплантации стволовых клеток костного мозга на миокардиопатию, вызванную введением изопротеренола. Тези наук.-практ. конф. з міжнар. уч. "Актуальні проблеми регенеративної медицини", Київ. 2012. *Журн. НАМН України.* 2012; т. 18, додаток:17-18. *Фахове видання.*

39. Кирик В. Эндотелиальные прогениторные клетки и преэклампсия. Збірник тез наук.-практ. конф. з міжнар. уч. "Клітинні технології в акушерстві, гінекології, неонатології та дитячій неврології", Київ. 2013:13.
40. Shablii V, Kuchma M, Kyryk V, Svitina H, Shablii Yu, Skrypkina I, Lukash L, Lobitseva G. Multipotent trophoblast cells derived from native and cryopreserved human placental tissue. 3rd IPLASS Meeting, Granada (ES). 2014:7.
41. Кирик В, Кучук О, Клименко П. Регенераторний потенціал ММСК жирової клітковини при пошкодженні кісткової тканини у мишей. Матеріали III міжнар. мед. конгресу "Впровадження сучасних досягнень медичної науки в практику охорони здоров'я України", Київ. 2014:16.
42. Kyryk V, Kuchuk O, Poberezhny P, Mamchur A, Klymenko P, Rybachuk O, Perale G. In vivo survival of murine adipose-derived stem cells in hydrogel composed of carbomer 974P. Збірник тез науково-практичної конференції з міжнародною участю "Трансплантація – сьогодні, минуле та майбутнє", Київ. 2014:39.
43. Shablii V, Svitina H, Kuchma M, Kyryk V, I Skrypkina, Areshkov P. Placental derived multipotent cells possess trophoblast specific features. Poster abstract book ISSCR 13th Annual Meeting, Stockholm (SE). 2015:413.
44. Кирик ВМ, Устименко АМ, Клименко ПП, Кучук ОВ. Регенеративний потенціал 3D-культури мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин жирової клітковини на моделі критичної ішемії нижніх кінцівок. Матеріали конференції "Ендотеліальна дисфункція при вік-залежній патології – діагностика, профілактика, лікування", Київ. 2015. Кровообіг та гемостаз. 2015; 1-2:94-95. *Фахове видання.*
45. Kyryk VM. Advances in stem cells therapy for cardiovascular diseases. Conference Abstracts "Regenerative technologies in modern medicine", Odesa. 2017. Cell Organ Transpl. 2017; 5(1):133. DOI: <https://doi.org/10.22494/cot.v5i1.73> *Фахове видання.*
46. Кирик ВМ, Устименко АМ, Шаблій ВА, Немтінов ПІ, Руденко СА, Бутенко ГМ, Руденко АВ. Перспективи клітинної терапії серцево-судинних захворювань. Тези доп. наук.-практ. конф. "Інноваційні напрями в генетичній та регенеративній медицині", Київ. 2017. Cell Organ Transpl. 2017; 5(2):257. DOI: <https://doi.org/10.22494/cot.v5i2.79> *Фахове видання.*

47. Nikulina V, Kuchma M, Bukreieva T, Zahanich I, Kyryk V, Lobintseva G, et al. Cryopreservation of placenta tissue allows isolating viable mesenchymal and hematopoietic stem cells. Abstracts of ISCT 2019 Annual Meeting, Melbourne (AU). 2019. Cytotherapy. 2019; 21(5), S78–S79. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2019.03.485> *Індексація в Scopus та WoS, квартиль Q1.*

які додатково відображають наукові результати дисертації:

48. Кучук ОВ, Кирик ВМ. Поэтапная дифференцировка в остеогенном направлении мультипотентных клеток жировой ткани мышей. Матеріали доп. міні-симпозіума "День стовбурової клітини", Харків. 2012:23-28

49. Zusso M, Moro S, Giusti P, Stokes L, eds. Neuroinflammation and its resolution: From molecular mechanisms to therapeutic perspectives. Lausanne: Frontiers Media SA; 2020. 280 p. DOI: <https://doi.org/10.3389/978-2-88963-854-3>

50. Габріелян АВ, Голюк ЄЛ, Домбровський ДБ, Кирик ВМ, Медведєв ВВ, Руденко СА, Шаблій ВА. Новітні методи застосування стовбурових клітин і біоінженерних технологій у регенеративній медицині. Реф. роботи, удостоєної Національної премії України ім. Бориса Патона, Київ, 2021 р. http://www.kdpu-nt.gov.ua/sites/default/files/work_files/4_referat_2.pdf

51. Кирик ВМ, Кучук ОВ, Тимченко АМ. Спосіб моделювання пошкодження кісткової тканини у мишей: пат. 60512 Україна. №u2010 13357; заявл. 10.11.2010; опубл. 25.06.2011, бюл. № 12.

52. Кирик ВМ, Клименко ПП, Кучук ОВ, Романець ТР, Шаблій ВА. Спосіб моделювання пошкодження міокарда у мишей: пат. 66164 Україна. №u2011 07021; заявл. 03.06.2011; опубл. 26.12.2011, бюл. № 24.

53. Кирик ВМ, Клименко ПП, Устименко АМ, Луценко ТМ. Спосіб відновлення пошкодженої кісткової тканини у лабораторних тварин: пат. 104927 Україна. №u2015 08531; заявл. 02.09.2015; опубл. 25.02.2016, бюл. № 4.

54. Кирик ВМ, Устименко АМ, Луценко ТМ, Калмикова ОО. Спосіб отримання культури експлантів аорти лабораторних тварин: пат. 127428 Україна. №u2018 03317; заявл. 29.03.2018; опубл. 25.07.2018, бюл. № 14.

55. Кирик ВМ, Устименко АМ, Бутенко ГМ. Спосіб отримання резидентних стовбурових клітин міокарда свавців: пат. 149486 Україна. №u2021 02518; заявл. 13.05.2021; опубл. 24.11.2021, бюл. № 47.

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ	21
ВСТУП	23
РОЗДІЛ 1 ХАРАКТЕРИСТИКА ТА ОСОБЛИВОСТІ РЕАЛІЗАЦІЇ РЕГЕНЕРАТИВНОГО ПОТЕНЦІАЛУ СОМАТИЧНИХ СТОВБУРОВИХ КЛІТИН РІЗНОГО ПОХОДЖЕННЯ (ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ)	35
1.1 Загальна характеристика та класифікація стовбурових клітин	35
1.2 Мультипотентні мезенхімальні стромальні клітини з жирової тканини	43
1.3 Ендотеліальні прогеніторні клітини	55
1.4 Стовбурові клітини плаценти	61
1.5 Стовбурові клітини в регенерації міокарда	65
1.6 Особливості тривимірних культур соматичних стовбурових клітин	77
1.7 Вплив старіння на реалізацію регенеративного потенціалу соматичних стовбурових клітин	85
1.8 Підходи з розробки критеріїв якості соматичних стовбурових клітин	93
РОЗДІЛ 2 МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ	99
2.1 Загальна характеристика об'єктів дослідження	99
2.2 Виділення та культивування стовбурових клітин	102
2.2.1 Отримання культур ММСК із кісткового мозку мишей	102
2.2.2 Отримання культур ММСК із жирової тканини мишей	102
2.2.3 Отримання культур ММСК з плаценти мишей	103
2.2.4 Отримання культур ММСК з плаценти людини	104
2.2.5 Отримання культур ендотеліальних прогеніторних клітин мишей	105
2.2.6 Отримання культур клітин-попередників з тканини передсердь і шлуночків серця мишей	106
2.2.7 Отримання культур клітин-попередників з синоатріального вузла серця мишей	107
2.2.8 Отримання культур прогеніторних клітин з міокарда людини	108
2.2.9 Кріоконсервування та розморожування культур клітин	109
2.2.10 Отримання культур мікрмаси ММСК жирової тканини мишей	110

2.2.11 Отримання культур ММСК жирової тканини мишей у гідрогелі	111
2.3 Характеристика культур соматичних стовбурових клітин	112
2.3.1 Оцінка проліферативного потенціалу культур клітин <i>in vitro</i>	112
2.3.2 Визначення колонієутворюючої активності культур клітин	113
2.3.3 Спрямоване диференціювання моношарових культур ММСК	114
2.3.4 Спрямоване остеогенне диференціювання культури мікромаси ММСК жирової тканини мишей	116
2.3.5 Спрямоване остеогенне диференціювання культури ММСК жирової тканини мишей у карбомерних гідрогелях	116
2.3.6 Спрямоване диференціювання культур ендотеліальних прогеніторних клітин	117
2.3.7 Спрямоване диференціювання прогеніторних клітин з міокарда	117
2.3.8 Імунофенотипування клітин методом проточної цитометрії	118
2.3.9 Імуноцитохімічне дослідження клітин	121
2.3.10 Електронно-мікроскопічне дослідження ММСК	122
2.3.11 Гістологічне дослідження тривимірних культур клітин	122
2.4 Доклінічна оцінка регенеративних ефектів стовбурових клітин на моделях пошкодження тканин у мишей	123
2.4.1 Моделювання пошкодження кісткової тканини	123
2.4.2 Моделювання критичної ішемії кінцівок	124
2.4.3 Моделювання пошкодження міокарда	125
2.4.4 Моделювання дисфункції ніші ММСК жирової тканини мишей	126
2.4.5 Гістологічне дослідження тканин	126
2.4.6 Імуногістохімічне дослідження міокарда	127
2.4.7 Лазерна доплерівська флоуметрія	128
2.4.8 Електрокардіографія в мишей	129
2.4.9 Оцінка толерантності до фізичного навантаження	129
2.5 Пілотне клінічне дослідження безпеки та ефективності трансплантації ММСК плаценти людини у хворих з ішемічною кардіоміопатією	130

2.6 Статистичний аналіз даних	132
РОЗДІЛ 3 ХАРАКТЕРИСТИКА ТА РЕГЕНЕРАТИВНИЙ ПОТЕНЦІАЛ ММСК ЖИРОВОЇ ТКАНИНИ МИШЕЙ	133
3.1 Порівняльна характеристика моношарових культур ММСК кісткового мозку та жирової тканини мишей <i>in vitro</i>	133
3.2 Характеристики об'ємних культур мікромаси ММСК жирової тканини мишей	155
3.3 Регенеративний потенціал об'ємних культур мікромаси ММСК жирової тканини при пошкодженні кісткової тканини в мишей	161
3.4 Характеристики об'ємних культур ММСК жирової тканини в карбомерному гідрогелі	165
3.5 Регенеративний потенціал об'ємних культур ММСК жирової тканини в карбомерному гідрогелі при критичній ішемії кінцівок у мишей	169
3.6 Вікові особливості ММСК жирової тканини мишей в умовах моделювання дисфункції ніші	175
РОЗДІЛ 4 ХАРАКТЕРИСТИКА ТА РЕГЕНЕРАТИВНИЙ ПОТЕНЦІАЛ ЕНДОТЕЛІАЛЬНИХ ПРОГЕНІТОРІВ	196
4.1 Характеристика культур ендотеліальних прогеніторів <i>in vitro</i>	196
4.2 Регенеративний потенціал ендотеліальних прогеніторів при критичній ішемії кінцівок у мишей	207
РОЗДІЛ 5 ХАРАКТЕРИСТИКА СТОВБУРОВИХ КЛІТИН З МІОКАРДА	217
5.1 Гістологічне дослідження міокарда миші та людини.	217
5.2 Морфологічні характеристики первинних культур клітин- попередників з міокарда мишей	220
5.3 Морфологічні характеристики клітин-попередників з міокарда людини	225
5.4 Імунофенотип клітин-попередників з тканини міокарда	228
РОЗДІЛ 6 ХАРАКТЕРИСТИКИ ТА РЕГЕНЕРАТИВНИЙ ПОТЕНЦІАЛ ММСК ПЛАЦЕНТИ	239
6.1 Характеристика ММСК плаценти мишей	239

6.2 Характеристика ММСК плаценти людини	241
6.3 Доклінічна оцінка регенеративних ефектів ММСК плаценти на моделі ішемічного пошкодження міокарда в мишей	250
6.4 Клінічна оцінка безпеки та ефективності інтраміокардіальної трансплантації ММСК плаценти в лікуванні хворих з ішемічною кардіоміопатією	265
РОЗДІЛ 7 АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ ОТРИМАНИХ РЕЗУЛЬТАТІВ	271
7.1 Обговорення результатів дослідження ММСК з різних джерел	271
7.2 Обговорення результатів дослідження ММСК в умовах тривимірного культивування	280
7.3 Обговорення результатів дослідження ендотеліальних клітин-попередників	289
7.4 Обговорення результатів дослідження тканинспецифічних прогеніторних клітин з міокарда	293
7.5 Обговорення результатів дослідження впливу старіння на характеристики стовбурових клітин	296
7.6 Обговорення комплексної оцінки доклінічних критеріїв якості, безпеки та ефективності соматичних стовбурових клітин	305
7.7 Обговорення перспектив трансляції отриманих результатів у клініку	328
ВИСНОВКИ	333
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	336
ДОДАТКИ	
Додаток 1. Список опублікованих праць за темою дисертації	381
Додаток 2. Відомості про апробацію результатів дисертації	391
Додаток 3. Відомості про нововведення, технології та впровадження	393
Додаток 4. Перелік моноклональних антитіл, використаних для діагностичних панелей мультипараметричного імунофенотипування субпопуляцій соматичних стовбурових та прогеніторних клітин миші та людини	398

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

EKG	— електрокардіографія
MMCK	— мультипотентні мезенхімальні стромальні клітини
7-AAD	— 7-Aminoactinomycin D, 7-аміноактиноміцин D
APC	— allophycocyanin, алофікоціанін
ASCs	— adipose-derived stem cells, стовбурові клітини жирової тканини
ATMPs	— Advanced Therapy Medicinal Products, лікарські засоби прогресивної терапії
BCIP/NBT	— 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate/nitro blue tetrazolium, 5-бром-4-хлор-3-індолфосфат/нітросиній тетразолій
bFGF	— basic fibroblast growth factor, основний фактор росту фібробластів
BM-MNCs	— bone marrow-derived mononuclear cells, ядровмісні клітини кісткового мозку
CD	— cluster of differentiation, кластер диференціювання клітин
CFU	— colony-forming unit, колоніє-утворювальна одиниця
CSCs	— cardiac-derived stem cells, стовбурові клітини з міокарда
DMSO	— dimethyl sulfoxide, диметилсульфоксид
EDTA	— ethylenediaminetetraacetic acid, етилендіамінтетраоцтова кислота
EGF	— epidermal growth factor, епідермальний фактор росту
EPCs	— endothelial progenitor cells, клітини-попередники ендотелію
FBS	— fetal bovine serum, фетальна сироватка корів
FITC	— fluorescein isothiocyanate, флуоресцеїн ізотіоціанат
FSC	— forward scatter, пряме світлорозсіювання на точкових гістограмах
GFP	— green fluorescence protein, зелений флуоресцентний протеїн
IGF-I	— insulin-like growth factor I, інсуліноподібний фактор росту I

IL	– interleukin, інтерлейкін
MAEC	– mouse aortic endothelial cell, ендотеліальні клітини з аорти миші
PBS	– phosphate-buffered saline, фосфатно-сольовий буфер
PCR	– polymerase chain reaction, полімеразна ланцюгова реакція
PE	– phycoerythrin, фікоеритрин
PerCP	– peridinin-chlorophyll-protein, протеїн перидинін-хлорофіл
SSC	– side scatter, бокове світлорозсіювання на точкових гістограмах
SVF	– stromal-vascular fraction, стромально-васкулярна фракція
TGF	– transforming growth factor, трансформуючий фактор росту
TNF- α	– tumor necrosis factor alpha, фактора некрозу пухлин альфа
VEGF	– vascular endothelial growth factor, фактор росту ендотелію судин

ВСТУП

Обґрунтування вибору теми дослідження

У сучасній регенеративній медицині клітинні технології виходять на провідні позиції. Стовбуровим клітинам відводять роль інструмента, за допомогою якого можна відновити пошкоджені тканини і скорегувати порушення функцій багатьох органів. При цьому клітинна трансплантація має на меті не лише заміщення структурних елементів організму, а й запуск ендогенних репаративних процесів через активацію власних резидентних клітин-попередників.

Серед різноманітних типів соматичних стовбурових клітин, які можуть бути використані для регенерації тканин та органів, особливий інтерес привертають мультипотентні мезенхімальні стромальні клітини – ММСК (multipotent mesenchymal stromal cells – MMSCs). Одним з найбільш доступних та безпечних їх джерел є жирова тканина, з ліпоаспірату або фрагментів якої ММСК можуть бути отримані в будь-якому віці без суттєвих ризиків для пацієнта. Застосування таких аутологічних клітин дозволяє мінімізувати потенційні реакції відторгнення трансплантата та ризики передачі інфекцій, а також зняти юридичні та етичні обмеження клітинної терапії.

Серед альтернативних тканин перспективним джерелом ММСК є плацента, клітини з якої можуть бути виділені заздалегідь у необхідній кількості, тестовані та кріоконсервовані для подальшого довготривалого зберігання з можливістю швидкого застосування за вимогою в будь-який час. Використання таких алогенних клітинних препаратів може бути актуальним для пацієнтів похилого віку, у хворих із дефектами генів, а також при масивних пошкодженнях, коли немає можливості отримати за короткий час у достатній терапевтичній дозі аутологічні клітини належної якості.

Додатковим пріоритетним напрямом є пошук доступних та безпечних джерел аутологічних соматичних стовбурових клітин інших типів. Зокрема, значну роль у зниженні скоротливої здатності міокарда відводять дисфункції резидентних прогеніторів, тому для його регенерації найбільш перспективними

вважають підходи з виділення, нарощування та застосування саме тканинспецифічних стовбурових клітин серця (cardiac-derived stem cells – CSCs). Водночас, в патогенезі ендотеліальної дисфункції, яка супроводжує патологію серцево-судинної системи, ключова роль належить порушенню репарації ендотелію. Тому розробка і валідація технологій отримання в достатній для трансплантації кількості ендотеліальних прогеніторів (endothelial progenitor cells – EPCs) з кровоносних судин має на меті відновлення трофіки і перфузії тканин при гострих або хронічних ішемічних пошкодженнях.

Одними з головних труднощів при регенерації тканин є забезпечення виживання трансплантованих клітин у місці їх застосування та функціонування, особливо з врахуванням таких локальних патологічних процесів як запалення та ішемія. З цією метою розробляються тривимірні (3D) матрикси, які здатні не лише заповнювати дефекти тканин, а й слугувати каркасом для стовбурових клітин, забезпечуючи належні умови мікрооточення (ніші) для їх ефективної проліферації, диференціювання та трофіки завдяки формуванню судинної мережі.

Відомо, що старіння організму супроводжується дисфункцією в усіх тканинах та органах, зокрема і в жировій тканині, де зміни на рівні адипоцитів та стромальних клітин асоційовані з хронічним запаленням та метаболічними порушеннями. Сукупність цих специфічних гуморальних та клітинних факторів характеризують як секреторний фенотип, асоційований зі старінням (senescence-associated secretory phenotype – SASP), що відіграє ключову роль у підтриманні запалення і порушенні гомеостазу та впливає на регенеративний потенціал клітин.

Важливо, що доклінічна оцінка та подальше клінічне застосування стовбурових клітин різного походження потребує валідації їх відповідності певним критеріям, залежним як від багатьох факторів з боку донора та реципієнта, так від особливостей процесу виділення. Розробка таких доклінічних критеріїв якості, безпеки та ефективності застосування клітинних препаратів з подальшою трансляцією результатів у клініку тісно пов'язана із з'ясуванням нових аспектів патогенетичних механізмів реалізації регенеративного потенціалу різних типів соматичних стовбурових клітин, що і лягло в основу цієї роботи.

Зв'язок роботи з науковими програмами

Дослідження проведені в рамках виконання планових науково-дослідних робіт ДУ "Інститут генетичної та регенеративної медицини НАМН України": "Дослідити на моделях тривимірного культивування потенціал до направленого диференціювання мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин різного походження" (№ держреєстрації 0113U000101), "Встановлення регенеративного потенціалу ендотеліальних клітин-попередників при пошкодженні тканин ішемічного генезу" (№ держреєстрації 0116U000140), "Встановлення регенеративного потенціалу стовбурових клітин міокарда на моделях пошкодження серця у мишей" (№ держреєстрації 0119U000086).

Додаткові результати також отримано при виконанні науково-дослідної роботи "Встановлення морфофункціональних властивостей мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин жирової тканини в оваріоектомованих мишей різного віку" (№ держреєстрації 0118U100249); проєкту GP/F44/057 "Характеристика субпопуляцій мультипотентних клітин плаценти для потреб регенеративної медицини" по гранту Президента України для підтримки наукових досліджень молодих учених; проєктів № 5977 "Effect of stem cells transplantation on the nervous tissue regeneration in perinatal CNS pathology" та № 6262 "Development of technology for three-dimensional culture of multipotent cells to regenerate tissue after ischemic injury" по грантах Українського науково-технологічного центру; проєкту № 55952 "Розробка критеріїв біобезпеки стовбурових клітин жирової тканини" по гранту Президента України докторам наук для здійснення наукових досліджень.

Окремі результати, наведені в дисертації, увійшли до роботи "Новітні методи застосування стовбурових клітин і біоінженерних технологій у регенеративній медицині", удостоєної Національної премії України ім. Бориса Патона за 2021 р.

Мета дослідження – з'ясувати механізми реалізації регенеративного потенціалу соматичних стовбурових клітин різного походження, які відповідають належним критеріям якості та ефективності, для підвищення безпеки клітинної терапії.

Завдання дослідження:

1. Встановити ключові критерії якості та відповідності соматичних стовбурових клітин з жирової тканини, плаценти, серця та судин за характеристиками культур *in vitro*.
2. Встановити загальні доклінічні критерії ефективності соматичних стовбурових клітин при трансплантації на моделях пошкодження тканин *in vivo*.
3. Визначити морфологічні, фенотипічні та функціональні характеристики ММСК жирової тканини в нормі та в умовах дисфункції ніші.
4. З'ясувати умови та механізми реалізації регенеративного потенціалу тривимірних культур мікрмаси ММСК жирової тканини при пошкодженні кісток.
5. Встановити умови та механізми реалізації регенеративного потенціалу тривимірних культур ММСК жирової тканини в гідрогелі при ішемічному пошкодженні м'яких тканин кінцівок.
6. Встановити умови та механізми реалізації регенеративного потенціалу ендотеліальних прогеніторів при ішемічному пошкодженні м'яких тканин кінцівок.
7. З'ясувати вікові та анатомічні особливості фенотипічних та функціональних характеристик прогеніторних клітин міокарда *in vitro*.
8. Встановити умови забезпечення належних функціональних критеріїв відповідності культур прогеніторних клітин міокарда *in vitro*.
9. Визначити умови та механізми реалізації регенеративного потенціалу ММСК плаценти при ішемічному пошкодженні міокарда.
10. Обґрунтувати практичну доцільність дотримання стандартизованих критеріїв комплексної оцінки якості та ефективності реалізації регенеративного потенціалу соматичних стовбурових клітин на доклінічному етапі.

Об'єкт дослідження: регенеративний потенціал соматичних стовбурових клітин.

Предмет дослідження: патогенетичні механізми реалізації регенеративного потенціалу соматичних стовбурових клітин різних типів за умови дотримання належних критеріїв якості та ефективності.

Методи дослідження. Для досягнення мети роботи були використані сучасні культуральні, імунологічні, морфологічні, хірургічні та інструментальні методи досліджень. Первинні культури соматичних стовбурових клітин досліджували *in vitro* за морфологічними характеристиками, проліферативною активністю, здатністю до колонієутворення, потенціалом до спрямованого диференціювання; проводили мультипараметричне імунофенотипування клітин методами проточної цитометрії та імуноцитохімії, а також тривимірне культивування в культурі мікрмаси та гідрогелі на основі карбомеру 974Р. На моделі травматичних дефектів кісток у мишей проводили доклінічну оцінку регенеративного потенціалу *in vivo* отриманих культур ММСК жирової тканини з моношару або культивованих методом мікрмаси та спрямовано диференційованих в остеогенному напрямі. На моделі критичної ішемії кінцівок встановлювали ефективність застосування культур ММСК жирової тканини та ендотеліальних прогеніторів у суспензії або гідрогельних носіях. На моделі ізопротеренол-індукованої кардіоміопатії досліджували регенеративний потенціал культур ММСК плаценти людини. Оваріоектомія в мишей слугувала для моделювання дисфункції ніші стовбурових клітин жирової тканини. Для валідації моделей та встановлення терапевтичних ефектів трансплантації клітин використовували гістологічні (морфометрія), імунологічні (імуногістохімія), інструментальні (електрокардіографія, лазерна доплерівська флоуметрія) та функціональні методи дослідження (толерантність до фізичного навантаження). У ході пілотного клінічного дослідження пацієнтам з діагнозом ішемічної кардіоміопатії, ускладненої серцевою недостатністю III-IV функціонального класу, під час хірургічної реваскуляризації проводили інтраміокардіальну трансплантацію ММСК плаценти людини. Оцінювали показники фракції викиду і регіонарної скоротливості міокарда методом speckle-tracking-ехокардіографії та якість життя за опитувальниками MLHFQ та HeartQoL.

Наукова новизна отриманих результатів

У дисертаційній роботі вперше визначено патогенетичні особливості реалізації регенеративного потенціалу соматичних стовбурових клітин різного походження із врахуванням критеріїв якості та доклінічної ефективності при пошкодженні кісткової, м'язової тканини та серцево-судинної системи.

Вперше встановлені комплексні цитометричні, культуральні, морфологічні та функціональні критерії якості соматичних стовбурових клітин жирової тканини, плаценти, міокарда і ендотеліальних прогеніторів та їхній вплив на реалізацію регенеративних ефектів.

Вперше встановлено, що забезпечення якості соматичних стовбурових клітин різного походження потребує врахування відповідності їхніх морфофункціональних та імунофенотипічних характеристик, потенціалу спрямованого диференціювання, проліферативної та клоногенної активності, життєздатності клітин залежно від їх типу, походження, віку донора, технології виділення, просторових умов та тривалості культивування *in vitro*.

Вперше показано, що спрямоване диференціювання трансплантатів ММСК жирової тканини в остеогенному напрямі в умовах тривимірного культивування методом мікрмаси сприяє регенерації пошкодженої кісткової тканини шляхом заміщення втрачених структур кістки, а морфологічні показники її відновлення перевищують ефекти трансплантатів мікрмаси без попереднього диференціювання.

На моделі критичної ішемії кінцівок у мишей вперше доведено здатність до васкуляризації в організмі реципієнта трансплантатів гідрогелів з карбомеру 974Р, заселених ММСК жирової тканини, підвищення виживання клітин, покращення морфофункціонального стану і перфузії пошкодженої м'язової тканини (на 80,1 % на 10-ту добу, 64,8 % – на 28-му; $p \leq 0,05$) та встановлено механізми позитивних ефектів.

Вперше встановлено, що змодельована дисфункція тканинної ніші стовбурових клітин погіршує морфофункціональні характеристики ММСК жирової тканини, збільшуючи удвічі час подвоєння популяції ($p \leq 0,05$), знижуючи потенціал до колонієутворення (на 27,9 %) та остеогенного диференціювання (на 37,3 %), а також посилюючи адипогенез (на 93,9 %) в культурах *in vitro*.

Вперше продемонстровано вплив субстратів росту Matrigel та фібронектину на посилену експресію специфічних маркерів ендотеліальними прогеніторними клітинами з аорти мишей (CD31 понад 80 % на пасажі 3) для реалізації проангіогенних терапевтичних ефектів на моделі критичної ішемії кінцівок у мишей шляхом відновлення перфузії та покращення гістологічних показників ішемізованих тканин.

Вперше з врахуванням вікових аспектів визначено відмінності клітин-попередників з різних відділів міокарда миші та людини, охарактеризовано в динаміці їхній проліферативний потенціал та експресію специфічних маркерів тропонін I, VEGFR-2 і CD31 під впливом кардіотрофіну, полі-Д-лізину і фібронектину.

Вперше продемонстровано комплексну кардіопротекторну доклінічну ефективність на моделі кардіоміопатії в мишей та первинну клінічну безпеку інтраміокардіального застосування ММСК плаценти в людини при ішемічній хворобі серця, що визначається пригніченням запалення, запобіганням процесам апоптозу, покращенням морфологічних та функціональних показників міокарда.

Практичне значення отриманих результатів

Практичне значення результатів роботи полягає в розробці концепції комплексної оцінки критеріїв якості клітинних препаратів, які застосовують у регенеративній медицині для доклінічних та подальших клінічних досліджень.

Розроблено технології тривимірного культивування мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин з жирової тканини, ендотеліальних прогеніторів та клітин-попередників з міокарда. Розроблено протоколи мультипараметричного імунофенотипування методом лазерної проточної цитометрії різних типів соматичних стовбурових клітин. Для доклінічної оцінки терапевтичного потенціалу стовбурових клітин впроваджено моделі пошкодження серцево-судинної системи та опорно-рухового апарату на мишах.

Розроблені технології отримання соматичних стовбурових клітин різних типів за короткий час у необхідній терапевтичній кількості дозволять підвищити їхній регенеративний потенціал, безпеку та ефективність застосування, що матиме суттєве медичне, соціальне та економічне значення в аспекті зниження показників інвалідизації та смертності серед працездатного населення.

Результати дисертаційної роботи впроваджені в практичну діяльність наукових підрозділів Інституту генетичної та регенеративної медицини ДУ "Національний науковий центр "Інститут кардіології, клінічної та регенеративної медицини ім. М. Д. Стражеска НАМН України", ДУ "Інститут геронтології ім. Д. Ф. Чеботарьова НАМН України". З врахуванням положень дисертації здобувач був членом робочих груп МОЗ України з розроблення "Ліцензійних умов провадження господарської діяльності банків пуповинної крові, інших тканин і клітин людини" (Постанова Кабінету Міністрів України №286 від 02.03.2016 р.) та з питань положень Закону України "Про застосування трансплантації анатомічних матеріалів людині" від 17.05.2018 р. № 2427-VIII.

На основі результатів доклінічних досліджень, на базі Національного інституту серцево-судинної хірургії імені М. М. Амосова НАМН України проведено першу фазу пілотного клінічного випробування з інтраміокардіального застосування мультипотентних стовбурових клітин плаценти "Оцінка ефективності застосування стовбурових клітин міокарда, кісткового мозку, плаценти, жирової тканини та їх комбінацій у лікуванні хворих на ішемічну кардіоміопатію" (висновок Координаційного центру трансплантації органів, тканин і клітин Міністерства охорони здоров'я України, 2017 р.).

Особистий внесок здобувача

Автором особисто обрано і обґрунтовано ідею та тематику дисертаційної роботи, проведено аналіз літературних джерел відповідно до сучасних уявлень про патофізіологію та терапевтичний потенціал стовбурових клітин різних типів; сформульовано мету, основні завдання роботи, визначено необхідний репрезентативний обсяг експериментальних досліджень та комплекс сучасних високотехнологічних методів для їх проведення.

Автором розроблено дизайн досліджень, сформовано групи піддослідних тварин, організовано і виконано основну частину експериментів методом рандомізованих блоків. На основі належної статистичної обробки та аналізу отриманих даних проведено наукову інтерпретацію та узагальнення результатів, а також сформульовано висновки і розроблено концепцію доклінічних критеріїв якості та безпеки препаратів соматичних стовбурових клітин різного походження.

За результатами досліджень автором визначено основні положення наукової новизни дисертаційної роботи, її теоретичне та практичне значення для фундаментальної науки та клінічної медицини.

Окремі експерименти були проведені спільно зі співавторами опублікованих робіт із зазначенням особистого внеску автора в публікації. Дослідження ММСК в умовах тривимірного культивування проводили спільно з співробітниками лабораторії клітинних та тканинних культур ДУ "Інститут генетичної та регенеративної медицини НАМН України" (PhD О. В. Кучук, канд. біол. наук П. П. Клименко). Дослідження характеристик культур ММСК жирової тканини від тварин різного віку в умовах оваріоектомії проводили в співпраці з лабораторією патофізіології та імунології ДУ "Інститут геронтології ім. Д. Ф. Чеботарьова НАМН України" (канд. біол. наук А. М. Устименко). Дослідження ультраструктурних характеристик та регенеративного потенціалу ММСК при пошкодженнях тканин проводили в співпраці з відділом цитології Інституту фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України (член-кор. НАН України, д-р мед. наук, проф. Г. Г. Скибо, д-р мед. наук О. М. Цупиков, д-р біол. наук І. В. Лушнікова) та лабораторією імунології клітинних рецепторів Інституту біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України (академік НАН України, д-р біол. наук, проф. М. В. Скок, канд. біол. наук О. Ю. Лихмус). Дослідження властивостей ММСК з плаценти людини проводили в співпраці з Кріобанком (канд. біол. наук. Г. С. Лобинцева, канд. біол. наук В. А. Шаблій) та лабораторією клітинних культур (канд. біол. наук Т. В. Букреєва, канд. біол. наук М. Д. Кучма, канд. біол. наук Г. М. Світїна) Інституту клітинної терапії в рамках договору про творче науково-практичне співробітництво. Дослідження прогеніторних клітин з міокарда людини та терапевтичної ефективності ММСК плаценти проводили в співпраці з відділенням хірургії ішемічної хвороби серця Національного інституту серцево-судинної хірургії імені М. М. Амосова НАМН України (член-кор. НАМН України, д-р мед. наук, проф. А. В. Руденко, д-р мед. наук С. А. Руденко).

Особливу подяку здобувач висловлює академіку НАМН України, член-кореспонденту НАН України, доктору медичних наук, професору Геннадію Михайловичу Бутенку за наукове консультування під час виконання роботи.

Апробація результатів дисертації.

Усі матеріали дисертації доповідалися на наукових семінарах відділу клітинних та тканинних технологій та засіданнях вченої ради Інституту генетичної та регенеративної медицини, а також представлені в 16 тезах, 2 стендових та 13 усних доповідях на наукових конференціях, конгресах і симпозіумах: наукова конференція молодих вчених з міжнародною участю "Актуальні питання геронтології та геріатрії" (Київ, 2011 р.), 4th International IMBG Conference for young scientists "Molecular biology: advances and perspectives" (Київ, 2011 р.), World Cord Blood Congress III "Cord blood transplantation and immunobiology of haematopoietic stem cell transplant" (Рим, Італія, 2011 р.), World Conference on Regenerative Medicine (Ляйпціг, Німеччина, 2011 р.), DiSCUSS Meeting (Дрезден, Німеччина, 2011 р.), International Symposium on Cell Biology jointly with 3rd Ukrainian Congress for Cell Biology (Ялта, 2012 р.), міні-симпозіум "День стовбурової клітини" (Харків, 2012 р.), ISSCR 10th Annual Meeting (Йокогама, Японія, 2012 р.), науково-практична конференція з міжнародною участю "Актуальні проблеми регенеративної медицини" (Київ, 2012 р.), науково-практична конференція з міжнародною участю "Клітинні технології в акушерстві, гінекології, неонатології та дитячій неврології" (Київ, 2013 р.), науково-практична конференція та школа з міжнародною участю "Сучасні аспекти геронтології та геріатрії: від теорії до практики" (Київ, 2014 р.), 3rd IPLASS Meeting (Гранادا, Іспанія, 2014), III міжнародний медичний конгрес "Впровадження сучасних досягнень медичної науки в практику охорони здоров'я України" (Київ, 2014 р.), науково-практична конференція з міжнародною участю "Трансплантація – сьогодні, минуле та майбутнє" (Київ, 2014 р.), ISSCR 13th Annual Meeting (Стокгольм, Швеція, 2015), науково-практична конференція "Регенеративні технології в сучасній медицині" (Одеса, 2017 р.), Yantai International Hi-Tech Cooperation Meeting (Янтай, КНР, 2017 р.), Belt and Road Initiative Development Meeting of Guiyang National Hi-Tech Industrial Development Area (Гуйянґ, КНР, 2017 р.), науково-практична конференція "Інноваційні напрямки в генетичній та регенеративній медицині" (Київ, 2017 р.), науково-практична конференція з

міжнародною участю "Досягнення та перспективи експериментальної і клінічної ендокринології". 17-ті Данилевські читання (Харків, 2018 р.), Conference of Shandong Medical Association and Clinical Cell Therapy Professional Committee (Янтай, КНР, 2018 р.), ISCT 2019 Annual Meeting (Мельбурн, Австралія, 2019 р.), Southern University of Science and Technology Meeting (Шеньчжен, КНР, 2019 р.), XXII Національний Конгрес кардіологів України (Київ, 2021 р.), науково-практична конференція "Прикладні аспекти сучасної науки в лабораторній діагностиці різних патологічних станів, а також у пацієнтів, що перенесли COVID-19" (Київ, 2021 р.), науково-практична конференція з міжнародною участю "Регенеративні технології в травматології та ортопедії" (Київ, 2021 р.), XXIII Національний Конгрес кардіологів України (Київ, 2022 р.), XXIV Національний Конгрес кардіологів України (Київ, 2023 р.).

Публікації

За темою дисертації опубліковано 31 статтю у вітчизняних та іноземних наукових журналах, 2 статті у тематичних збірниках, а також розділ в колективній монографії. Серед опублікованих статей: 20 у виданнях, які були включені до Переліку фахових видань МОН України, 18 індексуються в Scopus, 10 індексуються у Web of Science, 9 – у виданнях, віднесених до квартилів Q1-Q2, та 3 – у виданнях, віднесених до квартилю Q3 за Scimago Journal & Country Rank або Web of Science.

Апробацію матеріалів дисертації засвідчено в 16 тезах доповідей у матеріалах вітчизняних і міжнародних наукових конференцій та конгресів, а також представлено у формі 2 стендових та 13 усних доповідей.

За результатами досліджень отримано 5 патентів на корисну модель, оформлено 6 нововведень та зареєстровано 2 технології.

Дані про публікацію та апробацію результатів дисертації, а також особистий внесок здобувача в них наведені в додатках.

Структура та обсяг дисертації

Дисертація складається із вступу, семи розділів, висновків та списку цитованої літератури. У першому розділі наведено критичний аналіз наукових літературних джерел щодо сучасного стану дослідження патофізіологічних механізмів реалізації регенеративного потенціалу соматичних стовбурових клітин різного походження: з жирової тканини та плаценти, ендотеліальних прогеніторів та тканиноспецифічних стовбурових клітин з міокарда. Розглянуто варіанти застосування тривимірних культур стовбурових клітин у лікуванні пошкоджень тканин. Особливий акцент зроблено на проблемних питаннях контролю якості клітинних препаратів, зокрема щодо старіння стовбурових клітин та їхньої ніші в організмі *in vivo* та культурі *in vitro*. Під час роботи з науковою літературою використано спеціалізовані бази даних PubMed, Scopus, Hinari. Загалом, опрацьовано понад 600 літературних джерел, більшість з яких увійшли до списку цитування.

У другому розділі "Матеріали і методи дослідження" описані методи виділення та культивування стовбурових клітин різного походження; експериментальні *in vivo* та *in vitro* моделі ушкодження кісткової, м'язової тканини, міокарда; способи трансплантації стовбурових клітин; методи імуноцитохімії та імуногістохімії, морфологічного дослідження на світловому та електронно-мікроскопічному рівнях; методи функціонального дослідження.

У третьому-шостому розділах наведено результати експериментальних досліджень характеристик та регенеративного потенціалу ММСК жирової тканини, плаценти, ендотеліальних клітин-попередників та тканиноспецифічних прогеніторів з міокарда з числовими даними та ілюстраціями. У сьомому розділі здійснено узагальнення отриманих результатів дослідження та їх аналіз у порівнянні з даними інших авторів, на основі чого зроблено висновки.

Обсяг дисертації – 400 сторінок, із них основного тексту – 313 сторінок. Дисертаційна робота ілюстрована 120 рисунками і 11 таблицями. Список цитованої літератури налічує 416 джерел та оформлений за правилами цитування в галузі медицини Vancouver Style згідно з Додатком 3 до наказу Міністерства освіти і науки України від 12.01.2017 р. № 40 "Про затвердження Вимог до оформлення дисертації".

РОЗДІЛ 1 ХАРАКТЕРИСТИКА ТА ОСОБЛИВОСТІ РЕАЛІЗАЦІЇ РЕГЕНЕРАТИВНОГО ПОТЕНЦІАЛУ СОМАТИЧНИХ СТОВБУРОВИХ КЛІТИН РІЗНОГО ПОХОДЖЕННЯ (ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ)

1.1 Загальна характеристика та класифікація стовбурових клітин

При традиційному підході до лікування зусилля клініцистів спрямовуються на медикаментозну стимуляцію самовідновлення (ауторегенерацію) завдяки впливу на патогенетичні механізми, що активуються в організмі, з одного боку, або ж на штучне відновлення втрачених функцій за допомогою протезування або трансплантації органів, з іншого боку. Регенеративна ж медицина використовує властивості наявних в організмі на різних етапах його розвитку недиференційованих стовбурових клітин, які здатні дати початок багатьом типам вже спеціалізованих клітин.

Основою регенеративної медицини є стовбура клітина. Їй притаманні дві ключові риси. Залишаючись недиференційованою, вона здатна до тривалого самопідтримання в культурі та в організмі без старіння, без укорочення теломер при послідовних поділах. Але водночас, при отриманні відповідного сигналу, а іноді, можливо, і спонтанно вона втрачає цю здатність і диференціюється, тобто перетворюється на різноманітні спеціалізовані клітини організму [329]. За цими зовнішніми проявами стоять дуже складні, ще до кінця не з'ясовані, зміни в генетичному субстраті клітини – деацетилювання, метилювання та фосфорилування ДНК та гістонів, що призводять до характерних епігенетичних феноменів, пов'язаних із вузькою функціональною спеціалізацією клітин [35].

Клітини, що мають риси стовбурових, класифікують за їхнім походженням, потенціалом диференціювання та спорідненістю донора і реципієнта. Джерелами стовбурових клітин можуть бути доімплантаційні ембріони, тканини плода або дорослого організму. Клітини, отримані з внутрішньої клітинної маси бластоцисти доімплантаційного ембріона прийнято називати ембріональними стовбуровими клітинами (*embryonic stem cells*). Стовбурові та прогеніторні клітини, отримані з тканин ембріона після імплантації та під час його

внутрішньоутробного розвитку, називають фетальними (fetal stem cells). При цьому вони можуть мати як походження з тканин та органів сформованого плода, так і бути виділеними з екстраембріональних джерел (наприклад, з плаценти та пуповини). Нарешті, клітини, отримані після народження, прийнято називати стовбуровими клітинами дорослого організму (adult stem cells), які можуть бути гермінативними (germline stem cells) або соматичними (somatic stem cells). На сьогодні соматичні стовбурові та прогеніторні клітини виділені практично з усіх органів та тканин, а технології терапевтичного клонування, індукування плюрипотентності або трансдиференціювання передбачають можливість отримання стовбурових клітин із вже спеціалізованих [398].

Інша класифікація стовбурових клітин базується на їхньому потенціалі диференціювання. Ключовою властивістю стовбурових клітин, що визначає спектр їхнього регенеративного потенціалу, є потентність – здатність диференціюватись у прогеніторні та зрілі клітини певних типів. Потентність, як і регенеративний потенціал, зменшується під час онтогенезу. На ранньому етапі розвитку організму при дробленні зиготи до стадії 8 бластомерів кожна з цих клітин може дати початок цілісному новому організму, тобто має тотипотентність. Виділення таких клітин дозволяється лише з діагностичною метою для виявлення можливих генетичних порушень ембріона перед його імплантацією в рамках реалізації допоміжних репродуктивних технологій – так звана доімплантаційна генетична діагностика.

Ембріональні клітини, отримані на пізнішій стадії з внутрішньої клітинної маси бластоцисти, є плюрипотентними та можуть дати початок тканинам усіх трьох зародкових листків (екто-, енто- та мезодерми) за винятком екстраембріональних тканин. Основною перевагою таких клітин є можливість спрямованого диференціювання їх у будь-яку клітину дорослого організму для заміщення пошкоджених тканин усіх типів. Плюрипотентні клітини можуть бути виділені з надлишкових ембріонів, які створювались за допомогою екстракорпорального запліднення в ході реалізації допоміжних репродуктивних технологій; з бластоцист, спеціально створених для досліджень; з ембріонів,

отриманих методом перенесення ядра соматичної клітини в зиготу. Оскільки виділення таких клітин супроводжується руйнуванням і загибеллю доімплантаційного ембріона, у багатьох країнах світу існують суворі обмеження на проведення фундаментальних наукових або клінічних досліджень з використанням ембріональних стовбурових клітин з внутрішньої клітинної маси бластоцисти. З науковою метою для придбання доступні комерційні лінії таких клітин, але можливість проведення досліджень у конкретній країні визначається локальним законодавством [156]. Однак, відомо про декілька клінічних випробувань із застосуванням ембріональних стовбурових клітин людини для лікування пошкоджень спинного мозку, кардіоміопатії, дегенерації сітківки [78, 238]. До недоліків ембріональних стовбурових клітин, окрім етичної та юридичної складової, відносять їхній тератогенний потенціал – здатність утворювати нетипову тканину в місці трансплантації. Оскільки механізми контролю проліферації та диференціювання вивчені ще недостатньо, перенесення плюрипотентних клітин у нове середовище може викликати їх злякисне переродження.

З тканин абортіваного плода, в якого вже сформовані внутрішні органи, можуть бути виділені мультипотентні стовбурові клітини, які здатні давати початок тканинам у межах одного зародкового листка. Наприклад, з фетальної печінки можуть бути виділені стовбурові клітини гемопоетичного ряду, які дають початок зрілим диференційованим клітинам крові, з головного мозку – нейральні стовбурові клітини, які дають початок нейронам, астроцитам та олігодентроцитам. Враховуючи, що джерелом таких клітин є тканини, отримані внаслідок штучного переривання вагітності, існують певні морально-етичні, релігійні та юридичні обмеження щодо отримання та клінічного застосування клітин з абортіваних плодів [159]. По-перше, ембріон людини захищений Гельсінською декларацією. Крім того, не завжди можливе проведення на належному рівні контролю медичних і соціальних факторів, які супроводжують штучне переривання вагітності за бажанням жінки, що підвищує ймовірні ризики інфікування або перенесення клітин з генетичними аномаліями при подальшому застосуванні такого біологічного матеріалу. Також існують технологічні

обмеження, пов'язані з руйнуванням тканин плода при проведенні абортів методом вакуум-екстракції, оскільки за рекомендаціями ВООЗ штучне переривання вагітності саме таким методом є більш безпечним для жінки, на відміну від кюретажа. Крім того, однією з ключових проблем застосування деяких фетальних клітин є з'ясування їхнього канцерогенного потенціалу, оскільки висока проліферативна активність повинна контролюватися механізмами саморегуляції або факторами мікрооточення реципієнта, які ще не достатньо досліджені.

Під час пологів з тканин фетоплацентарного комплексу можуть бути отримані мультипотентні стовбурові клітини різних типів. Джерелом таких клітин є пуповинна кров, тканина пупкового канатика, плацента [373]. Головною перевагою цих джерел є їхня доступність та безпека, оскільки забір матеріалу проводиться вже після народження плода без жодної шкоди для дитини та матері. При цьому клітини з них мають достатньо високий диференціювальний та регенеративний потенціал. Зазвичай, такі клітини підлягають персональному банкуванню для подальшого аутологічного застосування за потреби в самій дитини. Наприклад, пуповинну кров використовують із замісною метою при оперативному лікуванні вроджених вад серця в новонароджених. Також продемонстровано позитивні ефекти її застосування при лікуванні перинатальних гіпоксично-ішемічних уражень головного мозку. Найбільш широке застосування пуповинна кров знайшла при корекції онкогематологічної патології, як багате джерело гемопоетичних клітин. При цьому високу ефективність і безпеку продемонстрували не лише аутологічні, а й алогенні трансплантації від родинних та неродинних донорів, оскільки цей тип клітин має низьку імуногенність та рідко викликає реакції відторгнення або "трансплантат проти хазяїна" [293].

До мультипотентних стовбурових клітин відносять гемопоетичні стовбурові клітини – ГСК (haematopoietic stem cells – HSCs), мультипотентні мезенхімальні стромальні – ММСК (multipotent mesenchymal stromal cells – MMSCs), нейральні (neural stem cells – NSCs). ГСК, які локалізуються в кістковому мозку, дають початок усім росткам кровотворення: мієлоїдному, лімфоїдному, еритроцитарному та тромбоцитарному. Трансплантацію ГСК кісткового мозку

успішно застосовують вже понад 40 років для відновлення кровотворення при лікуванні лейкозів, важких анемій та променевої хвороби.

ММСК з різних джерел здатні диференціюватись у похідні мезенхіми: кісткову, хрящову, жирову та іншу стромальну сполучну тканину [148]. Також дискутується можливість їхнього ендотеліального, міогенного, кардіоміоцитарного і навіть нейрогенного трансдиференціювання. В останні роки дещо переглядається парадигма реалізації регенеративного потенціалу ММСК лише за допомогою прямого диференціювання в спеціалізовані типи клітин і дедалі більше уваги приділяється неспецифічним паракринним впливам клітинного трансплантату завдяки продукції цитокінів, факторів росту, зокрема і у формі екзосом [165]. ММСК мають тропність до зони пошкодження та можуть впливати на перебіг процесів запалення і репарації. ММСК здатні пригнічувати надмірні запальні процеси та підтримувати гомеостаз імунної системи завдяки фізичним та/або хімічним взаємодіям з клітинами імунної системи. Вони забезпечують толерантність імунної системи реципієнта до алогенних клітин, тому їх використовують при ко-трансплантації з ГСК кісткового мозку [406].

Найбільш доступними, безпечними та клінічно значущими джерелами ММСК у дорослому організмі залишаються кістковий мозок та підшкірна жирова тканина. З огляду на такі недоліки забору кісткового мозку методом пункції кістки як болючість, ризик вилучити гемопоетичну тканину активного сайту кровотворення, необхідність колонієстимулюючих факторів для мобілізації стовбурових клітин з ніш, жирова тканина стає більш пріоритетним джерелом ММСК. Сучасний рівень хірургії та анестезіологічного супроводу дозволяє проводити нетривалі, малоінвазивні оперативні втручання для отримання мінімальної кількості цільної жирової тканини або ліпоаспірату, достатньої для безпосереднього застосування клітин або їх подальшого культивування.

З розвитком організму широта можливих шляхів диференціювання звужується і стовбурові клітини з мультипотентних стають оліго- та уніпотентними, тобто здатними давати початок лише обмеженим лініям спеціалізованих клітин і тканин, забезпечуючи їх оновлення та регенерацію.

Це означає, що ранні стовбурові клітини стають більш зрілими і вибудовується ціла низка клітин-попередниць, в яких вже відбуваються епігенетичні зміни, що успадковуються нащадками, хоча вони зберігають основні риси стовбуровості. Зокрема, олігопотентний потенціал реалізують ендотеліальні та тканиноспецифічні стовбурові клітини (кардіальні, шкіри, кишківника, печінки).

Перспективним напрямом є розробка нових технологій виділення та терапевтичного застосування тканиноспецифічних стовбурових клітин, які вже прекомітовані для подальшого диференціювання в певний тип тканини, з якої вони походять. Завдяки цьому очікують підвищення загальної ефективності та безпеки клітинної терапії. На сьогодні присутність різних типів стовбурових клітин продемонстрована практично для усіх тканин та органів у людини. Зокрема, показана можливість виділення стовбурових клітин з шкіри, рогівки, скелетних м'язів, міокарда, печінки, підшлункової залози, волосяного фолікула, пульпи зуба тощо. Проводяться клінічні дослідження з лікування серцевої недостатності, кардіоміопатії та деяких вроджених вад серця за допомогою трансплантації стовбурових клітин з міокарда [378]. Ствобурові клітини з лімба рогівки застосовують для лікування хімічних опіків очей [298]. Для лікування пошкоджень хряща зареєстровані клітинні продукти на основі хондроцитів [252].

До обмежень застосування тканиноспецифічних стовбурових клітин можна віднести досить складні і затратні технологічні підходи до їх виділення і трансплантації, а також можливості безпечного прижиттєвого отримання первинного матеріалу, наприклад, для виділення нейральних стовбурових клітин з головного мозку. У зв'язку з цим були розроблені технології перепрограмування зрілих соматичних клітин у більш ранній недиференційований стан.

Досить довго було поширене уявлення, що при нормальному перебігу процесу диференціювання клітина незворотно втрачає властиві їй на більш ранньому етапі розвитку риси, проходячи своєрідну "точку неповернення" (point of no return). Це положення виявилось хибним і на сьогодні за допомогою спеціальних прийомів клітину можна повернути до початкового стану. Вперше це вдалося здійснити при пересадці ядра соматичної клітини жаби в її запліднену

енуклейовану зиготу. Пізніше репрограмування на моделях зигот тварин після пересадки в них ядра диференційованої клітини з подальшим розвитком нового організму було продемонстровано в багатьох дослідженнях [36]. Подібна технологія для терапевтичного клонування ембріонів була реалізована на мишах, вівцях, собаках, однак такі спроби в людини виявилися поки що безуспішними.

Проривом у цій галузі стали дослідження Yamanaka S. та ін. із введення за допомогою ретро- або лентівірусних векторів у зрілу клітину генів певних факторів транскрипції (Oct 3/4, Sox2, cMyc, Klf4, Nanog, Lin28), відповідальних за плюрипотентність. У результаті, у культурах диференційованих фібробластів було отримано невеликий відсоток клітин (1:5000 у миші і 1:10000 у людини), що за всіма характеристиками нагадують ембріональні стовбурові клітини. Вони були названі індукованими плюрипотентними стовбуровими клітинами (induced pluripotent stem cells – iPS), з яких, як і в період раннього розвитку ембріона, можуть бути отримані різноманітні спеціалізовані клітини – кардіоміоцити, нейрони, гепатоцити, ендотеліоцити, клітини сітківки тощо [382].

Проте, крім високої вартості технології через низьку ефективність індукції плюрипотентності, існують певні ризики клінічного застосування iPS, пов'язані з використанням вірусних векторів, що хаотично вбудовуються в геном та спричиняють його нестабільність, а також можливістю неконтрольованої активації інших генів, відповідальних за проліферацію та диференціювання клітин. Крім того, з віком в усіх клітинах накопичуються мутації в геномі, які при індукції плюрипотентності передадуться усім клітинам-нащадкам, отриманим з iPS. Це може стати причиною малігнізації трансплантату в організмі реципієнта або формування тератом. Наприклад, одні з перших клінічних випробувань у Японії по застосуванню iPS клітин у пацієнтів з макулярною дегенерацією сітківки були достроково припинені через виявлення мутацій в iPS клітинах донора, а в іншому випадку – через набряк сітківки після трансплантації [82].

Проте, для отримання певних диференційованих клітин повернення їх до стану ембріональної стовбуровості не є обов'язковим у всіх випадках. Найчастіше, трансдиференціювання вдається досягти в межах тканин одного зародкового

листка і в такий спосіб зменшити кількість факторів транскрипції, що вводяться. За останні роки ця технологія активно розвивалась і вже проведено декілька клінічних випробувань із застосуванням іPS клітин у людини в лікуванні захворювань очей, серця, солідних пухлин [82]. Також відомо, що іPS клітини від донора з генетичним дефектом передають його своїм нащадкам і тому можуть бути використані для поглибленого дослідження патогенезу захворювання і спрямованого пошуку методів його персоніфікованого лікування [154].

За характеристиками сумісності при трансплантації стовбурові клітини поділяють на аутологічні (з власного організму), сингенні (від генетично ідентичного або достатньо ідентичного та імунологічно сумісного донора), алогенні (від іншої особини того ж виду) та ксеногенні (від організмів інших видів). У випадку аутологічної трансплантації знімаються обмеження, що стосуються ризику передачі інфекцій, відторгнення пересаджених клітин або навпаки – реакції трансплантат-проти-хазяїна. Сингенний варіант використовується у випадку родинної трансплантації ГСК від гістосумісних донорів (наприклад, однойцевих близнюків). Алогенна трансплантація доцільна у випадку неможливості отримати необхідну кількість клітин належної якості від донора (через вік, анатомічні особливості, медичні протипокази), або якщо він є носієм патологічної мутації генів, яка присутня у всіх його стовбурових клітинах. Завдяки своїм вираженим імуносупресивним властивостям та відсутності експресії білків головного комплексу гістосумісності, ММСК успішно застосовують не лише у формі алогенної терапії самостійно, а й у комбінації з гемопоетичними клітинами для запобігання реакцій їх відторгнення [407].

Отже, клітинні та тканинні технології вийшли на якісно новий рівень як експериментальних моделей, так і варіантів їх клінічного застосування. Джерелом соматичних стовбурових клітин можуть бути багато тканини організму, а методики перенесення генів, терапевтичного клонування, індукування плюрипотентності та трансдиференціювання передбачають можливість отримання ранніх стовбурових клітин з уже спеціалізованих та відкривають широкі можливості перед експериментальною та клінічною медициною.

1.2 Мультипотентні мезенхімальні стромальні клітини з жирової тканини

Оцінка фізіологічної значущості жирової тканини радикально змінилася за останні роки. Якщо раніше вважалося, що накопичення жиру є єдиною її функцією, тепер відомо, що це дуже активний ендокринний орган, який виділяє численні біоактивні ліпіди (ліпокіни), а також речовини білкової природи, які секретуються адипоцитами (адипокіни), імунними клітинами (хемокіни, цитокіни). Завдяки цьому жирова тканина активно взаємодіє з іншими клітинами та тканинами усього організму [79, 135]. Окрім того, присутні в ній стовбурові клітини мезенхімного походження здатні давати початок не лише адипоцитам, а й іншим типам клітин, що може бути успішно використано в регенеративній медицині для відновлення багатьох тканин та органів [275]. Ці клітини за своїми властивостями і регенеративним потенціалом найбільш схожі з ММСК кісткового мозку, але при цьому мають певні переваги, головними з яких є доступність, простота і безпека отримання в порівнянні з методиками для інших джерел [71, 203, 410].

У 1964 р. вперше була описана популяція клітин, отримана з фрагментів жирової тканини придатка яєчка щурів за допомогою обробки її протеолітичними ферментами з подальшим центрифугуванням. Згодом попередники адипоцитів були виділені також із фрагментів жирової тканини людини. Ця популяція містить різні групи моноклеарних клітин (моноцити, макрофаги, ендотеліоцити, фібробласти, перицити, гладком'язові клітини, преадипоцити) і названа стромально-васкулярною фракцією (Stromal Vascular Fraction – SVF) [228, 254]. Кількісні та якісні характеристики первинної SVF не завжди є достатніми для ефективного застосування безпосередньо після виділення і часто перед клініцистами стоять більш вузькі завдання щодо отримання певної популяції стовбурових клітин для трансплантації. Зокрема, при культивуванні SVF на твердій підкладці відбувається селекція клітин, які адгезують до поверхні. Відповідно до консенсусу Міжнародного товариства технологій із застосування жирової тканини в 2004 р. для клітин, отриманих із SVF або безпосередньо з жирової тканини культивуванням, які відповідають загальноприйнятим критеріям ММСК, рекомендовано визначення "Adipose-Derived Stem Cells" (ASCs) [88, 321].

Загалом, кількість ММСК, виділених з ліпоаспірату, набагато перевищує обсяги, які можуть бути отримані з інших джерел, якщо порівнювати загальну складність та тривалість маніпуляції. При цьому немає необхідності вводити ростові фактори для стимуляції виходу стовбурових клітин із ніш кісткового мозку. ASCs серед загальної популяції клітин SVF становлять приблизно 1-5 %, у той час як ММСК в аспіраті кісткового мозку лише 0,005-0,01 %. Ефективність виділення ASCs сягає від 5×10^3 до 8×10^5 клітин на 1 г тканини, залежно від місця та методики забору [118]. Мінімальний обсяг ліпоаспірату для ефективного виділення становить приблизно 200-250 мл, що достатньо для отримання 10^7 - 10^8 клітин. Можливість культивування дозволяє наростити клітинну масу до необхідної кількості з малого об'єму вихідного матеріалу. З огляду на подвоєння їхньої популяції через 3-4 доби, строки отримання достатніх для трансплантації обсягів клітин суттєво скорочуються [369].

Необхідно враховувати, що хоча при ультразвуковій ліпосакції вміст живих клітин у SVF у середньому такий же, як і при секційній, кількість вирощених ASCs та їхній потенціал при такому способі забору матеріалу знижуються. Ймовірно, запущені механічним ушкодженням деструктивні процеси проявляються відразу після виділення. Тому оптимальним негативним тиском для одержання ліпоаспірату вважається 350 мм рт. ст. Важливо, що ліпоаспірат може зберігатися до 4 год. при кімнатній температурі без істотного зниження життєздатності, а при 2-8 °C – до 24 год. [305].

Жирова тканина нижніх відділів живота є кращим та більш доступним джерелом для ліпоаспірації з метою виділення стовбурових клітин. ASCs у SVF з ділянки живота становлять приблизно 5 %, а зі стегна – до 1 %. При цьому деякі дослідження встановили, що ASCs з ділянки стегон проявляють підвищену остеогенну та знижену адипогенну здатність. Також ASCs з підшкірної жирової тканини мають вищу проліферативну активність та потенціал адипогенного диференціювання, ніж з вісцеральної. Було виявлено, що епікардіальні та сальникові ASCs мають вищий остеогенний і адипогенний потенціал, ніж перикардіальні, але лише епікардіальні демонструють високий кардіоміогенний потенціал [118, 296].

Окрім адгезії до пластику, ASCs характеризуються певним набором поверхневих мембранних маркерів і за своїм фенотипом на 90 % подібні до ММСК з кісткового мозку. На ранніх етапах виділення фенотипування підтверджує неоднорідність SVF, що містить Т- і В-лімфоцити, гранулоцити, моноцити та гладком'язові клітини судин. При культивуванні клітин, що адгезували, наростає експресія основних мезенхімальних маркерів CD44, CD73, CD90 і CD105, стабілізуючись після 2-4 пасажу. Експресія гемопоетичного маркера CD34 змінюється залежно від умов і тривалості культивування та максимально виражена в SVF. Також досить варіабельною може бути експресія маркерів CD14, CD117 та CD31 [24].

Відомі дані про стабільну підтримку культури (за антигенними характеристиками та секрецією білків) від 4 подвоєнь популяції з можливістю доводити її до 15-20 пасажів під контролем каріотипу, теломеразної активності та довжини теломер [384]. При цьому ASCs зберігають свій мультипотентний потенціал після 10-го (34 подвоєння популяції) і навіть 25-го пасажу. ASCs у порівнянні з ММСК кісткового мозку більш активно секретують інтерлейкіни (IL-1, IL-6, IL-8), гранулоцитарно-макрофагальний колонієстимулюючий фактор GM-CSF, моноцитарний хемотаксичний протеїн MCP-1, фактор росту нервів NGF [369].

Для культивування ASCs використовують різні поживні середовища та добавки, що дозволяють у відносно короткий строк наростити клітинну масу, достатню для дослідження *in vitro* або трансплантації *in vivo*. З багатьох середовищ для культивування α MEM забезпечує найшвидшу експансію культури ASCs навіть у порівнянні з класичною комбінацією середовищ DMEM/F12 [274]. Для підтримки росту культур ASCs використовують трансформуючий фактор росту-бета (transforming growth factor – TGF- β) та основний фактор росту фібробластів (fibroblast growth factor – FGF-2). Комбінація епідермального фактора росту (epidermal growth factor – EGF) та FGF-2 збільшує проліферацію ASCs утричі за 7-8 діб культивування, сприяючи їх адипогенному диференціюванню [139]. Відсутність глютаміну та низька концентрація глюкози в середовищі зменшують потенціал ASCs до проліферації. Вважається, що в умовах помірної гіпоксії ASCs краще проліферують, а значна гіпоксія (0,1 % O₂) спричиняє загибель клітин [64].

Для довготривалого зберігання кріоконсервованих клітин важливий вибір кріопротектора, оскільки заморожування аспірату жирової тканини в сольовому розчині вже через 24 години негативно позначається на морфології клітин і зменшує їхню здатність синтезувати судинний фактор росту ендотелію (vascular endothelial growth factor – VEGF). Використання середовища з 30 % сахарозою підтримує рівень VEGF, хоча після тривалого зберігання матеріалу він знижений. При трансплантації мишам кріоконсервовані клітини диференціюються в CD34⁺ ендотеліоцити, аналогічно до трансплантатів нативних клітин [75].

Найбільш важливою характеристикою ASCs є їхня мультипотентність, що дозволяє клітинам самостійно в організмі або за допомогою спеціальних факторів та умов культивування диференціюватись у певні типи спеціалізованих клітин. Класичним є остео-, хондро- та адипогенне диференціювання ASCs, але також показана можливість отримати з них ендотеліоцити, гладком'язові, нейроноподібні і навіть гемопоетичні клітини.

Остеогенне диференціювання ASCs може бути індуковане за допомогою додавання до культурального середовища β -гліцерофосфату, аскорбінової кислоти, дексаметазону, вітаміну D3 в різних комбінаціях або навіть окремо. Наприклад, для запуску остеогенної програми диференціювання мишачих ASCs достатньо 15 діб культивування за наявності ретиноєвої кислоти [290]. β -трикальцій-фосфат завдяки абсорбції протеїнів є тригером формування остеобластного фенотипу ASCs навіть без додаткових остеогенних факторів [402]. Поліпшити остеогенез культури ASCs можуть також естрогени, у той час як висока концентрація фактора некрозу пухлин альфа (tumor necrosis factor alpha – TNF- α) пригнічує не лише остеогенне, а й хондрогенне та адипогенне диференціювання ММСК [40, 255].

Експерименти на тваринах продемонстрували можливість застосування культивованих і спрямовано диференційованих ASCs для відновлення кісткової тканини на моделях пошкодження плоских і трубчастих кісток. На собаках і щурах показана ефективність ASCs у регенерації періодонта зубів, що може бути актуальним для стоматології [405].

Інша класична форма спрямованого диференціювання ASCs – хондрогенна – може бути досягнута за допомогою таких факторів, як аскорбінова кислота, піруват натрію, L-пролін, дексаметазон, інсулін, TGF- β 1, TGF- β 3, кісткові морфогенетичні білки (bone morphogenetic protein – BMP-2, BMP-6) та ін. [332]. Оптимальною комбінацією ростових факторів є BMP-2/TGF- β 3, особливо щодо зміни експресії перехідного типу колагену ІА на специфічний для хряща тип ІВ [343]. У присутності TGF- β 3 ASCs продукують більше колагену І та ІІ типу, кератансульфату та декорину. Спільне культивування ASCs із хондроцитами сприяє приросту експресії колагену різного типу, як маркера довгострокової стабільності хряща [279]. При культивуванні ASCs у присутності ростового фактора диференціювання GDF-5 показано дозо- та час-залежне збільшення експресії специфічних для сухожилля білків (теномодулін, тенасцин-С) [271]. Синдекан – ще один трансмембранний глікопротеїн, що зв'язується з фібронектином та пригнічує синтез молекул адгезії нейральних клітин (neural cell adhesion molecule – N-CAM) [290]. В отриманій культурі кислі мукополісахариди та протеоглікани забарвлюються барвником Alcian Blue, а забарвлення Safranin O виявляє глікозаміноглікани та муцин. Відомо, що і низькі (5 %), і високі (20 %) концентрації кисню при культивуванні ASCs у хондрогенному напрямі стимулюють експресію колагену ІІ типу, але суттєве підвищення синтезу колагену Х типу показано лише за 20 % O₂. Концентрація ж кисню менше 2 % значно уповільнює хондрогенез [290].

У клінічному аспекті значний інтерес викликає можливість відновлення міжхребцевих дисків за допомогою ASCs. Спільна культура клітин пульпозного ядра та ASCs виявилася більш ефективною для формування позаклітинного матриксу завдяки продукції глікозаміногліканів та колагену І типу [411]. Також при спільному культивуванні самі ASCs можуть набувати фенотипу клітин пульпозного ядра. В експерименті на собаках продемонстровано, що ін'єкція в пошкоджений міжхребцевий диск ASCs з гіалуроновою кислотою покращує його щільність та фізичні характеристики протягом 12 місяців спостереження [113]. Для відновлення пульпозного ядра запропоновано також комбінацію ASCs з фактором GDF-5 на хітозановому гідрогелі з мікрокапсулами гепарину [387].

Адипогенне диференціювання ASCs, як найбільш досліджений варіант, може бути реалізоване при додаванні дексаметазону, інсуліну, ізобутилметилксантину, індометацину, тiazолідінедіону. Через кілька тижнів формується культура адипоцитів, яка забарвлюється на ліпіди барвником Oil Red O [290]. При цьому ASCs з білого жиру можуть диференціюватись навіть у клітини бурого. У процесі адипогенного диференціювання ASCs важлива роль відводиться мікро-РНК, зокрема рпо-miR-31 та рпо-miR-326 [220, 316]. Отримані адипоцити можуть бути використані для усунення дефектів м'яких тканин у пластичній та реконструктивній хірургії. При імплантації тваринам ASCs людини на колагеновому гелі з bFGF клітини стимулюють адипогенез *de novo*, підвищуючи час виживання трансплантату до 24 тижнів. Цьому сприяє також дозоване виділення ростового фактора з матриксу [139].

В експериментальних роботах на культурах ASCs людини та тварин показано, що крім класичного диференціювання в адипоцити, хондроцити та остеобласти з них вдавалося отримати багато інших типів спеціалізованих клітин. Близьким до ендотеліального та кардіоміоцитарного диференціювання ASCs, є міогенне. За допомогою дексаметазону, 5-азацитидину, добавки Insulin Transferrin Selenium, IL-3 та IL-6 можна отримати не лише звичайні гладком'язові клітини, але й кардіоміоцити. При культивуванні з BMP-4 та TGF- β 1 ASCs починають експресувати маркери гладком'язових клітин (α -гладком'язовий актин, кальпонін, гладком'язовий фактор-22, важкі ланцюги міозину) і здатні контракувати колагеновий матрикс під впливом хлориду калію [362]. ASCs також можуть диференціюватися в скелетні міобласти, але для стійкого генерування міотубул необхідна присутність додаткових факторів (IL-4, SDF та ін.) [34]. При спільному культивуванні з міобластами від хворих на міодистрофію Дюшена ASCs здатні зливатися з ними та відновлювати експресію білка дистрофіну [339]. Пропонується використовувати трансплантацію гладком'язових клітин, спрямовано диференційованих з ASCs, для відновлення функції уретрального сфінктера при нетриманні сечі [124]. Показано, що через 2 та 4 тижні після введення ASCs в уретру кроликів мічені клітини проникли в підслизовий шар, а через 8 тижнів інтегрувалися до її стінки [76].

Перспективним є використання ASCs для регенерації нервової тканини завдяки більш вираженому, ніж у ММСК кісткового мозку, нейрогенному потенціалу. При культивуванні ASCs з нейротрофічним фактором головного мозку (brain-derived neurotrophic factor – BDNF), FGF-2 та EGF починають формуватися нейросфери [324]. Через 30 діб культивування в присутності BDNF і ретиноевої кислоти більш як половина клітин морфологічно, імунофенотипово і електрофізіологічно подібні до нейронів [115]. З ASCs отримані нестин-позитивні клітини, що експресують маркери Шваннівських клітин A2B5, GFAP, O4, P75, S100, Sox10, Krox-20, та можуть заселятись на мікропористу плівку для створення каркасу нерва [400].

Експериментальні дослідження вказують на можливість застосування ASCs для лікування ушкоджень головного, спинного мозку та нейродегенеративних захворювань. При трансплантації ASCs на моделі геморагічного інсульту в щурів довгостроково послаблюється неврологічний дефіцит та знижується атрофія мозку [103]. ASCs збільшують клітинну проліферацію та кількість судин, суттєво обмежуючи зону ішемічного інфаркту. Вважають, що це реалізується завдяки активації синтезу IL-8, SDF-1, фактора інгібування апоптозу Bcl-2, фактора фон Віллебранда та даблкортину, а також при пригніченні продукції IL-18 та проапоптотичних факторів Вах, каспази-3, toll-like рецептора TLR-4 [368]. У трансгенних мишей із хворобою Гентінгтона ASCs зменшують атрофію стріатум, але ступінь відновлення функцій залежить від часу їх введення [157]. Поліпшення моторних функцій у щурів з ушкодженням спинного мозку при внутрішньовенній трансплантації попередників олігодендроцитів з ASCs супроводжувалося їх міграцією в пошкоджену область та диференціюванням у нейрони та олігодендроцити [324]. У собак ASCs сприяють морфологічному та функціональному відновленню пошкоджень спинного мозку та експресують гліальні маркери GFAP, β -тубулін 3 та нейрофіламент NF160 [115].

Ще одним важливим напрямом є диференціювання ASCs в інсулін-продукуючі клітини. При трансплантації щурам з діабетом трансфіковані панкреатичним геном Pdx1 клітини продукують інсулін та С-пептид, знижуючи рівень глюкози та збільшуючи толерантність до неї, зменшуючи поліурію, покращуючи якість хутра та підвищуючи виживання тварин [114].

Заслугує уваги можливість гепатогенного диференціювання ASCs, які, порівнюючи з ММСК кісткового мозку, здатні довше культивуватися в гепатогенному напрямі для отримання більшої кількості клітин і краще при цьому виживають. При диференціюванні вони змінюють фібробластоподібну форму на полігональну та починають продукувати альбумін [129].

Під впливом фактора росту гепатоцитів (hepatocyte growth factor – HGF), а також FGF-1, FGF-4, онкостатину-М та дексаметазону ASCs людини набували фенотип гепатоцитів, вбудовувалися в пошкоджену тетрахлористим вуглецем паренхіму печінки мишей та відновлювали її функції. При внутрішньовенній трансплантації недиференційованих ASCs також знижувалися значення показників інтоксикації, але морфологічна структура органу не відновлювалася. Збільшення ефективності заселення пошкодженої печінки, зниження фіброзу та відновлення показників білкового обміну вдалося отримати при прекультивуванні ASCs з фактором FGF-2 [129].

Також показано, що спрямовано диференційовані в гепатогенному напрямі ASCs більш ефективні при внутрішньопортальному або внутрішньопечінковому введенні [150]. Окрім того, розроблено технології вирощування спрямовано диференційованих у гепатогенному напрямі ASCs у 3D культурах [408]. Зокрема, ASCs на пористому полілактид-гліколідному матриксі продукують альбумін і підтримують печінковий фенотип протягом 14 діб після імплантації гепатектомованим щурам [367].

Показано можливість диференціювання SVF у основні типи гемопоетичних клітин, що може стати частковою альтернативою ауто трансплантації кісткового мозку. Зокрема, при культивуванні SVF у спеціальному поживному середовищі можуть бути отримані колонії еритроїдного та мегакаріоцитарного ряду в кількості, достатній для підтримки гемопоезу після опромінення [414]. Недиференційовані ASCs також здатні секретувати VIII фактор зсідання крові, а при їх спрямованому диференціюванні в напрямі ендотеліоцитів можна отримати зростання секреції фактора втричі. Така методика комбінованої генно-клітинної терапії потенційно може бути використана при лікуванні гемофілії [37].

ASCs можуть диференціюватися *in vivo* в епітелій ниркових каналців на ранній стадії ішемічно-реперфузійного пошкодження нирок. В експериментальних дослідженнях внутрішньоартеріальне введення ASCs показало покращення функції нирок при гострій нирковій недостатності [219].

З новітніх підходів особливий інтерес привертає можливість перепрограмування ASCs для переведення їх у плюрипотентний стан. Показано, що ASCs, подібно до плюрипотентних клітин, експресують фактори транскрипції Oct-4, Sox-2 і Rex-1. Мабуть, саме це обумовлює такий широкий спектр можливостей їх спрямованого диференціювання [141]. З ASCs за допомогою 3 факторів транскрипції Oct-3/4, Sox2, і Klf4 отримані індуковані плюрипотентні клітини, що експресують ембріональні антигени (SSEA-3, SSEA-4, TRA-1-60, TRA-1-81, Oct3/4, Nanog, Sox2) і здатні до диференціювання в тканини всіх трьох зародкових листків. При цьому ASCs мають набагато більший, ніж у фібробластів, потенціал до іPS-індукції, що реалізується у безфідерних умовах [261].

Унікальні характеристики ASCs не обмежуються мультипотентністю і мають низку властивостей, які не лише активно досліджуються на фундаментальному рівні, але і знаходять своє застосування в клініці. На відміну від нативних клітин SVF, у культивованих ASCs зменшується експресія антигенів гістосумісності та виявляються імуносупресивні властивості, що може бути використано для лікування імунних порушень, а також зниження ризику відторгнення трансплантату. Оскільки в експерименті не виявлено зростання рівня Т-клітин проти алоантигенів у реципієнтів, алогенна трансплантація ASCs може стати актуальною в критичних випадках, наприклад, при неможливості швидкого отримання достатньої кількості аутологічного матеріалу.

ASCs експресують HLA I, але не II класу, підтримують ріст та розвиток гемопоетичних стовбурових клітин, не викликаючи проліферацію лімфоцитів при спільному культивуванні. Також вони здатні інгібувати проліферацію лімфоцитів у відповідь на фітогемаглютинін. Ці імуносупресивні ефекти виявляються не лише при безпосередньому контакті між клітинами, але й паракринно, завдяки синтезу простагландину E2 та пригнічення продукції прозапальних цитокінів [32].

Ключову роль в імуносупресивних властивостях ASCs відводять інтерферону гамма (IFN- γ), що стимулює у відповідь на прозапальні фактори синтез індоламін-2,3-діоксигенази [140]. Хоча ASCs експресують активні рецептори TLR2, TLR3 та TLR4, ліганди яких можуть посилювати остеогенне диференціювання, активація цих рецепторів не змінює імуносупресивні властивості ASCs [318]. Інфузія ASCs знижує тяжкість експериментального артриту завдяки пригніченню Th₁-опосередкованих аутоімунних запальних реакцій. При цьому запускається продукція протизапального IL-10 та антиген-специфічних CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ T_{reg}-лімфоцитів з імуносупресивною активністю [383]. ASCs також зменшують і Th-2-залежне запалення дихальних шляхів на моделях респіраторного дистрес-синдрому в мишей, знижуючи гіперреактивність бронхів, еозинофілію, продукцію слизу, рівні IL-4, IL-5, TGF- β 1 і підвищуючи при цьому кількість IFN- γ -продукуючих CD4-лімфоцитів у селезінці [166]. На моделях показано зниження запальних та аутоімунних проявів хвороби Крона при застосуванні ASCs людини [53]. Введення ASCs до початку аутоімунного енцефаломієліту та при хронічному його перебігу значно знижує тяжкість імунологічних порушень, зменшує запалення венул та демієлінізацію аксонів завдяки контролю рівня α 4-інтегринів [33]. Ще одним перспективним підходом є можливість використання ASCs як транспортера вірусів для лікування новоутворень. ASCs, інфіковані онколітичним вірусом міксоми, можуть доставляти його до клітин гліобластоми, сприяючи їх зараженню та загибелі [393].

Отже, обнадійливі результати досліджень регенеративного потенціалу ASCs на клітинних культурах *in vitro* та в експериментах на лабораторних тваринах дозволили обґрунтувати можливість їх подальших клінічних випробувань. Завдяки мультипотентному потенціалу диференціювання в спеціалізовані клітини різних типів та імуномодуючим властивостям, ASCs знаходять широке застосування в пластичній та реконструктивній хірургії м'яких тканин і опорно-рухового апарату, в усуненні наслідків ендотеліальної дисфункції при критичній ішемії кінцівок та цукровому діабеті, ішемічній хворобі серця, у лікуванні захворювань нервової системи, ендокринних порушеннях тощо [30, 235, 350].

Станом на 2023 рік у світі було офіційно зареєстровано понад 200 клінічних випробувань ASCs, хоча реальна кількість проєктів із застосування цих клітин із регенеративною метою набагато більша [73]. У 2004 р. компанією Cellerix (Іспанія) було розпочато перше клінічне випробування ефективності аутологічних ASCs з ліпоаспірату для нехірургічного лікування перианальних фістул, яке базувалось на успішному досвіді повного усунення 4 внутрішньошкірних фістул та позитивному ефекті при ректовагінальній нориці в пацієнтки з хворобою Крона. Згодом у 3 пацієнток було досягнуто повне закриття ректовагінальних нориць, а у випробування залучили і пацієнтів із фістулами, не асоційованими із хворобою Крона. Показано, що введення 20-40 млн. ASCs у комбінації з фібриновим клеєм ефективно в комплексному лікуванні цієї патології. До оцінки довготривалої ефективності клітинної терапії в таких пацієнтів було залучено 15 клінік [53]. Аналогічні дослідження для лікування ускладнень хвороби Крона клітинним препаратом ADIPOPLUS[®] розпочала компанія Anterogen (Корея). У 2010 році випробування перейшли у фазу II, а ефективність аутологічних ASCs додатково оцінювали при нетриманні калу. На сьогодні компанія пропонує препарат аутологічних ASCs Cupistem[®] для лікування нориць при хворобі Крона [69].

Одним з перших повідомлень про успішне використання ASCs при пошкодженні кісткової тканини була публікація Lencleckel S. та ін., що застосували закриття дефекту черепа в дитини за допомогою аутологічної клубової кістки, заселеної ASCs з фібриновим клеєм і біодеградуючим носієм [211]. В інших клінічних прикладах показано, що ASCs на кістковому трансплантаті ефективні при заміщенні дефектів верхньої та нижньої щелепи навіть при імплантації через 3 місяці після травми [208].

Ще у 2008 р. компанія Adistem (Гонконг) ініціювала I та II фази клінічних випробувань щодо застосування аутологічних клітин SVF при цукровому діабеті. У 34 пацієнтів з діабетом 1 типу через 3 місяці після внутрішньовенного введення клітин відзначали зниження рівня глюкози, глікозильованого гемоглобіну, тригліцеридів. Ускладнень терапії не виявлено, а позитивний ефект із підвищенням рівня С-пептиду зберігався в половини пацієнтів до 6 місяців спостереження.

У групі діабету 2 типу подібна технологія застосовувалася вже в кількох сотнях пацієнтів [198]. Компанія також заявляла про позитивний досвід застосування ASCs у терапії із зменшення проявів старіння (130 пацієнтів), при хронічній нирковій недостатності (32 пацієнти) і навіть при хворобі Паркінсона.

У Медичному центрі ветеранів у Вашингтоні (США) досліджували роль ін'єкцій ліпоаспірату для лікування діабетичних ран кінцівок та виразок при венозній недостатності. Клінічне випробування з 2009 по 2012 рр. в шпиталі Тулузи (Франція) продемонструвало доцільність та безпеку внутрішньом'язового введення аутологічних ASCs при критичній ішемії кінцівок, що підтверджено покращенням загоєння трофічних виразок [51]. Мета-аналіз підтвердив ефективність і безпеку аутологічної трансплантації жирової тканини для заповнення дефектів м'яких тканин, пов'язаних з фіброзом і рубцями після променевої терапії [177]. У Kanazawa University (Японія) проведено дослідження з використання ASCs для регенерації печінки при цирозі [300]. Імуносупресивні властивості ASCs підтвержені декількома клінічними прикладами ефективного лікування важких форм хвороби "трансплантат проти хазяїна" з використанням як аутологічних, так і аlogenних клітин. Показано зменшення симптомів ниркової та печінкової недостатності, а також відсутність побічних дій при спостереженні від 13 до 40 місяців навіть у пацієнтів з повторним введенням клітин [150]. Також встановлено, що ASCs реалізують протизапальний та нейропротекторний ефект, зменшуючи прояви реактивного гліюзу при пошкодженнях нервової тканини *in vitro* та *in vivo*. При трансплантації SVF хворим на розсіяний склероз показана тривала позитивна динаміка завдяки ремієлінізації нервових волокон [289].

Загалом, ASCs розглядають як доступний та перспективний інструмент для потреб регенеративної медицини завдяки їхньому високому проліферативному та диференціювальному потенціалу, що був продемонстрований в численних дослідженнях. Проте, залишається нерозв'язаною низка питань що стосується особливостей реалізації їхнього регенеративного потенціалу в умовах необхідності стандартизації методів виділення, нарощування, характеристики та застосування ASCs на доклінічному та клінічному рівні.

1.3 Ендотеліальні прогеніторні клітини

В патогенезі серцево-судинних захворювань чільне місце відводять порушенням функцій ендотелію, як основної мішені ендогенних та екзогенних факторів агресії. Останнім часом ендотеліальну дисфункцію, що супроводжує ішемічне пошкодження тканин, все частіше пов'язують з порушенням відновлювальних процесів на рівні тканинспецифічних стовбурових та клітин-попередників з ендотеліальним потенціалом. В нормі ендотеліальна вистилка судин регулює місцеві процеси гемостазу, проліферації, міграції клітин крові в тканини і судинний тонус. У клітинах ендотелію синтезується значна частина факторів гемостазу, а з іншого боку, ендотелій надає свою поверхню для багатьох патофізіологічних процесів на тканинному рівні. Ендотелієм синтезуються тканинний активатор плазміногену, інгібітор тканинного активатора плазміногену, тромбомодулін, рецептори плазміну та активаторів плазміногену. Активна роль ендотеліальної вистилки судин полягає також у синтезі молекул клітинної адгезії, які розпізнаючи специфічні місця зв'язування на лейкоцитах, спрямовують їх у субендотеліальний шар. На цей час для ендотелію описані сигнальні селектини типу Р і Е, імуноглобулін-подібні молекули і деякі представники родини інтегринів [92].

Під впливом асоційованих з віком пошкоджуючих факторів, якими можуть бути гемодинамічне перевантаження, гіпоксія, запальні медіатори, імунні комплекси, токсичні сполуки тощо, ендотелій зазнає пошкодження, що спричинює компенсаторну активацію ендотеліоцитів для забезпечення своїх функцій [187]. Зокрема, дедалі більше дослідників вказують на те, що в патогенезі атеросклерозу не останню роль відіграють запальні реакції на рівні ендотелію через порушену міграцію моноцитів. Показано, що на ендотеліальній мембрані частина молекул адгезії з'являється після активації ендотеліоцита. Активуючим вироблення адгезивних молекул стимулом можуть слугувати фактори ризику атеросклерозу, наприклад, гіперхолестеринемія. Істотну роль в активації ендотеліоцитів можуть відігравати компоненти системи комплементу. Дія "атакуючого мембрани комплексу" – кінцевого продукту каскаду активації системи комплементу на ендотелій – викликає секрецію інтерлейкіну 8, білка хемотаксису

моноцитів-1, експресію адгезивних молекул (P- і E-селектину) та секрецію фактора фон Віллебранта. З часом локальні компенсаторні механізми виснажуються і у відповідь на фізіологічний стимул виникає спотворена патологічна реакція, що проявляється вазоконстрикцією, тромбоутворенням, проліферацією клітин, запаленням, підвищенням проникності судинної стінки з відповідними клінічними симптомами [28].

Дисфункція ендотелію є провідною складовою в патогенезі багатьох серцево-судинних захворювань. Зокрема, критична ішемія кінцівок належить до стану, спричиненого хронічним ішемічним ушкодженням ніг, що характеризується болем у спокої, виразками або гангrenoю, пов'язаною із захворюванням периферичних артерій. Захворюваність на ішемію кінцівок становить у різних країнах від 500 до 1000 на мільйон населення, з найвищими показниками серед людей похилого віку, курців і діабетиків [31, 127]. За оцінками, понад 200 мільйонів людей в усьому світі мають захворювання периферичних артерій зі спектром симптомів від їх відсутності до важких [319]. Ризик великої ампутації та серцево-судинних подій становить щонайменше 30-50 % протягом першого року в пацієнтів із ішемією кінцівок, які не отримують традиційної реваскуляризації [39]. Як наслідок, для підвищення ефективності лікування пацієнтів часто потрібен мультидисциплінарний підхід із залученням спеціалістів із ендovasкулярної реваскуляризації, відкритої хірургічної реваскуляризації, подіатрії, лікування ран та інших спеціальностей [170]. У патогенезі цього захворювання основну роль відіграє саме дисфункція ендотелію, яка є результатом ендогенних та екзогенних патологічних впливів. Ендотеліальна дисфункція, що супроводжує ішемічне пошкодження тканин і органів, насамперед, пов'язана з порушенням регенерації, яка залежить від циркулюючих і тканиноспецифічних ендотеліальних прогеніторів [152].

Враховуючи, що в разі критичної ішемії кінцівок ключовим є порушення трофіки тканин на рівні судин, клітинна терапія може бути корисною завдяки проангіогенним ефектам стовбурових клітин різного типу. Мононуклеарні клітини периферичної крові або кісткового мозку, мезенхімальні стовбурові клітини або маркерно-специфічні субпопуляції клітин з ангіогенними

властивостями можуть бути перспективними для пацієнтів із ішемічним пошкодженням тканин [39, 230]. Трансплантовані клітини можуть реалізовувати корисні терапевтичні ефекти через посилення локального ангіогенезу завдяки диференціюванню ендотеліальних клітин-попередників та секреції проангіогенних медіаторів, або ж через трансдукцію цитопротекторних сигналів, які зберігають структуру тканини [108].

Вперше ендотеліальні клітини-попередники (endothelial progenitor cells – EPCs) із циркулюючої крові виділив Asahara T. у 1997 р. [62]. Пізніше EPCs з фенотипом $CD133^+CD309^+$ та ендотеліальним потенціалом було виділено з кісткового мозку. Проте дедалі більше доказів свідчить про те, що існують додаткові популяції клітин кісткового мозку (наприклад, міелоїдні клітини, клітини "бічної популяції" та мезенхімальні стромальні прогенітори) і клітини, що не походять з кісткового мозку, які також можуть давати початок ендотелію [356]. Враховуючи, що відсоток EPCs від усіх циркулюючих мононуклеарних клітин досить незначний, а потенціал їх ендотеліального диференціювання підтверджено лише *in vitro*, пошук інших джерел ендотеліальних прогеніторів є досить актуальним.

Зокрема, Li Z. та ін. продемонстрували, що структурна цілісність ендотелію серця дорослої людини після інфаркту міокарда зберігалася через клональну проліферацію резидентними EPCs у прикордонній області інфаркту без значного внеску клітин кісткового мозку або переходу ендотелію в мезенхіму [221]. EPCs мікросудинного походження також можна виділити з легень, мозку, печінки, жирової тканини та плаценти [301]. Найбільш доступним і поширеним методом є виділення ендотеліальних клітин із великих судин (аорта, пуповинна вена), що дозволяє отримати чисту популяцію EPCs, позбавлену інших типів клітин [364].

На сьогодні виділяють три ключові типи ендотеліальних клітин, які залучені в процесі регенерації судин. Резидентні судинні ендотеліальні стовбурові клітини (vascular endothelial stem cells) мають фенотип $Lin^+CD31^+CD105^+Sca-1^+CD117^+$ та відіграють основну роль у регенерації судинної стінки при пошкодженні. Циркулюючі ендотеліальні прогеніторні клітини (circulating endothelial progenitor cells) походять з кісткового мозку та мають фенотип $CD34^{bright}CD133^+CD45^{dim}CD31^+$. Серед них

виділяють субпопуляції ранніх ($CD34^+CD133^+KDR^+$), проміжних ($CD34^+CD133^+KDR^+$) та пізніх прогеніторів ($CD34^+CD133^-KDR^+$). У відповідь на сигнали пошкодження вони здатні до міграції, проліферації та диференціювання і в здорових осіб присутні в крові в незначних кількостях (0,02-0,001 %), як маркер потенціалу репарації ендотелію. Їх вміст зменшується з віком, при прогресуванні ендотеліальної дисфункції, але зростає на ранніх стадіях ішемічного пошкодження та пухлинного росту. Нарешті, циркулюючі ендотеліальні клітини (circulating endothelial cells) з фенотипом $CD31^{bright}CD34^{dim}CD146^+CD133^-CD45^-$ є зрілим десквамованим ендотелієм, який відіграє роль маркера пошкодження судин. Їх вміст корелює з прогресуванням ендотеліальної дисфункції, запаленням та суттєво зростає при гострому інфаркті, ендотоксемії, пухлинах, вірусній інфекції тощо (0,1-6,0 %) [62].

Проте, зменшення загальної кількості циркулюючих прогеніторів у людей похилого віку, етичні і медичні обмеження в заборі донорських великих судин та необхідність тривалого нарощування достатньої терапевтичної дози клітинного препарату обмежують перспективи широкого клінічного застосування цього типу клітин у пацієнтів із захворюваннями серцево-судинної системи. Саме тому актуальним може бути спрямоване диференціювання в ендотеліальному напрямі соматичних мультипотентних стовбурових клітин різного типу. Зокрема, у численних дослідженнях підтверджено можливість ендотеліального диференціювання для ММСК з жирової тканини. Диференціювання ASCs в ендотеліоцити досягається за допомогою аскорбінової кислоти, гідрокортизону, гепарину, EGF, VEGF, FGF-2 та інших факторів. Клітини починають експресувати маркери CD31, вазоендотеліальний кадгерин, фактор Віллебранда, NO-синтазу [58, 153]. Диференціювання клітин SVF в ендотеліальному напрямі стимулюється також додаванням сироватки та блокуванням адипогенних факторів [37]. Показано, що ендотеліоцити з SVF секретують розчинний адипогенний фактор, який посилює проліферацію преадипоцитів. Можливо, порушення його секреції в організмі може бути однією з причин ожиріння. Водночас, адипогенне диференціювання ASCs у культурі покращує та підтримує виживання ендотеліальних клітин завдяки посиленню експресії судинного ендотеліального фактора росту та ангіопоетинів [295].

Експериментальні дослідження на щурах показали, що трансплантація циркулюючих CD34-позитивних ендотеліальних прогеніторів стимулює неоваскуляризацію і ремоделювання пошкодженого міокарда при інфаркті. Збільшення щільності капілярів сприяє зменшенню дилатації лівого шлуночка і збереженню скоротливості серця. Трансплантація ендотеліальних клітин-попередників на пористому каркасі з молочної та гліколевої кислот (PLGA) створює мікросередовище для регенерації гіалінового хряща в кроликів [363].

Після отримання позитивних ефектів на тваринах, у клінічних дослідженнях продемонстровано підвищення скоротливої здатності міокарда та показників виживання реципієнтів, що пов'язують з покращенням васкуляризації ішемізованого міокарда завдяки активації ендогенних ендотеліальних прогеніторів. 59 пацієнтів з гострим інфарктом міокарда були залучені в рандомізоване клінічне дослідження TOPCARE-AMI, результати якого продемонстрували безпеку інтракоронарного введення циркулюючих прогеніторів крові. З клінічних ефектів від 1 до 5 років спостереження відмічено значне покращення функцій лівого шлуночка, зниження рівнів NT-proBNP, зменшення кінцево-систоличного об'єму, що свідчить про позитивний вплив клітин на процеси ремоделювання серця після інфаркту [210]. У кардіохірургії запропоновано методики покриття ендovasкулярних стентів ростовими факторами, які активують міграцію ендотеліоцитів, або навіть самими ендотеліальними клітинами-попередниками, що попереджує стенозування судинних протезів [348].

Ендотеліальні прогенітори знаходять своє застосування і в лікуванні критичної ішемії кінцівок, порушень трофіки шкіри та при інших станах, де провідну роль відіграє ендотеліальна дисфункція на мікроциркуляторному рівні. В експерименті на мишах локальне введення ASCs в ішемізовану м'язову тканину сприяло збільшенню перфузії крові через 3 тижні. Також зросла кількість циркулюючих ендотеліальних клітин. Цей ефект блокується при введенні антитіл проти фактора стромальних клітин – SDF-1, що, можливо, є ключовим в ASCs-опосередкованому ангиогенезі [239]. При критичній ішемії кінцівки мишей внутрішньом'язове введення ASCs людини з фактором росту FGF-2 на

наносферах підвищує виживання тканин, перфузію крові, продукцію VEGF. Більшість клітин не інтегруються в судини, що свідчить про паракринний механізм регенерації. Показано також здатність ASCs реендотелізувати та покращувати судинну реактивність на моделі пошкодження сонних артерій та сприяти приживленню клаптя тканини на судинній ніжці. При введенні ASCs у кавернозні тіла в щурів завдяки диференціюванню *in vivo* в ендотелій та гладком'язові клітини покращується еректильна функція [39].

Ендотеліальний потенціал стовбурових клітин різних типів використовують і для регенерації шкіри. В експерименті на мишах вони здатні викликати епітелізацію та неоангіогенез при ранах та пострадіаційному фіброзі шкіри, покращуючи перфузію тканин та щільність мережі капілярів. Припускають, що прискорене загоєння шкіри, зменшення келоїдних рубців та зморшок відбувається завдяки активації ендогенних фібробластів та ендотеліоцитів за допомогою паракринного механізму (продукція VEGF, TGF- β , антиоксидантів) [346]. Кондиційне середовище з ASCs стимулює також регенерацію волосся в мишей завдяки стимуляції проліферації клітин дермального сосочка фолікула та кератиноцитів. Однак, при трансплантації живих ASCs у рани шкіри значення показників загоєння та капілярної щільності були вищими, ніж при ін'єкції екстракту клітин [346]. При цьому вважається, що культивовані в тривимірних агрегатах клітини продукують більше білків позаклітинного матриксу (тенасцин-С, колаген VI типу, фібронектин, фактор росту гепатоцитів HGF) і дають швидше загоєння діабетичних ран, ніж клітини з моношару, що застосовуються в суспензії [176].

Загалом, розробка нових технологій виділення та нарощування соматичних стовбурових і прогеніторних клітин з ендотеліальним потенціалом є одним з актуальних завдань сучасної регенеративної медицини, насамперед, для лікування серцево-судинних захворювань. Проте, більш детального з'ясування та стандартизації потребують критерії якості та відповідності ендотеліальних клітин-попередників або спрямовано диференційованих в ендотеліальному напрямі соматичних мультипотентних стовбурових клітин різного генезу.

1.4 Стовбурові клітини плаценти

За останнє десятиріччя у світі різко зросла кількість кріобанків пуповинної крові та плаценти, що пояснюється активним інтересом дослідників та клініцистів до цих джерел стовбурових клітин. Вказані тканини, які отримують після пологів без шкоди для здоров'я новонародженого та породіллі, містять популяції гемопоетичних та мезенхімальних прогеніторів з високим регенеративним потенціалом. З огляду на пов'язані з станом пацієнта протипокази до забору матеріалу та необхідність якомога більш раннього початку терапії, виникає об'єктивна потреба в готовому до застосування клітинному препараті, який не потребує часу для нарощування.

Стовбурові клітини плаценти стають перспективними кандидатами для регенеративної терапії багатьох захворювань, оскільки можуть бути виділені в значних кількостях, легко нарощені до необхідної терапевтичної дози та кріоконсервовані для тривалого зберігання і подальшого застосування за потреби, а також характеризуються високим потенціалом мультипотентного диференціювання та низькою імуногенністю. Враховуючи їхні додаткові протизапальні та антифібротичні ефекти, ММСК плаценти розглядають як унікальне джерело цитокінів та ростових факторів, здатних зменшувати наслідки ішемічного пошкодження тканин [373].

Важливо зазначити, що застосування ММСК з плаценти дозволяє уникнути морально-етичним обмеженням для фетальних стовбурових клітин. Водночас, вони можуть безпечно застосовуватись як в аутологічному, так і алогенному варіанті без загрозливих реакції "трансплантат проти хазяїна".

Плацента людини містить популяції різних типів стовбурових клітин, а саме мезенхімальних стромальних клітин, прогеніторних клітин трофобласта, гемопоетичних стовбурових клітин та ендотеліальних клітин-попередників. Можна виділити чотири ділянки фетальної плаценти: амніотична епітеліальна, амніотична мезенхімальна, хоріональна мезенхімальна і хоріональна трофобластична. З цих тканин можуть бути виділені, відповідно, такі популяції клітин: амніотичні епітеліальні клітини, амніотичні мезенхімальні стромальні

клітини, мезенхімальні стромальні клітини хоріона і трофобластні клітини хоріона [265]. При цьому важливим аспектом має бути досягнення чистоти та однорідності цільової культури за морфологічними, імунофенотипічними та функціональними параметрами.

Для отримання первинної культури клітин оболонки плода підлягають ферментативній обробці за різними протоколами, які відрізняються між собою, за типом використаних ферментів, їхньою концентрацією та тривалістю інкубації. Зазвичай, використовують трипсин, колагеназу, диспазу. Отриману суспензію клітин висівають у культуральний посуд у поживному середовищі (RPMI-1640, DMEM, DMEM/F12, MEM- α) з додаванням 10-20 % фетальної сироватки. Додатково середовище збагачують незамінними амінокислотами, L-глутаміном, β -меркаптоетанолом, піруватом натрію та антибіотиками. Культури вирощують в умовах CO₂-інкубатора, проводячи субкультивування при досягненні конфлюентності моношару.

Тобто, технологія вирощування ММСК плаценти є типовою, як і для ММСК з інших джерел, та не потребує особливих умов, дороговартісних ростових факторів або додаткового обладнання [265]. При цьому важливо, що ММСК плаценти навіть на 30-му пасажі демонструють високі показники поділу клітин, зберігаючи стабільний каріотип, у той час як інші ММСК активно проліферують лише до 8-10 пасажу [297].

При імунофенотипуванні ММСК плаценти характеризуються експресією типових мезенхімальних маркерів CD29, CD73, CD90, CD105, CD166 та ін. При цьому вони не експресують CD11b, CD31, CD34 та CD45. Клітини цього типу позитивні на людський лейкоцитарний антиген (HLA) класу А, В, С і негативні за HLA-DR, -DP, -DQ [265].

В останні роки встановлено, що з тканин плацентарного хоріону та амніону можна отримати ММСК та мультипотентні клітини цитотрофобласта, що характеризуються високим рівнем експресії маркерів ембріональних стовбурових клітин (Oct-3/4, Nanog, SSEA-4 та лужна фосфатаза).

Остеопонтин, який експресується в клітинах цитотрофобласта плаценти людини, спільно з карцинома-ембріональним антигеном (САМ-1) відіграє важливу роль у регулюванні інвазивності ворсинок хоріона. PPAR- γ в гетеродимерному комплексі з ретиноїд-Х-рецептором альфа (RXR- α) продукується в позаворсинчатому трофобласті та бере участь у регуляції його інвазивності. При дії агоністів PPAR- γ і RXR- α спостерігається інгібування інвазії цитотрофобласту *in vitro*. ММСК плаценти експресують гени ембріональних стовбурових клітин *nkx2-5* та *ost-4*, а також серцевий транскрипційний фактор GATA-4 та білки скорочувальної системи MLC-2 α і cTnT.

На відміну від інших ММСК, у клітинах з амніотичної мембрани виявляють експресію молекул адгезії нейральних клітин (polysialylated-neural cell adhesion molecule – PSA-NCAM), Musashi-1, віментин та нестін [265]. На підставі аналізу експресії перицитних маркерів CD146 і NG2 висунуто гіпотезу про периваскулярне походження фетальних плацентарних ММСК [359]. Крім того, судинне походження ММСК із базальної децидуальної оболонки було підтверджено Kusuma G. та ін. за наявністю мезенхімальних маркерів 3G5, STRO-1, FZD-9 (frizzled class receptor 9) та альфа-актину гладких м'язів (alpha smooth muscle actin – α SMA) навколо судин *decidua basalis* [188].

Клітини, виділені з різних шарів плаценти, демонструють різну пластичність. Самооновлення та "ієрархія", які зазвичай вважаються ознакою стовбурових клітин, не були чітко продемонстровані для різних типів клітин плаценти, і тому термін "стовбурові клітини" для них не завжди підходить. Гіпотеза про те, що всі ММСК, незалежно від їхнього походження, ідентичні за своєю якістю та функціями, ігнорує їхні відмінності в біології та потенційному терапевтичному застосуванні, які неможливо визначити та охарактеризувати за допомогою сучасних методів *in vitro*. Проте, варто згадати, що останні рекомендації пропонують альтернативну концепцію стовбурових клітин, згідно з якою пластичність є важливою для визначення стовбуровості, а самооновлення та ієрархія є необов'язковими характеристиками [373].

Стовбурові клітини з плаценти знаходять широке застосування в доклінічних дослідженнях ефективності клітинної терапії при різноманітній патології. Зокрема, вони демонструють нейропротекторні властивості в лабораторних тварин із змодельованим інсультом, суттєво підвищуючи рівні VEGF, HGF та нейротрофічного фактора мозку (brain-derived neurotrophic factor – BDNF) в ішемізованому мозку [38]. Також ММСК плаценти при трансплантації мишам із моделлю хвороби Альцгеймера модулюють властивості мікрогліальних клітин у бік протизапальної відповіді, що зменшує розмір бляшок β -амілоїду. При цьому зростає активність ферментів, що розкладають β -амілоїд, знижуються рівні прозапальних цитокінів та підвищуються протизапальних (TGF- β та IL-10), покращується функція пам'яті [169].

Протизапальні та антифібротичні ефекти ММСК плаценти знаходять своє застосування і в лікуванні фіброзу легень, респіраторного дистрес-синдрому, критичної ішемії кінцівок. Завдяки потенціалу до спрямованого диференціювання в гепатоцити, інсулін-продукуючі клітини, міоцити ММСК плаценти також продемонстрували позитивні терапевтичні ефекти на моделях пошкодження печінки, цукрового діабету та м'язової дистрофії Дюшена, підвищуючи рівень аутофагії в гепатоцитах, відновлюючи нормоглікемію та експресуючи дистрофін, відповідно [265].

Було показано, що трансплантація ММСК плаценти новонародженим мишам з недосконалим остеогенезом зменшувала частоту переломів, покращувала пластичність та структуру кісткової тканини, збільшувала кількість гіпертрофованих хондроцитів і посилювала регуляцію ендогенних генів, залучених до ендохондральної та внутрішньомембранної осифікації [164].

Зареєстровано декілька клінічних випробувань із застосуванням ММСК плаценти при багатьох захворюваннях, зокрема й ішемічного генезу, де клітини вводять внутрішньовенно або внутрішньом'язово в різних дозах [61, 73]. Зокрема, ММСК плаценти також знаходять успішне застосування для корекції патології серця, що більш детально розглянуто в наступному підрозділі.

1.5 Стовбурові клітини в регенерації міокарда

Перспективи клітинної терапії для лікування багатьох важких соціально значущих хвороб привертають увагу дослідників та лікарів у всьому світі. Відомо, що захворювання серцево-судинної системи посідають провідні місця за показниками інвалідизації та смертності серед працездатного населення, а в останні роки вони все частіше уражують людей молодшого віку, що обумовлює ще більш ранню втрату працездатності. Зокрема, патологія серця і судин ішемічного генезу є причиною 17,3 мільйонів смертей за рік у світі [31, 121]. Прямі та непрямі витрати на лікування таких пацієнтів лише в США становлять більше 320 млрд. дол. США щороку, а до 2030 року прогнозують їх зростання до понад 800 млрд. дол. США [120]. В Україні десятки тисяч пацієнтів з ішемічною хворобою серця, кардіоміопатіями, інсультом потребують більш ефективних методів терапії.

За останні роки вже кілька тисяч пацієнтів у всьому світі були залучені в клінічні випробування з оцінки ефективності клітинної терапії при різних серцево-судинних захворюваннях [42]. Накопичені дані свідчать про її безпеку та ефективність не лише в дорослих пацієнтів з ішемічною хворобою серця, кардіоміопатіями різної етіології, хронічною серцевою недостатністю, а й навіть у дітей з вродженими вадами серця [104, 105, 158]. Паралельно з вже існуючими дослідженнями на людях, експерименти на тваринах із моделюванням пошкодження міокарда продовжують відігравати вирішальне значення для детальної характеристики стовбурових клітин, демонстрації їхніх біологічних ефектів та прогнозування важливих клінічних результатів. Дослідження з трансплантації клітин людини тваринам переважно обмежені експериментами на генетично модифікованих гризунах, які можуть підтримувати толерантність до ксенотрансплантату. Великим піддослідним тваринам, наприклад свиням, можна провести розширені функціональні інструментальні обстеження, що сприяє отриманню більш достовірних і клінічно значущих висновків про регенеративний потенціал стовбурових клітин. При цьому можливі реакції відторгнення з боку реципієнта попереджують введенням імуносупресантів [185].

Проте, не зважаючи на велику кількість досліджень впливу клітин різних типів на перебіг захворювань серця, на сьогодні дослідники та клініцисти ще остаточно не визначились з рекомендаціями щодо оптимального джерела для клітинної терапії цих захворювань. У світлі етичних проблем, пов'язаних з використанням ембріональних і фетальних стовбурових клітин, та недостатньою ефективністю технологій отримання індукованих плюрипотентних клітин, доступними джерелами стовбурових клітин дорослого організму для регенерації міокарда можуть слугувати кістковий мозок, периферична кров, жирова тканина, скелетні м'язи, пуповинна кров, плацента і сам міокард.

Дослідження із трансплантації стовбурових клітин для лікування серцевої недостатності були розпочаті зі скелетних міобластів. Поперечносмугасті м'язи містять незрілі клітини-сателіти та міобласти, які мають здатність відновлювати м'язову тканину після пошкодження. Ці клітини-супутники здатні до проліферації і сприяють регенерації за допомогою диференціювання в міотубули і нові м'язові волокна. Перевагами скелетних міобластів є їх аутологічне походження і здатність швидко рости в культурі. Диференціювання незрілих міобластів у клітини, подібні до кардіоміоцитів, була продемонстрована в дослідженнях на собаках. Подальші доклінічні випробування показали, що трансплантація скелетних міобластів покращує функцію серця після змодельованого інфаркту міокарда в щурів. Хоча на тваринних моделях і було продемонстровано здатність трансплантованих клітин до відповіді на електричні стимули в пошкодженому міокарді, але при цьому вони не експресували кардіоспецифічний маркер важких ланцюгів міозину-альфа. Також на собаках було показано, що інтеграція скелетних міобластів у непошкоджених відділах міокарда спричинює розвиток аритмій. Проаритмогенний ефект після трансплантації скелетних міобластів може бути пов'язаний з втратою ними експресії connexin-43, що призводить до недостатньої електричної інтеграції з міокардом хазяїна. Інші дослідники, виявивши в експерименті на свинях зростання рівнів тропоніну-I та інтерлейкіну-6 після трансплантації скелетних міобластів, припускають, що їхній проаритмогенний потенціал опосередкований локальним запаленням у відповідь на трансплантат [341].

У 2001 р. вперше була виконана трансплантація скелетних міобластів 72-річному пацієнту з інфарктом міокарда і згодом такі дослідження на невеликій вибірці хворих продемонстрували покращення функцій серця. Пізніше проведено багатоцентрове рандомізоване плацебо-контрольоване подвійне сліпе клінічне випробування MAGIC, яке передбачало найбільш повну клінічну оцінку ефективності скелетних міобластів. Проте, його результати показали, що жодні показники ні регіональних, ні глобальних функцій лівого шлуночка, оцінені за даними ехокардіографії, значно не покращились. Крім того, у реципієнтів підтвердилась тенденція до більшого ризику аритмій [227, 245]. Загалом, ці дослідження вказують на те, що скелетні міобласти не можуть бути оптимальним джерелом клітин для регенерації серця.

Кістковий мозок містить різні субпопуляції гемопоетичних і мезенхімальних стовбурових та прогеніторних клітин. Вони складають до 2 % від загального вмісту і мають здатність диференціюватися в різні спеціалізовані фенотипи. Фракція мононуклеарних клітин кісткового мозку (bone marrow mononuclear cells – BM-MNCs) може бути виділена за допомогою центрифугування на градієнті щільності та не потребує складних технологій культивування. Завдяки цьому BM-MNCs отримали широке застосування в експериментах на тваринах. Для BM-MNCs був продемонстрований потенціал міогенного диференціювання в мишей. Інша група встановила, що BM-MNCs секретують проангіогенні цитокіни та індують проліферацію ендотеліальних прогеніторів у свиней з інфарктом міокарда [243].

У 2002 році було проведено перше клінічне дослідження ефективності інтракоронарної інфузії аутологічних BM-MNCs у хворих з гострим інфарктом міокарда. Хоча в подальших дослідженнях TOPCARE-AMI, BOOST, REPAIR-AMI, TIME, LateTIME з використанням BM-MNCs і було продемонстровано позитивні впливи їх трансплантації на окремі функції серця, загальна клінічна ефективність фракції мононуклеарних клітин кісткового мозку при гострому інфаркті міокарда залишається суперечливою [56].

Особливу увагу привертають мультипотентні мезенхімальні стромальні клітини кісткового мозку (bone marrow-derived multipotent mesenchymal stromal cells – BM-MMSCs). Трансплантація кістковомозкових ММСК людини на моделі інфаркту міокарда в щурів показала покращення функції лівого шлуночка [267]. Інтраміокардіальне введення в експерименті на великих тваринах продемонструвало безпеку цих клітин та процедури їх введення, активацію зворотного ремоделювання міокарда, покращення регіональної скоротливості шлуночків та зменшення постінфарктних рубців [23, 243]. Було запропоновано кілька можливих механізмів реалізації терапевтичного ефекту ММСК: приживлення і диференціювання у функціональні кардіоміоцити, паракринна сигналізація завдяки численним ростовим факторам, стимуляція проліферації ендогенних прогеніторів серця або регуляція ніш. При цьому кращі ефекти очікують від застосування при захворюваннях серця культивованих ММСК, на що вказує зростання кількості клінічних випробувань з ними.

Вперше безпеку та позитивний вплив ММСК кісткового мозку на скоротливу здатність лівого шлуночка в пацієнтів з інфарктом міокарда було продемонстровано в 2004 р. Подальші дослідження підтвердили перспективність цього типу клітин для комплексної терапії гострої та хронічної ішемічної хвороби серця [161]. Зокрема, інтраміокардіальне введення аутологічних ММСК кісткового мозку при ішемічній хворобі серця з серцевою недостатністю як у ранні, так і у віддалені строки (12 міс.) продемонструвало в пацієнтів збільшення максимального метаболічного еквіваленту, зниження класу серцевої недостатності, зменшення частоти нападів стенокардії, зменшення необхідної дози нітрогліцерину. Також продемонстровано покращення показників якості життя та збільшення толерантності до фізичного навантаження [133]. Як і для аутологічних, так і для алогенних ММСК продемонстровано не лише безпеку трансплантації, а й достатній терапевтичний потенціал за зменшенням епізодів шлуночкової тахікардії, зростанням фракції викиду лівого шлуночка, запобіганням його ремоделюванню, а також покращенням функції легень за показниками об'єму форсованого видиху [134].

Численні експерименти *in vitro* та *in vivo* продемонстрували, що з жирової тканини можуть бути виділені мультипотентні стовбурові клітини, здатні диференціюватися в кардіоміоцити, що спонукало активні дослідження їхнього регенеративного потенціалу на тваринних моделях патології серцево-судинної системи. До кардіоміогенного диференціювання більш схильні $Scal^+$ і $c-kit^+$ клітини з SVF, що утворюють у 8 разів більше скоротливих колоній [23]. ASCs, що експресують CD133, при спільному культивуванні з клітинами кісткового мозку або кордової крові також можуть диференціюватись у кардіоміоцити. Посилена експресія кардіоспецифічних маркерів поряд із підвищенням життєздатності клітин та синтезу білка вдалося отримати при трансфекції в культуру ASCs гена інсуліноподібного фактора росту I (insulin-like growth factor – IGF-I) [251].

На моделі інфаркту в щурів показано збільшення фракції викиду лівого шлуночка, потовщення його стінки, щільності капілярів у зоні інфаркту завдяки продукції кардіопротективних факторів VEGF, HGF, IGF-I, проте лише 0,5 % трансплантованих клітин позитивно забарвлювались на специфічні для міокарда фібрилярні білки [365]. ASCs при інтракоронарному введенні у свиней також зменшують пошкодження міокарда, збільшують фракцію викиду лівого шлуночка та щільність судин [204]. На моделі дилатаційної кардіоміопатії в щурів трансплантація ASCs, окрім підвищення фракції викиду, також запобігала дилатаційному ремоделюванню шлуночків та ефективно покращувала систолічну і діастолічну функцію серця [217]. При цьому комбіноване введення ASCs із силденафілом на моделі дилатаційної кардіоміопатії є більш ефективним, ніж монотерапія. У цьому випадку в ішемізованій тканині посилюється ангіогенез, експресія IL-10, антиапоптотичного Bcl-2, знижується продукція маркерів апоптозу металопротейнази-9, Вах, каспази-3 [322]. ASCs, спрямовано диференційовані в кардіоміоцити, зменшують ремоделювання міокарда при інфаркті, стабілізують фракцію викиду, сприяють неоваскуляризації ішемізованої ділянки [381].

Було оцінено доклінічну ефективність застосування при ішемічній хворобі серця ММСК жирової тканини людини та диференційованих з них кардіоміобластоподібних клітин. За даними ехокардіографії через 4 тижні після інтракоронарної трансплантації клітин відмічено покращення рухливості стінки міокарда. При цьому в контрольній групі показник погіршувався протягом усього часу дослідження до 12 тижня. У ранній період після трансплантації не спостерігали достовірних відмінностей у діастолічних розмірах лівого шлуночка, проте згодом діастолічна дисфункція прогресувала в контрольній групі, у той час як після трансплантації клітин цей показник істотно не змінювався [262, 320].

Можливість та безпека клінічного застосування ASCs була оцінена в багатоцентрових рандомізованих плацебо-контрольованих дослідженнях у пацієнтів з гострим інфарктом міокарда (APOLLO), хронічною серцевою недостатністю (PRECISE). Загалом, продемонстровано зростання фракції викиду лівого шлуночка, покращення перфузії міокарда та зменшення розміру інфарктного рубця як у ранні (6 міс), так і у віддалені (до 3 років) строки після трансплантації клітин [50, 149, 278]. Проведене в 2013-2014 рр. проспективне рандомізоване "подвійне сліпе" клінічне дослідження Athena з оцінки терапевтичного потенціалу ASCs при ішемічній кардіоміопатії продемонструвало збільшення максимального поглинання кисню та достовірне покращення якості життя пацієнтів за результатами Minnesota Living With Heart Failure Questionnaire (MLHFQ) через 12 міс. після інтраміокардіальної трансплантації ASCs [142].

В патогенезі зниження скоротливої здатності міокарда при ішемічній хворобі серця суттєву роль відіграє дисфункція резидентних прогеніторів, тому підходи з виділення, нарощування та застосування саме тканиноспецифічних стовбурових клітин серця (CSCs) вважають найбільш перспективними [212, 385]. В дорослому серці CSCs знаходяться в нішах у тісному контакті з підтримуючими клітинами, які забезпечують умови для виживання, проліферації і самооновлення стовбурових клітин. Хоча з віком їхня кількість у міокарді зменшується (у новонароджених втричі більше, ніж у 2-річних дітей), функціонально активні CSCs можуть бути ізольовані навіть від пацієнтів похилого віку [42].

Джерелом CSCs можуть бути біоптати шлуночків, міжпередсердної перегородки або вушка правого передсердя масою від 25 мг до 1 г, які отримують під час операції на відкритому серці, або малоінвазивним методом, що дозволяє наростити необхідну терапевтичну дозу клітин протягом 4-5 тижнів [63]. Після ферментативної обробки фрагменти культивують методом експлантів з подальшим отриманням кардіосфер. Кардіосфери складаються з проліферуючих стовбурових і прогеніторних клітин, які піддаються спонтанному диференціюванню в кардіальному напрямі. Вони мають досить великий розмір (40–150 мкм), тому не є безпечними для інтракоронарного введення, оскільки можуть спричинити емболію. Додатковий етап має передбачати переведення кардіосфер у суспензію за допомогою ферментування або культивування на поверхнях, покритих специфічними субстратами росту [371].

За результатами фенотипування методом проточної цитометрії встановлено, що вже на другому пасажі CSCs експресують переважно CD105 і на різному рівні CD90, CD34, CD31, а також ключовий маркер CD117 (c-Kit). Клонально проліферуючі CSCs експресують також антиген стовбурових клітин Sca-1 і низку генів NKX2-5, NOTCH1, NUMB, асоційованих з плюрипотентністю [56]. Sca-1⁺ прогенітори в серці мають високу активність теломерази, здатність мігрувати до пошкодженого міокарда і диференціюватися в кардіоміоцити [379]. Koninckx R. та ін. вперше ідентифікували популяцію стовбурових клітин міокарда, що активно експресували альдегіддегідрогеназу, яка підвищує їх виживання в умовах ішемії, маркер islet-1 і мали більшу здатність до диференціювання в кардіоміоцити, ніж відомі раніше CSCs [174]. Bolli R. та ін. підтвердили, що c-Kit⁺ CSCs здатні до диференціювання в усі кардіальні лінії клітин [43].

При оцінці терапевтичного потенціалу в експерименті на імунodefіцитних мишах продемонстровано, що CSCs людини, які вводили по краю інфаркту міокарда, приживались і мігрували в зону пошкодження. Через 20 днів відсоток життєздатних кардіоміоцитів у ділянці інфаркту був більшим у групі з введенням CSCs у порівнянні з контрольною, якій вводили фібробласти шкіри. Також відмічають зростання фракції викиду лівого шлуночка [306].

Інтраміокардіальне введення CSCs з вушка передсердя у свиней з інфарктом міокарда запобігало дилатації лівого шлуночка, зменшенню фракції викиду та потоншанню стінки міокарда, характерним для контрольної групи. Також покращились показники регіональної скоротливості та виживання кардіоміоцитів, що пояснюється успішним приживленням трансплантату та його диференціюванням [97]. Більш того, трансплантація щуром алогенних CSCs без імуносупресії виявилась безпечною і викликала лише короточасну локальну імунну реакцію без ознак системної імуногенності. Незважаючи на зменшення строків приживлення трансплантату, в порівнянні з сингенними клітинами, введення алогенних CSCs дало позитивні структурні і функціональні ефекти [236].

Група Lauden L. та ін. показала, що CSCs людини не викликають у щурів типових імунних реакцій, опосередкованих лімфоцитами Th₁ або Th₂, а замість стимуляції проліферації і експансії імунокомпетентних клітин пригнічують супресію ефекторних регуляторних Т-лімфоцитів. При цьому ліганду запрограмованої смерті клітин PD-L1 приділяється важлива роль в імунній поведінці CSCs з перспективою оцінки його експресії, як маркера для ідентифікації алогенних клітин з низьким рівнем ризику та високим відновлюваним потенціалом. CSCs в алогенному оточенні реалізують імунологічно толерантну імунну поведінку, сприяють розвитку PD-L1-залежної відповіді та імуномодуляції [201]. Подібні результати отримано і на карликових свинях з хронічною ішемічною кардіоміопатією, де трансендокардіальна ін'єкція 150 млн. алогенних CSCs не лише зменшувала розмір постінфарктного рубця і дилатацію серця, покращувала за даними магнітно-резонансної томографії життєздатність міокарда, а й не було виявлено зростання рівнів циркулюючих антитіл та ознак запалення міокарда при гістологічному дослідженні [391].

У порівнянні з раніше проведеними дослідженнями на мишах за допомогою високоточної полімеразної ланцюгової реакції (polymerase chain reaction – PCR) показана співставна та навіть краща ефективність введення збільшеної кількості прогеніторів міокарда в лівий шлуночок серця під 2D ультразвуковим контролем для запобігання потрапляння в постінфарктний рубець або коронарну артерію.

Слід зазначити, що при такому шляху введення клітин через 24 години в серці їх залишалося лише приблизно 1 %. Водночас, при інтраміокардіальному введенні через 24 години в серці залишалося 10 % клітин, а при інтракоронарному введенні через 24 години біля 5 % клітин. Такі дані відкривають шлях для клінічного застосування нового, технічно нескладного та відносно безпечного методу введення підвищеної кількості стовбурових клітин у серце – безпосередньо в лівий шлуночок [130].

Також в експериментах на щурах зі змодельованою ішемічною кардіоміопатією показана перевага триразового введення c-kit⁺ прогеніторів з інтервалом у 35 днів у порівнянні з однократним введенням. Встановлено, що кожна ін'єкція призводила до регіонального та загального покращення функції лівого шлуночка. Ефект був кумулятивним, тобто втричі покращилася функція лівого шлуночка в порівнянні з однократною дозою. Трикратне введення було асоційовано з кращим виживанням тканини міокарда, зменшенням рубця, меншим вмістом колагену в зоні ризику та неінфарктній зоні, вищою щільністю міокарда в зоні ризику. Менш ніж 1 % клітин залишились у міокарді та диференціювались у міоцити. Автори вважають, що дія введених стовбурових клітин більше пов'язана з паракринним ефектом, ніж із їх приживленням та диференціюванням [342].

У дослідженні Guo Y. та ін. на мишах з ішемічною кардіоміопатією та трикратним введенням клітин з міокарда показано, що фракція викиду лівого шлуночка покращувалася після кожного введення у порівнянні з трансплантацією лише один раз. Багаторазові ін'єкції також сприяли зменшенню вмісту колагену в неінфарктній зоні. Проте, приживлення введених клітин було на низькому рівні в обох групах тварин, що може підтверджувати саме їхній паракринний ефект [130].

В підсумку, проведений мета-аналіз 80-ти доклінічних досліджень ефективності застосування CSCs на моделі інфаркту міокарда (1176 тварин) встановив загальне зростання фракції викиду лівого шлуночка на 10,7 % (для великих тварин – біля 5 %) [416]. При цьому зазначають про кращі показники ефективності CSCs у порівнянні з клітинами кісткового мозку [268].

Комбіноване застосування CSCs та ММСК кісткового мозку також більш виражено зменшує розмір постінфарктного рубця та покращує скоротливу функцію серця, що пояснюють здатністю клітин кісткового мозку стимулювати проліферацію і диференціювання стовбурових клітин міокарда та впливати на їхні ніші в серці [370]. Продемонстровано ефективність застосування для відновлення міокарда і гібридних прогеніторів-хімер, створених злиттям кардіальних та кістковомозкових стовбурових клітин [23].

Перші клінічні випробування 2008-2012 рр. у США (проєкти SCPIO, CADUCEUS) та Японії (ALCADIA) у пацієнтів з ішемічною кардіоміопатією та хронічною серцевою недостатністю продемонстрували після трансплантації аутологічних c-kit⁺ CSCs підвищення фракції викиду лівого шлуночка, зменшення кінцевого систолічного та діастолічного об'ємів, розміру постінфарктного рубця, при зростанні маси життєздатного міокарда, регіональної скоротливості та показників максимального споживання кисню. Терапевтичні дози препарату становили від 1 до 37 млн. клітин, введення виконували методом інтракоронарної інфузії або інтраміокардіально. Відмічено відсутність ускладнень та збереження позитивної динаміки в ранні (3 міс.) та віддалені (12 міс.) строки після трансплантації [378]. У продовження цих робіт у Cedars-Sinai Medical Center (США) з 2014 по 2020 рр. проведено рандомізоване плацебо-контрольоване подвійне сліпе дослідження DYNAMIC з трансплантації вже алогенних CSCs. Аналогічний проєкт CAREMI зареєстровано в 2014 році в Іспанії. Ефективність аутологічних CSCs досліджують також у Фінляндії [73]. У клініках університетів Техасу та Маямі (проєкти CONCERT-HF, TAC-HFT II) показано перспективність комбінованого застосування CSCs (1-5 млн.) разом з ММСК кісткового мозку (у високій дозі 150-200 млн.) [59]. Додатковим підтвердженням безпеки CSCs, продемонстрованої в пілотних клінічних дослідженнях, може бути серія проєктів TICAP (2011-2013), PERSEUS (2013-2018) та APOLLON (2016-2018) в університеті Окаями (Японія), де вивчають ефективність застосування цих клітин у дітей з вродженим синдромом гіпоплазії лівого шлуночка та єдиним шлуночком [158, 340].

Дослідження на щурах із змодельованим інфарктом міокарда показали, що трансплантація стовбурових клітин плаценти людини покращує скоротливу здатність лівого шлуночка, суттєво зменшує розмір рубця, пригнічує запалення та апоптоз, а також стимулює ангиогенез [396]. Додаткова обробка плацентарних клітин гіалуроновими ефірами масляної та ретиноєвої кислоти, крім проангіогенного ефекту, сприяє експресії ними кардіальних маркерів connexin 43 та тропонін I [323]. Аналогічні результати були отримані в експерименті на мишах з моделлю хронічної серцевої недостатності. Через 4 тижні після введення препарату плацентарних клітин людини PDA-001 (Cenplacel-L) продемонстровано, що інтраміокардіальна ін'єкція, на відміну від їх внутрішньовенного введення, значно покращила систолічну та діастолічну функцію лівого шлуночка. Одночасно відзначено зменшення фіброзу в ділянках ін'єкцій. Низькі дози ($0,5 \times 10^4$ клітин на мишу) проявили більш виражений терапевтичний ефект, ніж високі ($0,5-5 \times 10^5$), що також стосувалось і рівнів проліферативної активності ендотеліоцитів і кардіоміоцитів реципієнта. Проте, за допомогою прижиттєвої візуалізації донорські клітини виявляли в міокарді за експресією люциферази лише в перші 2 доби після введення, що може свідчити про опосередкованість регенеративного потенціалу клітин паракринними факторами [65, 73].

В іншому дослідженні через 2 міс. після трансплантації стовбурових клітин, виділених з пластинки хоріона людини, у мишей з інфарктом відмічено достовірне зростання фракції викиду разом із зниженням кінцево-систолічного об'єму. Незважаючи на інтраміокардіальне введення, локалізація трансплантату в міокарді була підтверджена лише в перші 4 доби і цей період зменшувався для двох подальших повторних ін'єкцій [276]. Високий потенціал до хоумінгу, приживлення та мультипотентного диференціювання ММСК плаценти підтверджують експерименти, де виявлено міграцію клітин плодового походження в міокард вагітної самки миші із пошкодженням серця. При цьому 40% цих фетальних клітин експресували фактор Cdx2, асоційований з стовбуровими клітинами трофобласта плаценти. Більш того, ізольовані з серця донорські клітини були здатні до клональної експансії та диференціювання в кардіоміоцити [167].

Аналіз доклінічної ефективності інтраміокардіального застосування 1×10^7 ММСК плаценти на моделі інфаркту міокарда у свиней продемонстрував через 4 тижні після трансплантації відсутність істотних змін фракції викиду, об'єму лівого шлуночка та ударного об'єму, хоча розмір інфарктного рубця був достовірно меншим на 40 %. Трансплантація клітин сприяла покращенню регіонарних показників товщини стінки шлуночка в ділянці інфаркту, максимального кільцевого скорочення $LVESs_{max}$ та рівня перфузії за даними позитронно-емісійної томографії. Загальний рівень смертності тварин не зростав після введення препарату, що вказує на відсутність загрозливих для життя ускладнень, пов'язаних з процедурою трансплантації або самими клітинами [323].

Один з перших випадків клінічного застосування ММСК плаценти в комбінації з клітинами кордової крові в пацієнта з дилатаційною кардіоміопатією описаний в 2008 році. Протягом 11 місяців спостереження на фоні покращення клінічної картини не було виявлено побічних ефектів та реакцій "трансплантат проти хазяїна" [155]. Клінічні дослідження компанії Pluristem із застосування цих клітин у пацієнтів з критичною ішемією кінцівки підтвердили, що завдяки імуносупресивним та імуномодуляторним властивостям повторне введення алогенних ММСК плаценти не викликає відторгнення трансплантату, а Т-клітинні реакції алореактивності зафіксовані лише в 15 % пацієнтів з високими дозами препарату [80].

В підсумку, на моделях ішемічного пошкодження серця у великих та дрібних лабораторних тварин за допомогою морфологічних, інструментальних та функціональних методів продемонстровано високий регенеративний потенціал соматичних стовбурових клітин різних типів, серед яких особливий інтерес викликають тканиноспецифічні прогенітори з міокарда та ММСК плаценти. Пріоритетними напрямками при цьому є пошук більш доступних та безпечних джерел стовбурових клітин, розробка нових ефективних варіантів їх культивування, використання матриксів-носіїв для трансплантації. Відкритими залишаються і питання щодо вибору оптимального способу (системного або локального), дози та кратності введення стовбурових клітин, а також стандартизації критеріїв їх якості та ефективності.

1.6 Особливості тривимірних культур соматичних стовбурових клітин

Більшість досліджень щодо властивостей клітинних культур були виконані на двовимірних (2D) поверхнях через доступність витратних матеріалів, зручність маніпуляцій і високу життєздатність клітин [91]. Такі моношарові культури не лише суттєво поглибили розуміння основ клітинної біології, а й стали зручним інструментом для нарощування необхідної терапевтичної кількості клітин для трансплантації. Проте, в організмі майже всі клітини оточені позаклітинним матриксом, який має складну тривимірну (3D) структуру, що забезпечує необхідний біохімічний і фізичний сигналінг між клітинами різних типів [256].

Відомо, що для розвитку та функціонування стовбурових клітин важливим є збалансованість факторів їхнього мікрооточення – ніші. Ніша є частиною структурно-функціональних одиниць тканини. У процесі онтогенезу стовбурові клітини заселяють певні анатомічні структури, тканини яких забезпечують складні регуляторні взаємозв'язки підтримки їхньої популяції в стані спокою чи стимулювання їх проліферації і диференціювання з допомогою регуляторних сигналів. До цих факторів належать базальна мембрана, молекули позаклітинного матриксу та сусідні клітини, що продукують транскрипційні фактори, фактори росту та регуляторні молекули (Notch, GATA-2, Runx1, LIF та ін.). Водночас, вільні стовбурові клітини можуть знаходити шлях у відповідну нішу завдяки хемотаксису [90]. Важливим моментом є баланс функціонального стану ніш та активності клітин у них. Призначення ніші в тканинах дорослого організму полягає в підтримці тканинного гомеостазу і навіть у створенні умов максимальної захищеності стовбурових клітин від зовнішніх впливів. Відомо і про вплив з боку трансплантованих стовбурових клітин на нішу, особливо в умовах її компрометації пошкоджуючими факторами, наприклад, опроміненням. Також описано варіанти мімікрії пухлинних клітин, коли вони здатні підтримувати самооновлення завдяки факторам ніші [413]. Останнім часом важливу роль у регулюванні дозрівання та диференціювання стовбурових клітин на рівні ніші відводять мікро-РНК, які можуть блокувати групи генів, що кодують білки, відповідальні за ці процеси [386].

Об'ємні тривимірні культури мають здатність імітувати природне мікросередовище ніші, забезпечуючи кращу взаємодію між клітинами та реалізацію ними своїх функцій. Експерименти *in vitro* показали, що культивовані в 3D умовах ММСК продукують більшу в порівнянні з 2D культурами кількість білків позаклітинного матриксу, зокрема колаген I і VI типу, фібронектин, ламінін, тенасцин-С [176]. При такому культивуванні посилюється паракринний ефект завдяки виділенню цитокінів та ростових факторів з ангіогенними (VEGF, bFGF), антиапоптотичними (EGF, HGF) та антиоксидантними (IGF; TNF- α) властивостями [46]. Вважають, що співкультивування різних типів клітин з ендотеліальним потенціалом в умовах тривимірних конструкцій забезпечує кращі показники регенерації тканин, порівнюючи з двовимірними умовами [162].

Ще одним з варіантів регенеративної терапії є локальне застосування клітин для заміщення дефекту тканини. У таких випадках важливою є формотворна та опорна функція трансплантату, яка може бути забезпечена об'ємними агрегатами клітин (органоидами) або каркасом-матриksom. Найпростішим з варіантів отримання тривимірних сфероїдів є культура мікромаси [172]. ASCs всередині органоида залишаються життєздатними і клітини продукують більше позаклітинних молекул, таких як ламінін і фібронектин. Крім того, ASCs, отримані зі сфероїдів, показали в культурі вищу ефективність експансії та колонієутворюючу активність [67]. Також відомо, що сфероїди мультипотентних клітин зберігають більшу здатність до мультилінійного диференціювання в порівнянні з клітинами в моношарі [86]. Багато досліджень продемонстрували, що клітини, які є частиною мікромас, мають підвищену метаболічну активність. Зокрема, у мікромасах ASCs людини було виявлено значне збільшення ангіогенних факторів росту, таких як HGF, VEGF і FGF2, порівнюючи з моношаровою культурою. Експресія специфічних ангіогенних і антиапоптотичних факторів у сферах ASCs в індукційному середовищі була в 20 разів вищою, ніж у моношарових культурах. Адаптація кластерів клітин до сферичної форми може сприяти реорганізації цитоскелету та набуттю ними стовбурових властивостей завдяки білку клітинної адгезії E-cadherin [304].

Fitzgerald S. та інші за вмістом ДНК і морфометричним аналізом виявили злиття сфероїдів з утворенням більших кластерів в умовах статичної культури з ультранизьким рівнем прикріплення або суспензійної культури, на відміну від поверхні, покритої еластиноподібним поліпептидом і поліетиленіміном [106].

Порівнюючи з моношаровими культурами, культури сфероїдів ASCs є більш ефективними для пристосування до умов гіпоксичного середовища, завдяки посиленню адаптивних до гіпоксії сигналів (фактор стромальних клітин, stromal cell-derived factor – SDF-1 α ; гіпоксія-індуцибельний фактор, hypoxia-inducible factor – HIF-1), секреції ангіогенних та антиапоптичних молекул (HGF, VEGF, bFGF), а також інгібуванню апоптозу [304]. Cheng N. та ін. продемонстровано, що утворення на хітозанових плівках сфероїдів ASCs індукує значну експресію генів плюрипотентності (Sox-2, Oct-4 і Nanog). Крім того, спостерігали вплив на їхню здатність до диференціювання, виявлений за збільшенням експресії специфічних маркерів для остеогенного (RUNX2), нейрогенного (нестин) і гепатогенного (альбумін) диференціювання [67].

У дослідженні Li H. та ін. скануюча електронна мікроскопія показала, що поверхні сфероїдів, сформованих у мікрогравітаційній культуральній системі, були відносно гладкими та організованими в зернисту форму [215]. Lee J. та ін. запропоновано метод гібридизації сфероїдів ASCs з односегментованими волокнами, покритими полідофаміном, для підвищення їхньої життєздатності. Трансмійсна електронна мікроскопія показала, що у звичайних сфероїдах виявлено руйнування мембран і порожні простори між клітинами. На відміну від цього, мембрани клітин у сфероїдах із волокнами були міцно зв'язані одна з одною, а порожні області були мінімальними [206].

Для забезпечення належної формотворної та опорної функції біоінженерного трансплантату більших розмірів, а також для підтримання трофіки трансплантованих клітин у місці їх застосування та функціонування розробляють специфічні матрикси-носії. За останній час багато біотехнологічних компанії запропонували десятки видів носіїв для потреб регенеративної медицини, які мають свої переваги та недоліки, з огляду на походження, спосіб отримання, фізико-хімічні властивості, біоінертність, здатність до резорбції, тощо [67, 226].

Відомо більш ніж 100 різноманітних матриксів, як органічного (колаген, желатин, еластин, хітозан, хітин, фібрин, фібриноген і т. п.), так і неорганічного походження [374, 376]. Для регенерації різних типів тканин запропоновано кісткові демінералізовані, поліетиленгліколеві, альгінатні, колагенові, карбомерні, хітозанові, агарозні, желатинові, керамічні та комбіновані матрикси [333]. Також для 3D носіїв можуть одночасно використовуватися як природні, так і синтетичні речовини різного типу [390]. Такі композитні матеріали своєю пористістю, волокнистістю, проникністю і механічною стабільністю імітують нативний позаклітинний матрикс і можуть бути як у формі постійних трансплантатів, що виконують переважно каркасну опорну функцію при навантаженнях, так і біодеградуєчими. Матрикси можуть відповідати за механічну підтримку клітин, визначаючи їхню просторову організацію, міжклітинні взаємодії, виживання та спеціалізацію [215].

Окрім формотворної і опорної функції матрикси здатні протягом певного часу і дозовано виділяти необхідні фактори, забезпечуючи не тільки ріст, але і спрямоване диференціювання клітин вже *in vivo* [49]. Показано, що взаємодія між клітинами, позаклітинною основою біоматеріалу та факторами росту регулює диференціювання стовбурових клітин і ріст тканини [163, 344]. Наприклад, вплив на ASCs факторами мікрооточення кісткового мозку (VEGF, TGF- β 3, BMP-2) змінює профіль секреції ними цитокінів, впливає на їх виживання та реалізацію регенеративних ефектів [292]. Отже, 3D-матриця забезпечує оптимальне біологічно активне середовище для клітин, яке покращує їхню біофізичну і біохімічну взаємодію, сприяє проліферації, диференціюванню та секреції клітинами компонентів природного позаклітинного матриксу [25].

Продемонстровано, що колаген I типу підтримує виживання, остео- та хондрогенний фенотипи при трансплантації ASCs тваринам у колагеновому гелі [138]. Покриття полілактатного матриксу фібронектином сприяє остеогенному диференціюванню ASCs і трансплантація комітованих на ранніх стадіях клітин дає більш виражене формування кісткової тканини, ніж введення недиференційованих клітин [84].

Показано регенеративний ефект при трансплантації ASCs у матриксі на основі полімеру PLGA з гідроксиапатитом, який здатний протягом тривалого часу вивільняти ростові фактори в ділянці трансплантації, сприяючи спрямованому диференціюванню клітин [409]. Створено полімери, які при температурі тіла переходять із форми золю в гель, забезпечуючи просторову структуру та швидкий ріст клітин, особливо за наявності остеогенних факторів [138].

До іншої групи матеріалів належить гідроксиапатит або подібна кераміка, сформована з трикальцій фосфату, фосфату або карбонату кальцію. Скафолди з гідроксиапатиту пропонують застосовувати в тканинній інженерії через те, що вони забезпечують адгезію та проліферацію ММСК, а в поєднанні з дексаметазоном – остеогенне диференціювання. З іншого боку, керамічні матеріали з гідроксиапатиту мають недостатню швидкість біорезорбції, унаслідок чого через рік їхні залишки в місці дефекту виявляються замуrowаними в кісткову тканину, що знижує її міцність. Для використання в тканинній інженерії запропонований також біодеградуєчий носій, зроблений з нано-гідроксиапатиту та натуральних полімерів (хітозану та карбоксиметил-целюлози) з необхідними фізичними та хімічними властивостями та достатньою біосумісністю. Розроблено макропористі носії з нановолокнами желатину, що мають діаметр волокон колагену екстрацелюлярного матриксу (~150 нм), із включеннями часточок апатиту [264].

Як основа для 3D культур у біомедичних дослідженнях також широко використовуються різноманітні гідрогелі. Гідрогель – це субстанція, яка формується, коли органічний полімер (натуральний чи синтетичний) завдяки хімічним зв'язкам (ковалентним, іонним або водневим) утворює тривимірну структуру, що захоплює молекули води, формуючи гель. Загалом, гідрогелі з природних біополімерів, таких як альгінат і желатин – актуальний клас біоматеріалів завдяки їх біосумісності та здатності до біодеградації [107, 179, 331]. Основними труднощами в застосуванні гідрогелів для конструювання 3D культур є контроль міжклітинної взаємодії, а також висока загальна пористість (більше 60 %), що впливає на ефективність їх заселення клітинами [302, 351].

Важливим моментом є оцінка здатності ММСК до спрямованого диференціювання в умовах тривимірного культивування *in vitro* та можливого їх використання для регенерації дефектів тканин, зокрема кісткової [277]. На сьогодні клітинна терапія стає новим і перспективним методом лікування важких пошкоджень кісток і суглобів [154]. Відомо, що під час відновлення та ремоделювання кістки остеогенез поєднується з ангиогенезом [126, 375]. Кровоносні судини слугують структурним шаблоном, навколо якого відбувається розвиток кістки, а також об'єднують ключові елементи гомеостазу кісткової тканини в остеогенне мікрооточення, включно з мінералами, факторами росту та остеогенними прогеніторами. VEGF є основним регулятором росту судин і необхідний для ефективного поєднання ангиогенезу та остеогенезу як під час розвитку скелета, так і відновлення кісток у дорослому віці. Завдяки вираженим проангіогенним властивостям і мультипотентному потенціалу 3D культури ASCs сприяють індукції морфогенезу кістки, включно з васкуло-, ангио- та остеогенезом [47, 151].

Механізми диференціювання клітин досить складні і ще не повністю з'ясовані. Аналіз транскриптому і транслятому є стратегіями, які допомагають з'ясувати молекулярні події, що передують остеогенезу, хондрогенезу та адипогенезу в дво- та тривимірних культурах ASCs [290]. Yang S. та ін. використовували мікрочипи для аналізу профілів експресії екзосомальних мікроРНК, отриманих з недиференційованих, а також остеогенно диференційованих ASCs: 201 мікроРНК була активована, а 33 мікроРНК була пригнічена в порівнянні між двома типами екзосом. Ці екзосомальні мікроРНК пов'язують остеогенне диференціювання з такими системними процесами, як наведення аксонів, передача сигналів MAPK і Wnt [386]. Відомо, що шлях Wnt/ β -катеніну бере участь в остеогенному диференціюванні ASCs людини під час циклічного навантаження в кістковій тканині [232]. Індукція ММСК в остеобластному напрямі за допомогою остеогенних речовин перед імплантацією є одним із підходів для підвищення їхнього потенціалу кісткоутворення. Зазвичай, ММСК швидко втрачають свій індукований фенотип після видалення розчинних стимулів, однак остеогенний потенціал можна підтримувати, якщо регулярно надавати сигнали з позаклітинного матриксу [250].

Було показано, що ASCs людини, отримані з підшкірної, вісцеральної та сальникової жирової тканини, мають спільні імуногістохімічні характеристики, але відрізняються за морфологічними параметрами диференціювання. Найбільш стабільні результати остеогенного диференціювання спостерігали для клітин з підшкірної тканини. При цьому мікрмаси, отримані саме з цієї тканини, також виявилися більш однорідними та компактними за формою, ніж культури з клітин вісцеральної жирової тканини або сальника, що було продемонстровано в дослідженні Kleineidam B. та ін. [172].

Експерименти на тваринах продемонстрували можливість застосування культивованих та спрямовано диференційованих в остеогенному напрямі органоїдів мультипотентних клітин з жирової тканини для відновлення кісткової тканини на моделях пошкодження плоских і трубчастих кісток [131, 330]. Як і у випадку остеорепації, для відновлення хрящової тканини як носії стовбурових або диференційованих клітин пропонуються до використання різноманітні матрикси. ASCs на фібриновому клеї здатні відновити дефект суглоба в кроликів, продукуючи гіаліноподібний хрящ та викликаючи субхондральну репарацію кістки [179]. При диференціюванні ASCs на альгінатних мікросферах у присутності BMP-6 більш виразно, ніж у ММСК кісткового мозку, зростає експресія одного з маркерів хондрогенезу – агрекана [290].

Для регенерації зв'язок пропонують використовувати комбіновані гелі з фібрином, колагеном і гіалуронатом, оскільки в них, порівнюючи з монокомпонентними гелями, не лише більш виражена проліферація та диференціювання в хондрогенному напрямі, але й виявлено експресію еластину [336]. Матрикс з колінної зв'язки, обробленої колагеном, також сприяє посиленій експресії ASCs фенотипу сухожилля, ніж звичайний колагеновий гель. Комбіновані матрикси запропоновані і для пластики м'яких тканин: пористий носій з жирової тканини з колагеном; трьохкомпонентний матрикс з желатинової губки, полігліколікової кислоти та поліпропіленової сітки; шовковий фіброїн-хітозановий матрикс; PLGA-мікрокульки з інсуліном та дексаметазоном для індукції спрямованого диференціювання ASCs в адипогенному напрямі тощо [256].

Оскільки основним джерелом ASCs людини є ліпоаспірат, що отримується в клініках естетичної медицини, значна кількість клінічних випробувань стосується саме галузі пластичної та реконструктивної хірургії. Виділяють окремий напрямок реконструктивної хірургії – інженерія жирової тканини, яка розробляє та впроваджує в практику нові технології з використанням SVF та ASCs для пластики м'яких тканин. З цією метою пропонуються різні стратегії: комбінована імплантація адипоцитів із стовбуровими клітинами; заповнення дефекту тканин гідрогелями зі стовбуровими клітинами за допомогою ін'єкційних систем; використання постійних або біодеградуючих матриксів-імплантів, заселених клітинами; регенерація за допомогою сальника завдяки його високій васкуляризації; стимуляція адипогенезу *de novo* введеними клітинами або ростовими факторами; неоваскуляризація тканин тощо [244].

Оригінальним підходом стало використання самої жирової тканини, як біологічного матриксу для стовбурових клітин. Апробована техніка клітинно-опосередкованого ліпотрансферу (cell-assisted lipotransfer – CAL) – одночасна трансплантація жирової тканини та ASCs для відновлення м'яких тканин. За результатами численних доклінічних досліджень технологія CAL виявилась кращою за звичайний ліпотрансфер для підвищення рівня виживання жирових трансплантатів, що було успішно трансльовано в клініку [199]. За цією методикою вже кільком десяткам тисяч пацієнтів проведено пластику грудей, обличчя, ремоделювання стегна, омолодження шкіри рук [394]. За результатами потрійного сліпого плацебо-контрольованого дослідження жирові трансплантати, збагачені аутологічними стовбуровими клітинами жирової тканини, мали значно більші залишкові об'єми, порівнюючи з контрольними зразками. При цьому процедура трансплантації жиру, збагаченого ASCs, була зручною для лікарів та безпечною для пацієнтів [218].

Отже, розробка нових технологій тривимірного культивування клітин є одним з пріоритетних напрямів сучасної регенеративної медицини, що дозволить забезпечити просторову організацію носія для ефективного відновлення дефектів тканин, оскільки такий спосіб відтворює умови ніші для взаємодії клітин *in vitro* та покращення їх приживлення *in vivo*.

1.7 Вплив старіння на реалізацію регенеративного потенціалу соматичних стовбурових клітин

У старіючому організмі, навіть за збереження значної кількості стовбурових клітин, їхній проліферативний, диференціювальний та відновлювальний потенціал значно знижується. Вікові зміни функціонування стовбурових клітин пов'язують з активністю певних локусів хромосом, пошкодженням ДНК та скороченням теломер, оксидативним стресом, впливом транскрипційних факторів та сигнальних білків тощо. При старінні відбувається дисбаланс регуляторних механізмів, що негативно позначається як на самих стовбурових клітинах, так і на їхньому мікрооточенні. Зокрема, на моделях гетерохронних химер було показано, що функціональна активність стовбурових клітин залежить не стільки від їхнього власного віку, скільки від середовища, в якому вони розвиваються, тобто – властивостей ніші [54].

Клітинне старіння – це перманентний стан блокування клітинного циклу, який відбувається в проліферуючих клітинах, що піддаються різним стресам. Отже, старіння є захисним механізмом, який запобігає накопиченню та передачі пошкоджень. Стан старіння супроводжується нездатністю повторно увійти в клітинний цикл у відповідь на мітогенні стимули, посиленням секреторним фенотипом і стійкістю до загибелі клітин. Сенесценція клітин відбувається в тканинах під час різних фізіологічних і патологічних процесів, таких як ремоделювання тканин, травми, рак і фізіологічне старіння загалом. При цьому старіючі клітини впливають на багато загальнобіологічних процесів, починаючи з ембріонального розвитку: на відновлення та регенерацію тканин, контроль пухлиноутворення тощо. Хоча сенесценція є одним із причинних процесів природного старіння організму та відповідає за розлади, пов'язані з ним, сенесцентні клітини також можуть відігравати позитивну роль. В ембріогенезі та при ремоделюванні тканин старіючі клітини необхідні для правильного розвитку ембріона та відновлення тканин. При раку сенесценція діє як потужний бар'єр для запобігання розвитку пухлини [55]. Отже, ідентифікація та характеристика ключових особливостей старіння, індукція сенесценції в ракових клітинах або

усунення сенесцентних клітин, насамперед, стовбурових, за допомогою фармакологічного втручання в старіючі тканини набуває особливої актуальності в сучасній регенеративній медицині.

Як було зазначено раніше, одним з найбільш доступних та безпечних джерел соматичних ММСК є підшкірна жирова тканина. Під час старіння організму дисфункція жирової тканини супроводжується змінами на рівні адипоцитів та стромальних клітин, які асоційовані з хронічним системним запаленням та метаболічними порушеннями [347]. Численні патогенетичні шляхи індукують дефектний адипогенез, активацію запалення, аномальне вироблення адипоцитокінів та резистентність до інсуліну, що призводить до вікової дисфункції жирової тканини з функціональним погіршенням попередників адипоцитів і накопиченням старіючих клітин [269]. Прогресування старіння жирової тканини характеризується зростанням продукції прозапальних та зменшенням вироблення протизапальних цитокінів і факторів росту, що супроводжується посиленою клітинною інфільтрацією [60]. У підтриманні хронічного запалення та порушенні тканинного гомеостазу ключову роль відводять асоційованому зі старінням SASP-фенотипу, який містить низку гуморальних та клітинних факторів [186].

Старіння пов'язане не лише з імунною, метаболічною дисфункцією та посиленням запалення, а й зі значними змінами фізіологічного рівня статевих гормонів. Відомо, що з початку пубертатного періоду до менопаузи яєчники є головним органом у жінок, який продукує статеві гормони – естрогени, гестагени, андрогени. Жирова тканина, плацента та інші периферичні тканини також продукують естрогени в незначній кількості. Через зв'язок із специфічними рецепторами естрогени, які є основними гормонами жіночого організму, мають вплив на репродуктивну систему, регулюють стан молочних залоз, шкіри, ріст волосся, обмін речовин [98]. Фізіологічне вимкнення яєчників (менопауза) або хірургічне видалення (оваріоектомія) призводить до розвитку естроген-дефіцитних станів різного ступеня важкості: від легких проявів до важких функціональних порушень у жіночому організмі [204, 403].

За даними Росса та ін., виявлений взаємозв'язок між проведеною до менопаузи двосторонньою оваріоектомією та розвитком мультиморбідних станів, а саме наявністю найбільш поширених хронічних захворювань у різних поєднаннях. Частим наслідком менопаузи є постменопаузальний остеопороз – захворювання, при якому кістково-резорбуюча активність остеокластів випереджає кістково-формуєчу активність остеобластів, що призводить до втрати переважно трабекулярної кістки. Оваріоектомія та виникнення на її тлі мультиморбідних станів можуть бути й факторами прискореного старіння організму [291]. Зокрема, за даними Levine M. та ін., передчасна втрата оваріальної функції призводить до підвищення метилювання ДНК, що є загальновідомим біологічним маркером прискореного старіння [213].

Розвиток естроген-дефіцитних станів дуже часто супроводжується збільшенням маси тіла, що відбувається переважно завдяки жировій тканині. Адипоцити збільшують свої розміри та стають гіпертрофованими [48]. Для компенсації виниклого дефіциту естрогенів організм посилює утворення естрогенів іншими тканинами. Зокрема, у жінок у постменопаузі жирова тканина є джерелом практично всіх циркулюючих естрогенів [145]. Схожі зміни відзначаються і у тварин. Згідно з даними дослідників, самки оваріоектомованих мишей мають більш високу схильність до ожиріння в порівнянні з інтактними тваринами. Окрім того, оваріоектомія в щурів також призводила до збільшення маси тіла і гіпертрофії адипоцитів [48].

Асоційоване зі старінням ожиріння викликає кількісні та якісні зміни різних типів клітин в жировій тканині, зокрема і стовбурових. Ці зміни функціональних можливостей ММСК погіршують як ремоделювання жирової тканини, так і її функції, що спричиняє системне запалення, прогресуючу резистентність до інсуліну та інші метаболічні порушення [317]. Згідно з даними Oliva-Olivera W. та ін., у хворих з метаболічними порушеннями відбувалося пригнічення експресії адипогенних генів, зниження швидкості проліферації, клоногенного потенціалу стовбурових клітин жирової тканини, а їхня схильність до апоптозу відрізнялася в пацієнтів без метаболічного синдрому та у хворих з метаболічним синдромом [263].

ММСК жирової тканини у хворих з ожирінням продукують більший рівень прозапальних цитокінів у порівнянні зі здоровими людьми [132]. Дослідження Song K. та ін. демонструє, що ММСК жирової тканини в комбінації з естрогеном впливають *in vitro* на регуляторні Т-клітини в пацієток з передчасним виснаженням яєчників [325]. Дослідження біологічних та патофізіологічних властивостей ММСК, виділених із жирової тканини практично здорових людей та при захворюваннях, можуть допомогти в розробці більш ефективних засобів використання цих клітин у регенеративній медицині, а також забезпечити нові терапевтичні алгоритми лікування різних хвороб, зокрема ожиріння та цукрового діабету.

Загальноприйнятою експериментальною моделлю дефіциту естрогенів, характерного для менопаузи в людини, є оваріоектомія в лабораторних тварин [231]. На моделі оваріоектомії в мишей продемонстровано, що недостатність естрогенів впливає на кількісні та якісні показники субпопуляцій стовбурових клітин у кістковому мозку. В умовах оваріоектомії в мишей проліферативна здатність і остеогенний потенціал стовбурових клітин значно погіршуються, порівнюючи зі звичайними тваринами [366]. Було показано, що в оваріоектомованих тварин баланс між остеогенним та адипогенним диференціюванням стовбурових клітин кісткового мозку порушений, з переважанням адипогенного. У мишей після оваріоектомії посилене адипогенне диференціювання ASCs, ймовірно, є важливою причиною посиленого адипогенезу *in vivo* та подальших змін маси тіла, схожих на ожиріння [110]. Також порушується регенеративний потенціал ASCs в умовах вікового дефіциту естрогенів. Зокрема, ASCs від старих щурів з дефіцитом естрогену після оваріоектомії мають меншу здатність посилювати проліферацію теноцитів у системі непрямого спільного культивування, порівнюючи зі звичайними ASCs [48].

Загалом, на сьогодні дані щодо диференціовального потенціалу стовбурових клітин жирової тканини людини в різних напрямках на фоні дефіциту естрогенів досить обмежені, що становить суттєву наукову проблему щодо безпеки та індивідуальної терапевтичної ефективності клітинних препаратів.

До останнього часу золотим стандартом для ідентифікації старіючих клітин був фермент лізосомальна β -галактозидаза, також відомий як β -галактозидаза, асоційована зі старінням (SA- β -gal). Активність SA- β -gal дозволяє ідентифікувати старіючі клітини в культурі та тканинах ссавців. Кількісно активність SA- β -gal у клітинах можна визначити за допомогою проточної цитометрії з використанням 5-додеканоїламінофлуоресцеїну ди- β -D-галактопіранозиду, як субстрату при рН 6,0 [111]. Однак цей метод можна застосовувати лише на інтактних клітинах, тому він не дозволяє одночасно детектувати внутрішньоклітинні маркери.

Загалом, сучасні підходи дещо обмежені щодо кількісного виявлення старіючих клітин певного типу на основі комбінації маркерів, яка є важливою для їх впевненої ідентифікації. Справді, активність SA- β -gal вища в старіючих клітинах, проте її специфічність, як біомаркера старіння цілісного організму, нещодавно була поставлена під сумнів [143]. Тому в клітинах з відсутньою експресією SA- β -gal пропонують визначати ще один фермент – α -L-фукозидазу (α -fuc) [175]. Звичайне забарвлення на SA- β -gal не дозволяє розрізнити різні типи клітин, які можуть бути джерелом старіючих клітин у складних тканинах, що обмежує наше розуміння основних біологічних явищ. Намагаючись подолати обмеження сучасних методів ідентифікації старіючих клітин, використовують технологію ImageStreamX – вдосконалений проточний цитометр для візуалізації, здатний створювати численні флуоресцентні та світлопольні зображення кожної клітини безпосередньо в потоці з високою роздільною здатністю [41].

Tümpel S. та ін. описують пряму кореляцію між активністю теломерази *in vitro* та реалізацією функцій стовбуровими клітинами [355]. Було виявлено, що теломери вкорочуються в культурі клітин *in vitro* (~50 bp на клітинний пасаж). Фетальні ММСК мають довші теломери, ростуть швидше та сильніше експресують маркери плюрипотентності, ніж їхні аналоги від дорослих донорів. Проліферативний потенціал ММСК корелює зі зменшенням довжини теломер як *in vitro*, так і *in vivo*. Наслідки старіння ММСК визначають не тільки зміни морфології клітин і проліферативного потенціалу, але й здатність самотійно або спрямовано диференціюватися в адипо-, остео- та хондрогенному напрямках [270].

Протеїни p16INK4a/CDKN2A та HMGB2 беруть участь у зупинці клітинного циклу та ремоделюванні хроматину під час старіння. Рівні цих маркерів у циркулюючій крові зростають з віком, при цьому вміст HMGB2 суттєво корелює із функціональним статусом організму, тоді як p16INK4a пов'язаний слабше. Цікаво, що між цими двома білками існує сильна кореляція незалежно від віку. Зокрема, високо функціональна людина старше 90 років демонструє непропорційно низький рівень HMGB2 [202]. Експресія гена p16INK4A тісно пов'язана зі старінням мезенхімальних стовбурових клітин людини і потенційно пригнічується метилюванням ДНК під час експансії *in vitro*. Накопичення пошкоджень на рівні геному і протеому стимулює активність інгібіторів циклін-залежних кіназ p16Ink4a і p53-p21Cip1/Waf1 для блокування клітинного циклу та зупинки проліферації [186].

Ознаки старіння клітин не обмежуються підвищеною активністю SA- β -gal, високою експресією генів p16INK4A, p53 і p21, а й супроводжуються більш глибоким рівнем пошкодження ДНК, включно з гістонами γ -H2AX; утворенням асоційованих зі старінням вогнищ гетерохроматину (senescence-associated heterochromatin foci – SAHF); формуванням мікроядер та, загалом, набуттям асоційованого зі старінням SASP-фенотипу – явища, яке характеризується секрецією низки прозапальних цитокінів і сигнальних молекул [123, 258]. SAHF та збільшення кількості мікроядер у ядрі клітини внаслідок впливу асоційованих з віком пошкоджуючих факторів можна виявити за допомогою відносно простого мікроскопічного аналізу, а вже інші маркери потребують більш складних цито- та молекулярно-генетичних методів [22, 101].

Компоненти патологічного секреторного фенотипу досить неоднорідні і можуть залежати від типу клітини. Зокрема, було показано, що підвищення рівня певних цитокінів, хемокінів і факторів росту (IL-4, IL-13, IL-17, CCL3, CCL25 і GM-CSF) може характеризувати профіль SASP для ASCs від літніх донорів [216]. SASP-фенотип реалізує свої прояви не лише локально, а й системно, впливаючи на інші органи і тканини. Тому клінічними проявами дисфункції старіючої жирової тканини може бути і ліподистрофія, і ожиріння, як складова метаболічного синдрому, який супроводжується порушеною толерантністю до глюкози і гіпертензією [60, 303].

В останні роки продемонстровано, що прогеніторні клітини жирової тканини від людей з ожирінням та діабетом мають підвищену експресію специфічних циклін-залежних кіназ p53 та p16INK4a, при нормальному рівні p21CIP1/WAF1 [132]. Білок p53 викликає запалення та інфільтрацію жирової тканини макрофагами, що супроводжується інсулінорезистентністю, порушеною толерантністю до глюкози та серцевою дисфункцією [241]. При цьому дефіцит p16INK4a в клітинах-попередниках посилює адипогенез [372].

Враховуючи, що в людей похилого віку не завжди можна отримати достатню кількість ліпоаспірату, а проліферативний потенціал ММСК у них знижений, для отримання необхідної терапевтичної дози клітинного препарату актуальною проблемою залишається потреба в тривалому культивуванні клітин [70]. Відомо, що часте пасажування клітин у нефізіологічних умовах *in vitro* індукує їх старіння через реплікативне виснаження, пошкодження ДНК та інші стресові механізми [349].

Культури вважаються "старіючими" наприкінці їх реплікативної тривалості життя, якщо вони не здатні завершити одне подвоєння популяції протягом 4-тижневого періоду, який передбачає 3 послідовні тижні живлення свіжим середовищем, що містить 10 % сироватки [123]. При цьому, як і при старінні *in vivo*, активується SASP-фенотип, що проявляється надмірною секрецією прозапальних хемокінів та інших цитокінів, зокрема IL-8, IL-6, гранулоцитарно-макрофагального колонієстимулюючого фактора, медіаторів хемотаксису GRO, молекул адгезії ICAM-1 та хемоатрактантів моноцитів MCP1-4 [171]. Усі процедури експансії клітин *ex vivo* викликають накопичення анеуплоїдних клітин, що тісно пов'язано з прогресуванням старіння культури.

Не менш важливим є вплив негативних екзогенних факторів на властивості прогеніторних та стовбурових клітин. Відомо, що кількість ендотеліальних прогеніторів з ознаками пізнього старіння, яке призводить до зниження їхнього про-ангіогенного потенціалу, є вищою в курців, ніж у людей, які не палять [187].

Також опромінення може погіршувати життєздатність клітин, вкорочувати дендрити та індукувати клітинне старіння, про що свідчить більш висока

експресія маркерів старіння p16 і p21 і підвищене утворення асоційованих зі старінням гетерохроматинових осередків, поряд з посиленою секрецією маркерів SASP: IL-1 α , IL-6, MMP-3, IGFBP-6, резистин і адипонектин. Коли для блокування секреції SASP було додано інгібітори JAK1, більш висока експресія SASP пригнічувалась, але інгібування потенціалу остеогенного та адипогенного диференціювання ММСК, спільно культивованих з кондиційним середовищем опромінених клітин MLO-Y4, було послаблено. Ці результати свідчать, що старіючі остецити можуть порушувати диференціальний потенціал ММСК через паракринну передачу сигналів SASP [377].

Ще одним важливим аспектом прогресування або сповільнення клітинного старіння є просторові умови культивування клітин. Нещодавні дослідження показують, що рівні експресії маркерів, асоційованих зі старінням, і Sirtuin1, що запобігає старінню, значно підвищуються в тривимірній культурі ASCs, тоді як експресія гена p16INK4a, пов'язаного зі старінням, була збільшена в двовимірній культурі. 3D- і 2D-культури також мають різний профіль експресії генів, пов'язаних із підтримкою теломер (комплекс Shelterin, РНК-зв'язувальні білки та гени репарації ДНК) та окислювальним стресом (альдегіддегідрогеназа класу 1 і 3), а також демонструють велику варіабельність в їхньому окисно-відновному потенціалі [85].

Отже, враховуючи, що успіх клітинної терапії визначається, насамперед, якістю стовбурових клітин, вплив стресових чинників старіння на їхні морфологічні, фенотипічні та функціональні характеристики потребує подальшого більш глибокого дослідження.

Саме тому важливим завданням є розробка додаткових критеріїв безпеки клітинних трансплантатів з урахуванням вікових особливостей донора і реципієнта. В основі цього має лежати розуміння вікових аспектів патогенетичних механізмів реалізації регенеративного потенціалу різних типів соматичних стовбурових клітин.

1.8 Підходи з розробки критеріїв якості соматичних стовбурових клітин

В умовах широкого впровадження численних клітинних та тканинних технологій в сучасній регенеративній медицині виникає нагальна потреба стандартизації, контролю якості та безпеки новітніх біотехнологічних препаратів. Згідно з директивою Європейської Комісії 2001/83/ЕС виділяють окрему групу лікарських засобів прогресивної терапії (Advanced Therapy Medicinal Products – ATMPs), які, у свою чергу, поділяють на:

- лікарські продукти генної терапії – Gene Therapy Medicinal Products (GTMPs) – безпосередньо пов'язані з терапевтичними, профілактичними або діагностичними ефектами рекомбінантної послідовності нуклеїнових кислот;
- лікарські продукти соматичних клітин – Somatic Cell Therapy Medical Products (SCTMPs) – містять суттєво змінені клітини чи тканини або клітини чи тканини, не призначені для використання для однакових основних функцій у реципієнта та донора;
- продукти тканинної інженерії – Tissue Engineered Products (TEPs) – сконструйовані клітини або тканини, які мають властивості регенерувати, відновлювати або замінювати тканини людини;
- комбіновані засоби прогресивної терапії – Combined ATMPs (cATMPs) – містять один або кілька медичних пристроїв, які є невід'ємною частиною GTMPs, SCTMPs або TEPs. До складу комбінованих засобів можуть входити тривимірні об'ємні носії, системи локальної доставки та дозування тощо [87, 229].

На сьогодні у світі офіційно зареєстровано кілька десятків ATMPs з різних типів та джерел стовбурових клітин, які призначені для лікування широкого спектру захворювань. Приблизно половину з них складають SCTMPs, дещо менше третини – TEPs і біля 20 % – GTMPs. Препарати соматичних стовбурових клітин застосовують переважно в лікуванні гематологічних захворювань (23,5 %), патології шкіри і м'яких тканин (23,5 %), в ортопедії (17,6 %), онкології (8,8 %), при імунологічних порушеннях (17,6 %), кардіоваскулярній патології (6 %) та нейродегенеративних захворюваннях (3 %).

Препарати тканинної інженерії здебільшого використовують для корекції дефектів та заміщення втрачених анатомічних структур при патології шкіри і м'яких тканин (60 %), пошкодженнях кісток і суглобів (15 %), відновлення судин і клапанів серця (10 %), а також в офтальмології (15 %). Важливо відмітити, що від 40 до 60 % АТМРs є аутологічними, приблизно 40 % – алогенними, а до 15 % тканинно-інженерних засобів з ксеногенних джерел [284].

Офіційно зареєстровані клінічні випробування в галузі клітинної терапії оприлюднені на веб-платформах баз даних клінічних досліджень Національної бібліотеки з медицини США (<https://clinicaltrials.gov>), Інформаційної системи клінічних досліджень Європейського Союзу – Clinical Trial Information System, CTIS (<https://euclinicaltrials.eu>), а також Міжнародного реєстру клінічних досліджень Всесвітньої організації охорони здоров'я – International Clinical Trials Registry Platform, ICTRP (<https://trialsearch.who.int>). Зокрема, за даними бази clinicaltrials.gov станом на 2023 рік у світі було зареєстровано понад 7 тис. клінічних досліджень терапевтичної ефективності стовбурових клітин при різноманітній патології, а загальна кількість пролікованих пацієнтів сягає десятків тисяч, що є беззаперечним доказом безпеки та ефективності клітинної терапії та тканинної інженерії [73]. До 2020 року орієнтовні витрати приватних компаній на клітинні технології становили понад 40 мільярдів доларів, а до 2030 року – сягнуть 180 мільярдів [285].

Для забезпечення належного контролю етичних, юридичних і медичних аспектів організації клінічних досліджень та подальшого застосування клітинних і тканинних трансплантатів у різних країнах діють державні регуляторні органи. Зокрема, у США ці функції покладено на Управління з контролю харчових продуктів та лікарських засобів (Food and Drug Administration, FDA), в Європі діє Агентство з контролю лікарських препаратів (European Medicines Agency, EMA), в Японії – Агентство з контролю фармацевтичних препаратів та медичних засобів (Pharmaceuticals and Medical Devices Agency, PMDA), у Південній Кореї – Міністерство безпеки харчових продуктів та ліків (Ministry of Food and Drug Safety, MFDS). В Україні до 2022 р. проведення клінічних випробувань клітинних та тканинних препаратів контролював Координаційний центр з трансплантації органів, тканин та клітин.

Окрім державних регуляторних органів, вагомий внесок у розробку, стандартизацію та впровадження новітніх клітинних та тканинних технологій роблять численні наукові товариства та громадські організації, покликані об'єднувати зусилля науковців та клініцистів у галузі регенеративної медицини. Серед них варто згадати Міжнародне товариство з дослідження стовбурових клітин (International Society for Stem Cell Research – ISSCR), Міжнародне товариство з тканинної інженерії та регенеративної медицини (Tissue Engineering and Regenerative Medicine International Society – TERMIS), Міжнародну федерацію з клінічного застосування та дослідження жирової тканини (International Federation for Adipose Therapeutics and Science – IFATS), Міжнародне товариство з клітинної та генної терапії (International Society for Cell and Gene Therapy – ISCT), Американське товариство з трансплантації та клітинної терапії (American Society for Transplantation and Cellular Therapy – ASTCT) та ін. Останні дві організації стали співзасновниками Фонду з акредитації клітинної терапії (Foundation for the Accreditation of Cellular Therapy – FACT), який встановлює стандарти високоякісної медичної та лабораторної практики в галузі клітинної терапії для добровільної перевірки закладів та їх акредитації.

На сьогодні в Україні на законодавчому рівні урегульовано лише частину ключових питань, що стосуються клінічного використання продуктів прогресивної терапії. Зокрема, клінічне використання клітинних та тканинних трансплантатів, отриманих з анатомічного матеріалу, як аутологічного, так і алогенного або ксеногенного походження, дозволяється лише після проведення клінічних випробувань. Вимоги до таких випробувань визначені наказом МОЗ України від 10.10.2007 р. № 630 "Про затвердження Порядку проведення клінічних випробувань тканинних і клітинних трансплантатів та експертизи матеріалів клінічних випробувань" [281]. Постановою Кабінету Міністрів України від 02.03.2016 № 286 було затверджено "Ліцензійні умови провадження господарської діяльності банків пуповинної крові, інших тканин і клітин людини згідно з переліком, затвердженим Міністерством охорони здоров'я". З 2019 р. вступив у дію Закон України "Про застосування трансплантації анатомічних матеріалів людині".

В основу регулювання виготовлення та обігу препаратів клітин і тканин людини та продуктів на їх основі закладено ключові юридичні та етичні принципи Конвенції про захист прав і гідності людини щодо застосування біології та медицини: Конвенція про права людини та біомедицину, а також Додаткового протоколу до Конвенції про права людини і біомедицину щодо трансплантації органів і тканин людини. При цьому існують певні особливості нормативної бази щодо трансплантації різних типів соматичних клітин, тканин або органів, які обумовлені біологічними та медичними чинниками.

Наприклад, FDA США кістковий мозок розглядають як самостійний орган, а застосування гемопоетичних стовбурових клітин периферичної і пуповинної крові регулюється окремо, як "клітини, тканин людини або продуктів на їх основі". При цьому аутологічні та алогенні ГСК, які при виготовленні клітинного продукту, призначеного для відновлення гемопоезу, зазнали мінімальних маніпуляцій, визначаються як продукти з низьким рівнем ризику, у той час як препарати ГСК, які зазнали значних маніпуляцій або призначені для негомологічного використання, визначаються як продукти з високим рівнем ризику [100, 168].

Для продуктів з низьким рівнем ризику вкрай важлива увага приділяється запобіганню передачі та розповсюдження можливих інфекційних захворювань від донорів до реципієнтів, а також дотриманню умов безпеки та належної якості тканин і клітин під час їх забору, обробки, зберігання та підготовки для застосування. Для групи продуктів високого ризику необхідно продемонструвати регулюючому органу безпеку та ефективність клітин і тканин для їх застосування людині, а також отримати дозвіл для їх клінічного використання. Група високого ризику регулюється відповідно до законодавства для біологічних продуктів, ліків та медичних виробів, що потребує дотримання норм виробництва GMP [168, 246].

Поряд з численними експериментальними та клінічними дослідженнями, що демонструють позитивні ефекти соматичних стовбурових клітин різних типів, опубліковані роботи, результати яких закликають до настороженості в певних аспектах впровадження клітинної терапії в клініку [280].

Наприклад, рівні експресії деяких маркерів ММСК на ранніх етапах культивування корелюють з їхнім різним потенціалом проліферації та диференціювання, що може впливати на якість клітинного продукту. Зокрема, CD34⁺ ASCs мають більший проліферативний потенціал та експресію ендотеліальних маркерів, а CD34-негативні клітини краще диференціюються в остеогенному та адипогенному напрямках, а також більше експресують маркери перицитів. Припускають, що втрата маркера CD34 при культивуванні свідчить про початок комітування клітин від незрілого до диференційованого типу [334].

З іншого боку, CD73⁺ і CD105⁺ клітини стабільно диференціюються в остеогенному напрямі, а експресують CD90 менш виражено. Превалювання остеогенного диференціювання характерне і на пізніх пасажах ASCs при тривалому культивуванні. При мультипотентних властивостях ASCs *in vitro*, *in vivo* домінує остеогенний і хондрогенний потенціал, а регенерація інших тканин обмежена [290]. При диференціюванні ММСК з кісткового мозку та жирової тканини в хондрогенному напрямі за допомогою PCR показано активацію експресії генів колагену в обох груп клітин, але гістологічно синтез колагену II типу та протеогліканів був підтверджений лише в клітин з кісткового мозку, а не в ASCs [21].

Загальновідомо, що однією з головних проблем клітинних технологій є стандартизація процедур виділення, культивування та трансплантації клітинного продукту, що може залежати як від стану організму донора чи реципієнта, так і від досвіду оператора. Можливо, саме тому не в усіх експериментах дослідникам вдалося отримати позитивний ефект застосування стовбурових клітин. Наприклад, при ін'єкції ASCs у перинфарктну зону у тварин не було покращення гемодинаміки та васкуляризації міокарда, хоча донорські клітини виживали до 4-5 тижнів. Посилений синтез колагену типу I та II при спільному культивуванні ASCs та хондроцитів може вказувати на фібротизацію тканини [279]. При використанні в клініці вже згадуваної раніше технології клітинно-опосередкованого ліпотрансферу для відновлення м'яких тканин у 10 % пацієнтів спостерігали утворення малих кіст діаметром 5-12 мм, а в пацієнтки із введенням ASCs на фізіологічному розчині виявлено фіброз грудей [394].

Набагато більшу увагу звертає на себе онкологічна настороженість при застосуванні стовбурових клітин різного типу, насамперед – ембріонального і фетального походження. Показано, що при тривалому пасажуванні навіть мультипотентні клітини дорослого організму можуть іморталізуватися та спонтанно трансформуватися. У кондиційному середовищі з ракових ліній MDAMB231 та MCF7 ASCs можуть диференціюватися в карцинома-асоційовані фібробласти, які роблять внесок у розростання пухлини та її метастазування. Цьому може сприяти висока концентрація TGF- β 1 в середовищі культивування [247]. Також ASCs, не впливаючи на пухлинні клітини молочної залози, що перебувають у спокої, потенціюють ріст активних ракових клітин [413]. Загалом, ці повідомлення вказують на необхідність поглибленого дослідження ММСК та дозволяють прогнозувати порушення потенціалу клітин на етапі культивування і, за необхідності, скоригувати технологію виготовлення клітинного продукту. Наприклад, додавання в середовище з ракових клітин антитіл проти TGF- β 1 або інгібітору кінази його рецептора блокує злякисну трансформацію ASCs [292]. Для клініциста ці роботи підтверджують необхідність розробки більш чітких показань і протипоказань до клітинної терапії, а також важливість прогнозування її ефективності, можливих побічних ефектів або ускладнень [260, 345].

Отже, соматичні стовбурові клітини з різних джерел завдяки своїй доступності та безпеці отримання, потенціалу диференціювання та унікальним імунологічним властивостям стають ефективним інструментом у багатьох напрямках регенеративної медицини. Експерименти на культурах клітин *in vitro* і тваринах *in vivo*, як перший необхідний етап їх дослідження, підтверджують перспективи клітинної терапії. При цьому актуальним залишається встановлення комплексних критеріїв якості, безпеки та ефективності клітинних препаратів, починаючи саме з доклінічного етапу, оскільки подальші клінічні випробування досить дорогі та пов'язані з обмеженнями дозвільних процедур. Значна кількість таких випробувань в останні роки є доказом того, що технології з використанням соматичних стовбурових клітин заслуговують на увагу клініцистів, і деякі з них вже незабаром можуть бути офіційно рекомендовані до застосування.

РОЗДІЛ 2 МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1 Загальна характеристика об'єктів дослідження

Експериментальні дослідження проводили на базі лабораторії клітинних та тканинних культур відділу клітинних та тканинних технологій Інституту генетичної та регенеративної медицини (ІГРМ) ДУ "Національний науковий центр "Інститут кардіології, клінічної та регенеративної медицини ім. акад. М. Д. Стражеска НАМН України" з використанням молодих статевозрілих (2-5 міс), старих (14 міс) і новонароджених мишей ліній FVB "дикого типу" з генотипом H-2^q (n = 211), CBA/Ca (n = 51) та FVB-Cg-Tg(GFPU)5Nagy/J (n = 128), трансгенних за геном зеленого флуоресцентного білка (green fluorescence protein – GFP). Лінія трансгенних тварин була люб'язно надана Європейською лабораторією молекулярної біології – European Molecular Biology Laboratory, EMBL (м. Монтеротондо, Італія). Мишей утримували з вільним доступом до води та їжі *ad libitum* за стандартних умов, температури та освітлення 12:12 год на базі експериментальної клініки ІГРМ.

Усі оперативні втручання в мишей проводили під загальною анестезією за допомогою інтраперитонеального введення авертину – 2,5 % розчину 2,2,2-тримброметанолу (*Sigma-Aldrich*, США) в дозі 400 мг/кг. При виведенні з експерименту тварини підлягали евтаназії гуманним методом цервікальної дислокації після загального знеболення авертином.

Біологічний матеріал від людини отримували за письмовою інформованою згодою. Плаценту (n = 8) отримували в умовах операційної після операції кесаревого розтину на 39-41 тиж. вагітності в пацієток віком 23-36 років. Біологічний матеріал для досліджень брали в донорів, у крові яких не було виявлено поверхневого (HBsAg) та ядерного (HBcAg) антигенів вірусу гепатиту В, РНК вірусу імунодефіциту людини 1/2 (HIV 1/2) та антитіл до HIV 1/2 (anti-HIV-1/2), РНК вірусу гепатиту С (HCV) та антитіл до HCV (anti-HCV), сумарних антитіл проти *Treponema pallidum* та ДНК вірусу Епштейна-Барр (EBV). Тканина плаценти була тестована методом полімеразної ланцюгової реакції на відсутність ДНК цитомегаловірусу,

вірусу простого герпесу 1 та 2 типу (HSV-1/2) та ДНК *Toxoplasma gondii*. Також було проведено мікробіологічне дослідження тканини для підтвердження відсутності аеробної, анаеробної та грибової мікрофлори. Виділення та тестування тканини плаценти проводили на базі лабораторії клітинних культур кріобанку Інституту клітинної терапії (м. Київ).

Тканину міокарда (n = 6) отримували в пацієнтів чоловічої статі віком 64-72 р. з фрагментів, що підлягають резекції та видаленню під час операції аорто-коронарного шунтування, яку проводили за медичними показами для лікування хронічної ішемічної кардіоміопатії на базі відділення хірургічного лікування ішемічної хвороби серця ДУ "Національний інститут серцево-судинної хірургії ім. М. М. Амосова НАМН України".

Реактиви та витратні матеріали, використані в дослідженнях, належали до категорії Research Use Only (RUO) та мали усі необхідні сертифікати відповідності від виробників. Реактиви для виготовлення та тестування клітинних препаратів плаценти, які використані в клінічному дослідженні, належали до категорії Clinical Grade та In Vitro Diagnostic (IVD), відповідно. Обладнання, що використовувалось у дослідженнях, відповідало необхідним стандартам з електричної та променевої безпеки і проходило регулярне сервісне обслуговування відповідно до чинних регламентів.

Засоби вимірювання проходили щорічну метрологічну експертизу на базі ДП "Всеукраїнський державний науково-виробничий центр стандартизації, метрології, сертифікації та захисту прав споживачів (м. Київ) відповідно до статті 17 Закону України "Про метрологію та метрологічну діяльність" від 05.06.2014 р. № 1314Л/П, постанови Кабінету Міністрів України від 04.06.2015 р. № 374 "Про затвердження переліку категорій законодавчо регульованих засобів вимірювальної техніки, що підлягають періодичній повірці" та "Порядку проведення повірки законодавчо регульованих засобів вимірювальної техніки, що перебувають в експлуатації, та оформлення її результатів", затвердженого наказом Міністерства економічного розвитку і торгівлі України від 08.02.2016 р. № 193.

Усі дослідження на тваринах були погоджені комісією з питань етики ІГРМ. Роботи з експериментальними тваринами проводили з дотриманням Закону України "Про захист тварин від жорстокого поводження", "Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються з експериментальною та іншою науковою метою" (Страсбург, 1986 р.), "Загальних етичних принципів експериментів на тваринах", схвалених I Національним конгресом з біоетики (Київ, 2001 р.), а також норм біологічної безпеки.

Клінічне випробування "Оцінка ефективності застосування стовбурових клітин міокарда, кісткового мозку, плаценти, жирової тканини та їх комбінацій у лікуванні хворих на ішемічну кардіоміопатію" проводили за висновком Координаційного центру трансплантації органів, тканин та клітин МОЗ України (протокол № 6 від 16.06.2017 р.) відповідно до "Порядку проведення клінічних випробувань тканинних і клітинних трансплантатів та експертизи матеріалів клінічних випробувань", затвердженого наказом МОЗ України від 10.10.2007 р. № 630. Протокол клінічного дослідження погоджено комітетом з біоетики ДУ "Національний інститут серцево-судинної хірургії ім. М. М. Амосова НАМН України". Роботи з біологічним матеріалом від людини проводили відповідно до "Конвенції про захист прав і гідності людини щодо застосування біології та медицини: Конвенція про права людини та біомедицину" від 04.04.1997 р.

Біологічний матеріал від тварин та людини, а також витратні матеріали та інструменти, які з ним контактували, після дослідження підлягали знезараженню за допомогою замочування протягом 60 хв у робочому розчині "Неохлор" (ЗАТ "Український науково-виробничий центр проблем дезінфекції", Україна) з концентрацією 0,5 % за активним хлором, відповідно до затверджених інструкцій. Знищення біологічних та медичних відходів проводили відповідно до наказу МОЗ України № 325 від 08.06.2015 р. "Про затвердження Державних санітарно-протиепідемічних правил і норм щодо поводження з медичними відходами". Трупи використаних в експериментах тварин підлягали знищенню на базі експериментальної клініки ІГРМ.

2.2 Виділення та культивування стовбурових клітин

2.2.1 Отримання культур ММСК із кісткового мозку мишей

Первинні культури ММСК кісткового мозку та жирової тканини отримували за стандартними методиками в розроблених нами модифікаціях [119, 282]. Суспензію клітин кісткового мозку мишей лінії FVB (n = 36) виділяли при температурі 4 °С за допомогою вимивання з стегнових кісток поживним середовищем RPMI-1640 (*Sigma-Aldrich*, США) з подальшим перенесенням суспензії в культуральні флакони з площею поверхні 25 см² з повним поживним середовищем DMEM/F12 (*Sigma-Aldrich*, США), що містило 15 % фетальної сироватки корів (fetal bovine serum – FBS) та 1 % суміші антибіотиків PenStrep (*Sigma-Aldrich*, США). Після підрахунку в гемоцитометрі Ньюбауера за допомогою дозатора в культуральний флакон площею 25 см² (*Sarstedt*, Німеччина) вносили 10-12 × 10⁶ ядровмісних клітин зі щільністю посадки 4-5 × 10⁵ клітин/см². Культивування усіх зразків клітин проводили за стандартних умов у CO₂-інкубаторі SteriCycle 371 (*Thermo Fisher Scientific*, США) при температурі 37 °С та зволоженій атмосфері з концентрацією CO₂ 5 %. Субкультивування проводили при досягненні 80 % конфлюентності моношару за допомогою 0,25 % розчину трипсину та 0,02 % етилендіамінтетраоцтової кислоти (ethylenediaminetetraacetic acid – EDTA) (все – *Sigma-Aldrich*, США).

2.2.2 Отримання культур ММСК із жирової тканини мишей

Джерелом ASCs жирової тканини була підшкірна та вісцеральна жирова тканина самців мишей лінії FVB-Cg-Tg(GFPU)5Nagy/J, трансгенних за геном GFP, віком 5 міс (n = 54). Після евтаназії в стерильних умовах препарували фрагменти підшкірної та вісцеральної жирової тканини та відмивали їх у фосфатно-сольовому буфері (phosphate-buffered saline – PBS) з 1 % суміші антибіотиків PenStrep (*Sigma-Aldrich*, США). Жирову тканину подрібнювали ножицями на фрагменти об'ємом приблизно 1 мм³ та інкубували в 3-5 мл 0,1 % розчину колагенази 1A (*Sigma-Aldrich*, США) протягом 90 хв при 37 °С з

постійним перемішуванням на шейкері (*BioSan*, Латвія). Після інкубації фрагменти тканини ресуспендували, додавали 10 мл повного поживного середовища і центрифугували 10 хв при $450\times g$. Видаляли надосадову рідину, яка містила зрілі адипоцити, утворений осад ресуспендували в повному поживному середовищі DMEM/F12 (*Sigma-Aldrich*, США), що містило 15 % FBS та 1 % суміші антибіотиків PenStrep (*Sigma-Aldrich*, США). Після фільтрування через клітинний фільтр клітини переносили в культуральні флакони площею 25 см^2 (*Sarstedt*, Німеччина). Культивування усіх зразків клітин проводили за стандартних умов у CO_2 -інкубаторі SteriCycle 371 (*Thermo Fisher Scientific*, США) при температурі $37\text{ }^\circ\text{C}$ та зволоженої атмосфері з концентрацією CO_2 5 %. Пасажування культур проводили при 80 % конфлюентності моношару за допомогою 0,25 % розчину трипсину та 0,02 % EDTA (*Sigma-Aldrich*, США).

2.2.3 Отримання культур ММСК з плаценти мишей

Плаценти виділяли в мишей лінії FBV ($n = 13$) на 18-19 добу вагітності, яку визначали за наявності копулятивної пробки на наступний день після підсадки самок до самця. Після евтаназії в стерильних умовах препарували матки, видаляли плоди, а плаценти переносили в чашку Петрі та відмивали в стерильному середовищі RPMI-1640 (*Sigma-Aldrich*, США) з 100 ОД/мл пеніциліну та стрептоміцину (все – *Sigma-Aldrich*, США). Під стереомікроскопом за допомогою мікрохірургічних інструментів видаляли оболонки та препарували хоріон. Фрагменти тканини механічно подрібнювали мікроножицями та ферментували протягом 10 хв при $37\text{ }^\circ\text{C}$ у середовищі RPMI-1640 з 0,25 % трипсину, 10 ОД/мл DNase I та 0,1 % колагенази типу I (все – *Sigma-Aldrich*, США). Суспензію тканини фільтрували через клітинні фільтри з діаметром пор 100 мкм, клітини відмивали в поживному середовищі RPMI-1640 за допомогою центрифугування при $350\times g$ протягом 10 хв та переносили в культуральні флакони з повним поживним середовищем α MEM (*Sigma-Aldrich*, США), що містило 15 % фетальної сироватки корів, 100 ОД/мл пеніциліну та стрептоміцину. Клітини культивували при $37\text{ }^\circ\text{C}$ в CO_2 -інкубаторі у зволоженої атмосфері з 5 %

CO₂, замінюючи поживне середовище щодня. Субкультивування проводили при досягненні 80 % конфлюентності моношару, використовуючи 0,25 % розчин трипсину з подальшим відмиванням у середовищі α MEM (*Sigma-Aldrich*, США).

2.2.4 Отримання культур ММСК з плаценти людини

В стерильних умовах ламінарного боксу з плаценти видаляли амніон та ножицями відділяли зону гладенького хоріону. Фрагменти плаценти промивали розчином Хенкса із 100 ОД/мл пеніциліну та стрептоміцину (*Gibco*, США). У стерильній чашці Петрі тканину розрізали ножицями на фрагменти розмірами 1×1 мм та додавали 0,1 % розчин колагенази типу I та IV (*Gibco*, США).

Тканину інкубували з сумішшю ферментів протягом 30-40 хв при 37 °С до появи ознак дисоціації. Після завершення інкубування суспензію фільтрували через клітинний фільтр з діаметром пор 100 мкм та вносили в культуральні флакони площею 175 см² (*Sarstedt*, Німеччина) у 50 мл середовища α MEM з 15 % FBS (*Gibco*, США).

Через 7-10 діб здійснювали візуальний контроль культури на інвертованому мікроскопі IX71 (*Olympus*, Японія) та проводили заміну середовища, яку повторювали надалі що три доби. Субкультивування проводили при досягненні культурою 80-90 % конфлюентності, знімаючи клітини з поверхні флакона за допомогою розчинів Версена (PBS + 0,02 % EDTA) та 0,05 % трипсину з EDTA, нагрітими до 37 °С (3 мл для флакону з площею поверхні 175 см²). Активність трипсину інактивували через 3 хв додаванням поживного середовища DMEM (*Gibco*, США) з 10 % FBS та відмивали клітини за допомогою центрифугування при 400× g протягом 10 хв.

Надосад видаляли, клітини ресуспендувати в повному поживному середовищі, підраховували кількість та вносили їх у нові культуральні флакони з щільністю 3-6×10³ клітин на 1 см². Перед субкультивуванням на останній пасаж частину клітин переносили в окремий флакон з площею поверхні 175 см² для отримання не менше 3 млн. клітин у стані поділу для цитогенетичного аналізу при досягненні культурою 40-60 % конфлюентності.

2.2.5 Отримання культур ендотеліальних прогеніторних клітин мишей

Джерелом клітин-попередників з магістральних судин була аорта самців мишей лінії FVB "дикого типу" віком 5 міс ($n = 26$), яку обробляли за розробленою нами методикою (пат. України №127428). Тварини підлягали евтаназії та в стерильних умовах відпрепаровували аорти та переносили їх у чашки Петрі з середовищем RPMI-1640 (*Sigma-Aldrich*, США), яке містило 1 % суміші антибіотиків PenStrep (*Sigma-Aldrich*, США). Під стереомікроскопом видаляли фрагменти парааортальної жирової тканини та препарували зовнішню адвентиційну оболонку аорти (*tunica externa*) від середньої (*tunica media*) та внутрішньої (*tunica intima*). Виділені тканини подрібнювали на фрагменти розмірами приблизно 1 мм² та інкубували в 0,1 % розчині колагенази I типу (*Sigma-Aldrich*, США) протягом 30-40 хв при температурі 37 °С, після чого промивали середовищем RPMI-1640 (*Sigma-Aldrich*, США) з 1 % суміші антибіотиків PenStrep. Подрібнені фрагменти внутрішньої оболонки аорти та адвентиції переносили в окремі чашки Петрі діаметром 35 мм (*Sarstedt*, Німеччина) з повним поживним середовищем MEM AQmedia (*Sigma-Aldrich*, США) з додаванням 10 % FBS. Додатково культивували експланти з кілець аорти.

Культивування усіх зразків клітин проводили за стандартних умов у CO₂-інкубаторі при температурі 37 °С та зволоженій атмосфері з концентрацією CO₂ 5 %. Першу заміну середовища проводили через 10 діб після початку культивування. Подальшу заміну поживного середовища проводили щотири доби. Субкультивування проводили при досягненні 80 % конфлюентності моношару за допомогою 0,25 % розчину трипсину. Для цього кондиційне середовище зливали, моношар промивали 1 мМ розчином Версена і додавали 0,05 % розчин трипсину з EDTA (*Sigma-Aldrich*, США) на 2-3 хв до дисоціації моношару. Дію ферменту інгібували додаванням рівного об'єму повного поживного середовища, клітини збирали центрифугуванням при 200× g протягом 5 хв за кімнатної температури. Супернатант зливали, осад ресуспендували в повному поживному середовищі, кількість живих клітин підраховували в камері гемоцитометра Ньюбауера за допомогою тесту з трипановим синім.

2.2.6 Отримання культур клітин-попередників з тканини передсердь і шлуночків серця мишей

Джерелом клітин-попередників з міокарда мишей лінії FVB-Cg-Tg(GFPU)5Nagy/J були фрагменти серця новонароджених тварин (n = 32) та самців віком 5 міс (n = 28). Виділення клітин проводили за розробленою нами методикою (пат. України № 149486).

В стерильних умовах розсікали грудну клітку, відпрепарувували серця від магістральних судин та переносили їх у чашки Петрі діаметром 35 мм з середовищем RPMI-1640 (*Sigma-Aldrich*, США), яке містило 1 % суміші антибіотиків пеніциліну та стрептоміцину PenStrep (*Sigma-Aldrich*, США). Виділення серця в новонароджених мишей проводили під стереомікроскопом.

Під стереомікроскопом за допомогою мікрохірургічних інструментів видаляли фрагменти жирової тканини, перикарду, аорти, легеневих артерій та промивали порожнини серця через устя магістральних судин поживним середовищем DMEM (*HyClone*, США) для видалення залишків крові та тромбів. За допомогою мікроножиць відсікали вушка передсердь і окремо шлуночки, промивали чистим середовищем DMEM та подрібнювали ножицями на фрагменти розміром 0,5-1 мм³.

Подрібнену тканину переносили в полістирольну пробірку об'ємом 5 мл та додавали 1 мл поживного середовища DMEM, що містило 0,1 % колагенази типу I та II (*Sigma-Aldrich*, США). Тканину ферментували протягом 20 хв при 37 °C з постійним перемішуванням на шейкері зі швидкістю 100 об/хв. Після інкубації колагеназу інактивували додаванням 4 мл середовища DMEM та відмивали за допомогою центрифугування при 300× g протягом 10 хв.

Надосадову рідину видаляли, до клітин додавали середовище IMDM – Iscove's Modified Dulbecco's Medium (*Sigma-Aldrich*, США), що містило 20 % FBS, 100 од/мл пеніциліну (*Sigma-Aldrich*, США), 100 мкг/мл стрептоміцину (*Sigma-Aldrich*, США), 2 мМ/л L-глутаміну (*Sigma-Aldrich*, США) та переносили в культуральні флакони площею 25 см², покриті фібронектином (*Greiner Bio-One*, Австрія). Зразки культивували методом експлантів у стандартних умовах

CO₂-інкубатора при 37 °C у зволоженій атмосфері з 5 % CO₂. По досягненню 80 % конфлюентності моношару клітини переводили в суспензію з використанням суміші розчинів 0,25 % трипсину (*Sigma-Aldrich*, США) та 0,02 % EDTA (*Sigma-Aldrich*, США) протягом 2-3 хв при кімнатній температурі під візуальним контролем. Трипсин інактивували 5 мл середовища DMEM, що містило 10 % FBS, та відмивали клітини за допомогою центрифугування при 350× g протягом 10 хв для подальшого спрямованого диференціювання.

2.2.7 Отримання культур клітин-попередників з синоатріального вузла серця мишей

Під стереомікроскопом з висіченого серця самців мишей лінії FVB-Cg-Tg(GFPU)5Nagy/J віком 5 міс (n = 14) видаляли фрагменти жирової тканини, перикарду, аорти, легневих артерій та промивали порожнини серця через устя магістральних судин поживним середовищем RPMI-1640 (*Sigma-Aldrich*, США) для видалення залишків крові та тромбів. За допомогою скальпеля розсікали серце між передсерддями і шлуночками та повторно промивали чистим середовищем RPMI-1640. Візуалізували та відпрепарували синоатріальний вузол доступом через вушко правого передсердя. За допомогою мікроножиць розсікали передню стінку передсердь та уздовж міжпередсердної перегородки відсікали ліве передсердя. Розсікали стінку вздовж *crista terminalis* для видалення вушка правого передсердя. Обережно препарували синоатріальний вузол, який виглядає як темно-помаранчева смужка, що межує з вушком передсердя, та розрізали його перпендикулярно до *crista terminalis* на три смужки однакового розміру для ферментативного виділення клітин.

Подрібнену мікроножицями тканину синоатріального вузла переносили в полістирольну пробірку об'ємом 5 мл та додавали 1 мл поживного середовища DMEM (*HyClone*, США), що містило 0,1 % колагенази типу I і II. Тканину ферментували протягом 30 хв при 37 °C з постійним перемішуванням на шейкері. Після завершення часу інкубації колагеназу інактивували за допомогою додавання 4 мл середовища IMDM (*Sigma-Aldrich*, США), що містило 10 % FBS,

100 од/мл пеніциліну (*Sigma-Aldrich*, США), 100 мкг/мл стрептоміцину (*Sigma-Aldrich*, США), 2 мМ/л L-глутаміну (*Sigma-Aldrich*, США), 0,1 мМ/л 2-меркаптоетанолу (*Sigma-Aldrich*, США) та переносили в культуральні флакони площею 25 см² (*Gibco*, США). Зразки культивували методом експлантів у стандартних умовах CO₂-інкубатора при 37 °С у зволоженої атмосфері з 5 % CO₂. Після досягнення 80 % конфлюентності моношару експланти видаляли, а клітини переводили в суспензію з використанням суміші розчинів 0,25 % трипсину (*Sigma-Aldrich*, США) та 0,53 мМ/л EDTA (*Sigma-Aldrich*, США) протягом 2-3 хв при кімнатній температурі під візуальним контролем. Трипсин інактивували 5 мл середовища DMEM, що містило 10 % FBS, та відмивали клітини за допомогою центрифугування при 350× g протягом 10 хв для подальшого культивування.

Отриману популяцію в кількості 2×10⁵ клітин/мл вносили в культуральні флакони, які містили ростове середовище для кардіосфер (35 % повного середовища IMDM + 65 % DMEM/F12 (*HyClone*, США), що містило 2 % B-27 (*Sigma-Aldrich*, США), 0,1 мМ/л 2-меркаптоетанолу (*Sigma-Aldrich*, США), 10 нг/мл епідермального фактора росту EGF (*Sigma-Aldrich*, США), 20 нг/мл основного фактору росту фібробластів bFGF (*Sigma-Aldrich*, США), 40 нМ/л кардіотрофіну-1 (*Sigma-Aldrich*, США), 40 нМ/л тромбіну (*Sigma-Aldrich*, США), 100 од./мл пеніциліну, 100 мкг/мл стрептоміцину, 2 мМ/л L-глутаміну. Субкультивування проводили при досягненні 80 % конфлюентності моношару з використанням стандартної суміші 0,25 % розчину трипсину та 0,2 % розчину EDTA [68].

2.2.8 Отримання культур прогеніторних клітин з міокарда людини

Висічені фрагменти тканини міокарда в операційній поміщали у флакони з стерильним середовищем DMEM, що містило 100 од/мл пеніциліну і 100 мкг/мл стрептоміцину (все – *HyClone*, США), та транспортували в лабораторію протягом 2 год. Біоптат переносили з транспортного флакона в чашку Петрі діаметром 100 мм та подрібнювали скальпелями на фрагменти розміром 1-2 мм³. Тканину ферментували в 0,1 % розчині колагенази NB6 (*Nordmark Biochemicals*,

Німеччина) в середовищі IMDM (*HyClone*, США) протягом 40 хв. Для нейтралізації колагенази ферментовані фрагменти тканини серця заливали 5 мл повного поживного середовища для експлантів IMDM, що містило 10 % FBS, 100 од/мл пеніциліну, 100 мкг/мл стрептоміцину, 2 мМ/л L-глутаміну, 0,1 мМ/л 2-меркаптоетанолу (все – *HyClone*, США) та переносили в культуральні флакони з площею поверхні 25 см², покриті фібронектином. Зразки культивували методом експлантів у CO₂-інкубаторі в стандартних умовах при 37 °С та зволоженої атмосфері з 5 % CO₂. По досягненню моношару 80 % конфлюентності експланти видаляли, а клітини моношару переводили в суспензію з використанням розчину з 0,5 г/л трипсину та 0,53 мМ/л EDTA протягом 2-3 хв при кімнатній температурі під візуальним контролем. Трипсин нейтралізували середовищем DMEM, що містило 10 % FBS, та відмивали клітини за допомогою центрифугування при 350× g протягом 10 хв для подальшого диференціювання.

Отриману популяцію клітин з експлантів у кількості 2×10⁵ клітин/мл вносили в культуральні флакони площею 25 см², покриті poly-D-lysine (*Greiner Bio-One*, Австрія), які містили ростове середовище для кардіосфер (35 % повного середовища IMDM + 65 % DMEM/F12, що містило 2 % B-27, 0,1 мМ/л 2-меркаптоетанолу, 10 нг/мл епідермального фактору росту EGF, 20 нг/мл основного фактору росту фібробластів bFGF, 40 нМ/л кардіотрофіну-1, 40 нМ/л тромбіну, 100 од/мл пеніциліну, 100 мкг/мл стрептоміцину, 2 мМ/л L-глутаміну). Субкультивування проводили при досягненні 80 % конфлюентності моношару з використанням стандартної суміші трипсину та EDTA.

2.2.9 Кріоконсервування та розморожування культур клітин

Культури ASCs жирової тканини, ММСК плаценти, клітин-прогеніторів з аорти та міокарда мишей були кріоконсервовані для довготривалого зберігання в рідкому азоті при температурі -196 °С. Для цього після відмивання від поживного середовища за допомогою центрифугування протягом 10 хв при 350× g 5×10⁶ клітин ресуспендували в 1 мл повного середовища для кріоконсервування, яке складалось з 90 % FBS та 10 % диметилсульфоксиду (dimethyl sulfoxide – DMSO)

(*Sigma-Aldrich*, США), та переносили в кріопробірки об'ємом 1,8 мл. Пробірки поміщали в низькотемпературний холодильник при $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ в контейнерах для заморожування CoolCell (*BioCision*, США), які забезпечують поступове зниження температури із швидкістю $1\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{хв}$. Через 24 год пробірки переносили в рідкий азот для довготривалого зберігання при температурі $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Зразки культури ММСК плаценти людини ресуспендували в концентрації 0,5-2 млн/мл у кріосередовищі, що містило 90 % повного поживного середовища та 10 % DMSO (*Sigma-Aldrich*, США), дозували по 1 мл у кріопробірки об'ємом 2 мл та кріоконсервували за допомогою програмованого заморожувача IceCube® (*SY-LAB*, Австрія) із зниженням температури до $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ за триетапною програмою. Зразки зберігали в кріосховищі в парах рідкого азоту при $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Для розморожування кріопробірку з кріоконсервованими клітинами відтаювали на водяній бані при $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ протягом 1-2 хв до появи рідкої фракції. До повного розморожування кріопробірку витримували при кімнатній температурі протягом 2-4 хв після чого переносили суспензію в пробірку об'ємом 15 мл, що містила 10 мл поживного середовища α MEM з 2 % FBS (*Gibco*, США). Клітини відмивали за допомогою центрифугування протягом 10 хв при $350\times g$. Осад ресуспендували в середовищі α MEM без сироватки для досліджень або в 0,9 % розчині NaCl для трансплантації.

2.2.10 Отримання культур мікромаси ММСК жирової тканини мишей

Культуру мікромаси ASCs формували після другого пасажу. Для цього моношарову культуру клітин переводили в суспензійний стан за допомогою 0,25 % розчину трипсину, відмивали в середовищі DMEM (*Sigma-Aldrich*, США) і переносили 2×10^6 клітин у стерильну полістирольну пробірку об'ємом 5 мл у повне поживне середовище DMEM, що містило 10 % FBS. Пробірку центрифугували протягом 10 хв при $350\times g$ та після формування на дні мікромаси культивували в стандартних умовах CO_2 -інкубатора протягом 12-14 діб, періодично обережно струшуючи пробірку для запобігання адгезії клітин до стінок. Заміну поживного середовища проводили що два-три дні.

2.2.11 Отримання культур ММСК жирової тканини мишей у гідрогелі

Для приготування об'ємних носіїв на основі гідрогелю використовували карбомер 974Р (*Sigma-Aldrich*, США) у комбінації з гліцеролом, пропіленгліколем, триетиламіном і агарозою в оригінальних пропорціях. Для приготування гідрогелю 0,049 г карбомеру 974Р розчиняли в 6,7 мл PBS та перемішували протягом 30 хв. Додавали 0,122 г гліцеролу та 0,3 г пропіленгліколю і продовжували перемішування ще протягом 20 хв. Розчин стабілізували протягом 60 хв та додавали 0,05 мл триетиламіну і 0,05 г агарози. Гель нагрівали до 83-85 °С в мікрохвильовій печі до досягнення рідкої фази, відливали в циліндричні форми діаметром 10 мм, товщиною 5 мм та охолоджували до кімнатної температури. Отримані гідрогелі ліофілізували в кріоліофілізаторі та стерилізували під ультрафіолетовими променями в умовах ламінарного боксу.

ASCs другого пасажу вносили в кількості 4×10^4 , 2×10^5 та 1×10^6 клітин на 1 гідрогель. Культивування проводили в стандартних умовах CO₂-інкубатора в середовищі DMEM з 10 % FBS (*Sigma-Aldrich*, США). Середовище замінювали що 3-4 доби.

Ендотеліальні прогеніторні клітинами з аорти миші (mouse aortic endothelial cells – MAEC) другого пасажу заселяли в гідрогель за допомогою мікроін'єкцій інсуліновим шприцом у кількості 1×10^6 клітин на 1 гідрогель. Культивування проводили протягом 21 доби в стандартних умовах у середовищі DMEM/F12 з додаванням 10 % FBS (*Sigma-Aldrich*, США). Середовище замінювали що 3-4 доби.

Для оцінки біосумісності гідрогелів та рівня виживання клітин у них проводили імплантацію самцям мишей лінії FVB "дикого типу" віком 5 міс (n = 18). Під загальною анестезією (2,5 % розчин авертину 400 мг/кг) після обробки операційного поля проводили розріз шкіри по серединній лінії спини миші довжиною 1 см. Шкіру відпрепарувували від поверхневих фасцій та краї рани максимально розводили ранорозширювачами. Гідрогелі без клітин та заселені клітинами підсаджували під шкіру з обох боків спини та зашивали рану безперервним обвивним швом. Через 2, 4 та 6 тиж. після імплантації тварини підлягали евтаназії, трансплантати з навколишніми тканинами препарували та досліджували за допомогою гістологічних методів.

2.3 Характеристика культур соматичних стовбурових клітин

2.3.1 Оцінка проліферативного потенціалу культур клітин *in vitro*

Клітини після першого пасажу в кількості 1×10^5 вносили в чашку Петрі діаметром 35 мм (*Sarstedt*, Німеччина) та культивували в поживному середовищі DMEM/F12 (*Sigma-Aldrich*, США), яке містило 10 % FBS (*HyClone*, США), пеніцилін 100 од/мл, стрептоміцин 100 мкг/мл, 1:100 non-essential amino acids, 2 mM L-глутаміну (все – *Sigma-Aldrich*, США). Після досягнення конфлюенту клітини моношару переводили в суспензію за допомогою суміші 0,25 % розчину трипсину та 0,02 % розчину EDTA (1:3), отриману суспензію клітин центрифугували в поживному середовищі DMEM/F12, яке містило 10 % FBS при $380 \times g$ протягом 10 хв. Після підрахунку кількості клітин у гемоцитометрі Ньюбауера знову вносили клітини в кількості 1×10^5 у чашку Петрі з площею культуральної поверхні $9,5 \text{ cm}^2$ та культивували в повному поживному середовищі. Субкультивування припиняли, коли кількість клітин, отриманих після останнього пасажу, була менше 1×10^5 . Кількість пасажів коливалась від 2 до 5.

Час подвоєння клітинної популяції (population doubling time – PDT) розраховували для кожного пасажу за формулою:

$$\text{PDT} = T / 3,31 \lg (X_k / X_0),$$

де T – час культивування клітин; X_k – кількість клітин, отриманих після субкультивування; X_0 – кількість клітин на початку пасажу.

Для аналізу питомих показників приросту клітин у культурі було проведено порівняння проліферативного потенціалу культур ММСК кісткового мозку та жирової тканини за допомогою підрахунку кількості нарощених у культурі клітин у різні проміжки часу. Для розрахунку питомої швидкості приросту популяції в культурі у флакон площею 25 cm^2 (*Sarstedt*, Німеччина) вносили 2×10^5 клітин та проводили підрахунок отриманих клітин через 3 та 6 діб культивування протягом 3 пасажів. Дослідження проводили, використовуючи 12 первинних клітинних ліній ММСК кісткового мозку та жирової тканини.

Для аналізу отриманих даних проліферації використовували формулу розрахунку критерію питомої швидкості приросту кількості клітин:

$$\varepsilon := \frac{\ln(x_2) - \ln(x_1)}{t_2 - t_1}$$

де x_1 та x_2 – кількість клітин на моменти часу t_1 та t_2 відповідно.

При розрахунку максимального проміжку часу, протягом якого клітини зберігають проліферативну активність, використовували формулу, отриману із закону Мальтуса, який моделює експоненційне зростання чисельності популяції за умови сталого приросту:

$$t_{\max} := \frac{\ln\left(\frac{x_{\max}}{x_0}\right)}{\varepsilon}$$

де x_0 – початкова кількість клітин; x_{\max} – максимальна кількість клітин, яка може бути отримана; ε – питома швидкість приросту кількості клітин.

2.3.2 Визначення колонієутворюючої активності культур клітин

Для оцінки здатності ММСК до утворення колоній отриману суспензію висаджували аналогічно методиці, описаній вище, однак у концентрації 2×10^5 клітин/см² культуральної поверхні. Через 11-12 діб клітини фіксували холодним 96 % етанолом, колонії фарбували 10 % розчином азур-еозину. Підраховували кількість колоній (Colony-Forming Unit – CFU), які склалися не менше як з 50 клітин. Ефективність клонування вираховували за формулою:

$$\text{Ефективність клонування} = (X/Y) \times 100 \%$$

де X – кількість отриманих колоній, Y – кількість висаджених клітин.

2.3.3 Спрямоване диференціювання моношарових культур ММСК

Остеогенне диференціювання клітин індукували за стандартними методиками з модифікаціями. Для спрямованого остеогенного диференціювання ММСК другого пасажу вносили в 24-лунковий планшет у кількості 5×10^4 на лунку і на стадії субконфлюентного моношару проводили заміну середовища на остеоіндуктивне, яке складалося з поживного середовища DMEM/F12 (*Gibco*, США) з додаванням 10 % FBS, а також 0,05 мМ L-аскорбінової кислоти 2-фосфату, 100 нМ дексаметазону та 10 мМ β -гліцерофосфату (все – *Sigma-Aldrich*, США). Заміну середовища проводили що три-чотири доби. Загалом, клітини перебували під впливом середовища для остеогенного диференціювання протягом 21 доби за стандартних умов культивування. Після завершення індукції моношар клітин промивали PBS, фіксували 2 % охолодженим до 4 °С розчином формальдегіду протягом 30 хв, повторно промивали PBS. Зафіксований моношар клітин фарбували за допомогою Alizarin Red S (*Sigma-Aldrich*, США) та за методом фон Косса для виявлення відкладень солей кальцію в позаклітинному матриксі, що є однією з ознак остеогенного диференціювання культури.

Також забарвлювали клітини на виявлення лужної фосфатази. Для цього на зафіксований моношар клітин наносили 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate/nitro blue tetrazolium (BCIP/NBT) (*Sigma-Aldrich*, США) на 20-30 хв у захищеному від світла місці та відмивали дистильованою водою. Інтенсивність специфічного забарвлення оцінювали на інвертованому мікроскопі IX71 (*Olympus*, Японія) та фотографували на камеру DP-20 (*Olympus*, Японія). Напівкількісний аналіз відкладень солей кальцію проводили за методом Gregory за допомогою екстракції оцтовою кислотою і нейтралізації гідроксидом амонія з подальшим колориметричним вимірюванням оптичної щільності екстрагованого барвника на фотометрі Multiskan EX (*Thermo Fisher Scientific*, США) при довжині хвилі 405 нм.

Для спрямованого адипогенного диференціювання ММСК другого пасажу вносили в 24-лунковий планшет у кількості 5×10^4 на лунку і на стадії субконфлюентного моношару вносили ростове середовище DMEM-HG (*Gibco*, США) з додаванням 10 % FBS, 1 мкМ дексаметазону, 200 мкМ індометацину,

500 мкМ ізобутилметилксантину та 5 мкг/мл інсуліну (все – *Sigma-Aldrich*, США). Середовище замінювали через 3 доби та культивували клітини протягом 14 діб.

Візуалізацію ліпідних гранул у цитоплазмі клітин проводили за допомогою їх фарбування розчином Oil Red O (*Sigma-Aldrich*, США) після попередньої фіксації 4 % розчином охолодженого до 4 °С формальдегіду [295]. На інвертованому мікроскопі IX71 (*Olympus*, Японія) проводили підрахунок клітини що містили ліпідні включення. Для напівкількісного аналізу до лунок вносили ізопропанол та інкубували 10 хв при кімнатній температурі на шейкері, відбирали по 250 мкл розчину та аналізували його оптичну щільність при довжині хвилі 500 нм на планшетному спектрофотометрі Multiskan EX (*Thermo Fisher Scientific*, США). Ступінь диференціювання розраховували в умовних одиницях оптичного поглинання.

Для хондрогенного диференціювання ММСК культивували протягом 2-3 пасажів і на стадії конфлюентного моношару проводили заміну стандартного середовища для культивування на середовище для хондрогенного диференціювання, яке складалось з поживного середовища DMEM-HG (*Gibco*, США) з додаванням 10 % FBS, а також 50 мкг/мл L-аскорбінової кислоти 2-фосфату, 40 нг/мл дексаметазону, 100 мкг/мл пірувату натрію, 10 нг/мл TGF- β 3 та 100 нг/мл IGF-I (все – *Sigma-Aldrich*, США).

Після 21 доби перебування клітин під впливом хондрогенного середовища культури контрольних та експериментальних зразків промивали PBS, фіксували 2 % охолодженим до 4 °С розчином формальдегіду протягом 25-30 хв, повторно промивали PBS. Зафіксований моношар клітин фарбували протягом 30 хв при 37 °С 1 % розчином Alcian Blue (*Sigma-Aldrich*, США) в 3 % розчині оцтової кислоти (pH = 2,5), а також дофарбовували протягом 5 хв при кімнатній температурі 0,1 % водним розчином Safranin O (*Sigma-Aldrich*, США). Інтенсивність забарвлення оцінювали на інвертованому мікроскопі IX71 (*Olympus*, Японія). Контрольні культури клітин перебували в аналогічних умовах зі стандартним повним поживним середовищем без додавання індукторів диференціювання.

2.3.4 Спрямоване остеогенне диференціювання культури мікрмаси ММСК жирової тканини мишей

На п'яту добу культивування стандартне середовище для культивування замінювали на середовище для остеогенної індукції, яке складалося з поживного середовища DMEM/F12 (*Sigma-Aldrich*, США) з додаванням 10 % FBS, а також L-аскорбінової кислоти 2-фосфату (0,05 мМ), дексаметазону (100 нМ) та β-гліцерофосфату (10 мМ). Заміну середовища проводили щотири доби. Загалом клітини перебували під впливом середовища для остеогенного диференціювання протягом 21 доби.

Для оцінки ефективності остеогенної індукції контрольний і дослідний зразки культури мікрмаси фіксували 2 % розчином параформальдегіду на 0,1 М PBS протягом 48 год при температурі 4 °С та забарвлювали Alizarin Red S для виявлення солей кальцію.

2.3.5 Спрямоване остеогенне диференціювання культури ММСК жирової тканини мишей у карбомерних гідрогелях

На 14-у добу культивування стандартне середовище для культивування замінювали на середовище для остеогенної індукції, яке складалося з поживного середовища DMEM/F12 (*Sigma-Aldrich*, США) з додаванням 10 % PBS, а також 0,05 мМ L-аскорбінової кислоти 2-фосфату, 100 нМ дексаметазону та 10 мМ β-гліцерофосфату. Заміну середовища для спрямованого диференціювання проводили щотири доби. Загалом, карбомерні гідрогелі з клітинами перебували *in vitro* під впливом середовища для остеогенного диференціювання протягом 21 доби.

Для оцінки ефективності остеогенної індукції контрольний і дослідний зразки гідрогелів фіксували 2 % розчином параформальдегіду на 0,1 М PBS протягом 48 год при температурі 4 °С та забарвлювали Alizarin Red S для виявлення солей кальцію, а також виявляли продукцію лужної фосфатази за допомогою барвника BCIP/NBT.

2.3.6 Спрямоване диференціювання культур ендотеліальних прогеніторних клітин

Культури ендотеліальних прогеніторних клітин з аорти мишей вирощували в чашках Петрі, покритих субстратом Matrigel (*BD Biosciences*, США) у розведенні 1:500, у флаконах для культивування з покриттям фібронектином (*Greiner Bio-One*, Австрія) та у звичайних культуральних флаконах (контрольні зразки).

Повне середовище культивування складалось з середовища DMEM/F-12 (*HyClone*, США), яке містило 10 % FBS, 1 % суміші антибіотиків PenStrep, 10 нг/мл EGF та 20 нг/мл bFGF (все – *Sigma-Aldrich*, США). Культивування усіх зразків проводили за стандартних умов у CO₂-інкубаторі при температурі 37 °C та зволоженій атмосфері з концентрацією CO₂ 5 %. Першу заміну середовища проводили через 7 діб після початку культивування. Подальшу заміну поживного середовища проводили що три доби. Культури субкультивували при досягненні 80 % конфлюентності моношару за допомогою 0,02 % розчину трипсину.

2.3.7 Спрямоване диференціювання прогеніторних клітин з міокарда

Суспензію клітин у кількості 2×10^5 клітин/мл вносили в культуральні флакони Cellcoat (*Greiner Bio-One*, Австрія) з покриттям poly-D-lysine, заповнені ростовим середовищем для кардіосфер (35 % повного середовища IMDM + 65 % DMEM/F12 (*HyClone*, США), що містило 2 % B-27 (*Sigma-Aldrich*, США), 0,1 мМ/л 2-меркаптоетанола (*Sigma-Aldrich*, США), 25 нг/мл EGF (*Sigma-Aldrich*, США), 80 нг/мл bFGF (*Prospec*, США), 4 нг/мл кардіотрофіну-1 (*Prospec*, США), 1 од/мл тромбіну (*Sigma-Aldrich*, США), 100 од/мл пеніциліну (*Sigma-Aldrich*, США), 100 мкг/мл стрептоміцину (*Sigma-Aldrich*, США), 2 мМ/л L-глутаміну (*Sigma-Aldrich*, США). На 2-3 день культивування утворювались кардіосфери, які збирали та переносили в експлантаційне середовище у флакон Cellcoat (*Greiner Bio-One*, Австрія) з покриттям фібронектином. По досягненню 80 % конфлюентності моношару клітини переводили в суспензію з використанням суміші 0,25 % розчину трипсину (*HyClone*, США) з 0,02 % розчином EDTA (*Sigma-Aldrich*, Україна) та проводили субкультивування до 3-го пасажу.

2.3.8 Імунофенотипування клітин методом проточної цитометрії

Досліджувані культури клітин з кісткового мозку, жирової тканини, плаценти, аорти, міокарда та первинну суспензію клітин з тканини міокарда фенотипували методом мультипараметричної лазерної проточної цитометрії з використанням моноклональних антитіл, кон'югованих з флуорохромами, за стандартними операційними процедурами згідно з рекомендаціями фірм-виробників [136].

Суспензію клітин з первинних культур для проточної цитометрії отримували при досягненні 80 % конфлюентності моношару за допомогою 0,25 % розчину трипсину з EDTA. Клітини відмивали за допомогою центрифугування при $400 \times g$ протягом 7 хв у 10 мл поживного середовища DMEM/F12, що містило 2 % FBS, осад ресуспендували в середовищі для досягнення концентрації $2-4 \times 10^6$ клітин/мл.

Зразки міокарда для імунофлуоресцентного дослідження методом проточної цитометрії відмивали у фосфатно-сольовому буфера (pH = 7,4), подрібнювали за допомогою мікроножиць на фрагменти об'ємом $0,5 \text{ мм}^3$ та інкубували в розчині колагенази I типу протягом 1 год при температурі $37 \text{ }^\circ\text{C}$. Після ферментування фрагменти ресуспендували в 1 мл середовища DMEM та фільтрували через клітинний фільтр з розміром пор 100 мкм (*Falcon*, США).

В полістирольні пробірки об'ємом 5 мл вносили 2×10^5 клітин у 50 мкл поживного середовища DMEM та додавали антитіла в титрі 1:50-1:100 ($0,5 \text{ мкг}/10^6$ клітин). Інкубували протягом 20-30 хв при температурі $4 \text{ }^\circ\text{C}$ у захищеному від світла місці, після чого додавали по 1 мл буфера для відмивки CellWash (*Becton Dickinson*, США), який містив 1 % FBS, центрифугували при $350 \times g$ протягом 5 хв з підтриманням температури $4 \text{ }^\circ\text{C}$.

Надосадову рідину видаляли, у пробірки вносили по 300 мкл буфера CellWash та обережно ресуспендували осад клітин. Безпосередньо перед аналізом суспензію пропускали через клітинні фільтри з діаметром пор 70 мкм (*Falcon*, США).

Для імунофенотипування ММСК, ендотеліальних та кардіальних прогеніторів миші використовували такі моноклональні антитіла, мічені флуорохромами: BD Pharmingen™ PerCP-Cy™5.5 Rat Anti-Mouse CD14, PE Rat Anti-Mouse CD31, Alexa Fluor® 647 Rat anti-Mouse CD34, PE Rat Anti-Mouse CD44, PE-Cy™7 Rat Anti-Mouse CD45, APC-Cy™7 Rat Anti-Mouse CD45, PE Rat Anti-Mouse CD73, PE Mouse Anti-Rat CD90/Mouse CD90.1, APC-Cy™7 Mouse Anti-Rat CD90/Mouse CD90.1, Alexa Fluor® 647 Rat Anti-Mouse CD105, PE Rat Anti-Mouse CD117, PE-Cy™7 Rat anti-Mouse CD117, APC Rat Anti-Mouse CD117, Alexa Fluor® 647 Mouse Anti-Cardiac Troponin I, PE Rat Anti-Mouse Ly-6A/E (yci – *BD Biosciences*, США); eBioscience™ PE-Cy7 Rat anti-Mouse CD31/PECAM-1, PE Rat anti-Mouse CD45, APC Rat anti-Mouse CD105/Endoglin, PE CD309/FLK1 (yci – *Invitrogen*, США); APC Rat anti-Mouse CD38 (*US Biological*, США).

Для імунофенотипування культур ММСК та кардіальних прогеніторів людини використовували такі моноклональні антитіла, мічені флуорохромами: BD Pharmingen™ Pacific Blue™ Mouse Anti-Human CD14, APC-Cy™7 Mouse Anti-Human CD14, PE-Cy™7 Mouse Anti-Human CD19, APC Mouse Anti-Human CD19, PE Mouse Anti-Human CD31, APC-Cy™7 Mouse Anti-Human CD31, APC Mouse Anti-Human CD34, PE Mouse Anti-Human CD34, PE-Cy™7 Mouse Anti-Human CD44, FITC Mouse Anti-Human CD45, APC-Cy™7 Mouse Anti-Human CD45, PerCP-Cy™5.5 Mouse Anti-Human CD45, PE Mouse Anti-Human CD73, FITC Mouse Anti-Human CD90, PerCP-Cy™5.5 Mouse anti-Human CD105, APC Mouse Anti-Human CD117, PE Mouse Anti-Human CD133, PE Mouse Anti-Human CD271, Alexa Fluor® 647 Mouse Anti-Human CD309 (VEGFR-2), Anti-HLA-DR APC-Cy™7, Alexa Fluor® 647 Mouse Anti-Cardiac Troponin I, BD Horizon™ BB700 Mouse Anti-Human CD117, V450 Mouse Anti-Human CD146, BV421 Mouse Anti-Human CD166, BD OptiBuild™ BV510 Mouse Anti-Human CD133 (yci – *BD Biosciences*, США); eBioscience™ PE Mouse anti-Human CD44, PE Mouse anti-Human CD117/c-Kit, PE Mouse anti-Human CD309/FLK1 (yci – *Invitrogen*, США); PerCP Mouse anti-Human CD45, PE Mouse anti-Human CD133/1 (yci – *Miltenyi Biotec*, Німеччина); Mouse anti-Human CD34-FITC/CD117-PE/CD45-ECD Antibody Cocktail (*Beckman Coulter*, США).

Фенотипування суспензії клітин з міокарда миші для виявлення донорських клітин проводили з використанням некон'югованих первинних mouse anti-human моноклональних антитіл до мембранних антигенів HLA-ABC людини (*Millipore*, США, кат. № MAB1275, clone 22.63.4), та вторинних rabbit anti-mouse антитіл, мічених флуорохромом PerCP (*Abcam*, США), згідно з рекомендаціями виробника.

Для блокування неспецифічного зв'язування імуноглобулінів з Fc γ III, Fc γ II і Fc γ I миші використовували некон'юговані антитіла BD Pharmingen™ Purified Rat Anti-Mouse CD16/CD32 (Mouse BD Fc Block™). Як ізотип-контроль використовували моноклональні антитіла APC Mouse IgG1 κ Isotype Control, PE Rat Anti-Mouse IgG1 γ Isotype Control та PE Mouse IgG2b κ Isotype Control (yci – *BD Biosciences*, США).

Відсоток загиблих та життєздатних клітин визначали за рівнем проникнення в клітини з пошкодженою мембраною 7-аміноактиноміцину D (7-AAD, *BD Biosciences*, США, кат. № 559925), який додавали в об'ємі 5 мкл на зразок та інкубували протягом 10 хв перед аналізом при 4 °C.

Вимірювання проводили на лазерному проточному цитофлуориметрі-сортері BD FACSAria (*Becton Dickinson*, США) за допомогою програмного забезпечення BD FACSDiva 6.1.2 (*Becton Dickinson*, США). У кожному зразку записували щонайменше 20 тис. подій у файл для подальшого аналізу. Для налаштування компенсації перекриття спектрів емісії флуорохромів при багатопараметричному аналізі було використано контрольні зразки клітин без внесення антитіл (unstained control), зразки з кожним з антитіл окремо (single stained control) і зразки з комбінацією кількох антитіл без одного (fluorescence minus one – FMO control).

Гейтування цільових популяцій проводили в ручному режимі на основі параметрів прямого (FSC), бокового (SSC) світлорозсіювання та флуоресценції. Візуальні дані наведені у вигляді стовпчикових і точкових dot-plot гістограм, а числові опрацьовані з використанням відповідних методів варіаційної статистики [136].

2.3.9 Імуноцитохімічне дослідження клітин

Клітини висаджували на стерильні предметні скельця та культивували в стандартних умовах, залежно від типу. Досліджувану культуру фіксували 4 % розчином параформальдегіду на 0,1 М фосфатному буфері. Зафіксовані препарати перебували в блокуючому неспецифічне зв'язування білків розчині, який містив 0,1 М фосфатного буферу (pH 7,4), 0,5 % бичачого сироваткового альбуміну та 0,3 % Тритон X-100 (все – *Sigma-Aldrich*, США).

Дослідження культур ММСК кісткового мозку, спрямовано диференційованих в остеогенному або хондрогенному напрямках, проводили з використанням первинних антитіл кроля проти Osteopontin (*Abcam*, США, кат. #ab91655) та миші проти Collagen type II (*Abcam*, США, кат. #ab3092-500). Інкубацію препаратів у розчині первинних антитіл з титром 1:1000 проводили протягом 12 год при 4 °С. Зразки промивали фосфатним буфером і для візуалізації специфічного зв'язування первинних антитіл наносили на 6 год вторинні антитіла, мічені флуорохромами: donkey anti-rabbit DyLight® 549 (*Abcam*, США, кат. #ab98489) та donkey anti-mouse Alexa Fluor® 546 (*Invitrogen*, США, кат. #A10036), відповідно.

Для оцінки експресії прогеніторними клітинами міокарда в культурі *in vitro* маркера кардіоміоцитів тропоніну та ендотеліального маркера CD31 були використані первинні антитіла anti-troponin I (*BD Biosciences*, США) у титрі 1:1500 та anti-CD31 (*BD Biosciences*, США) у титрі 1:1000, відповідно. Інкубацію препаратів проводили протягом 12 год при 4 °С. Первинні антитіла візуалізували відповідними вторинними donkey anti-mouse антитілами, кон'югованими з флуорохромом AlexaFluor 488 (*Invitrogen*, США).

Забарвлені цитопрепарати покривали середовищем Immu-MOUNT (*Thermo Fisher Scientific*, США) та досліджували за допомогою інвертованого мікроскопа з блоком люмінесценції IX71 (*Olympus*, Японія), а також конфокального скануючого мікроскопа FV1000-BX61WI (*Olympus*, Японія). Кількісний аналіз зображень проводили за допомогою програми ImageJ (*National Institutes of Health*, США).

2.3.10 Електронно-мікроскопічне дослідження ММСК

Клітини 2-го пасажу в моношарі або культури мікромаси фіксували за допомогою 4 % розчину формальдегіду і 2,5 % розчину глутаральдегіду. Після фіксації клітини промивали в 0,1 М PBS та дофіксували в 1 % осмії на 0,1 М PBS, зневоднювали в зростаючих концентраціях етанолу, а потім переносили в епоксидну смолу Epon 812 (*Fluka*, Швейцарія).

Напівтонкі зрізи виготовляли за допомогою скляного ножа і фарбували 1 % метиленовим синім. Ультратонкі зрізи нарізали за допомогою діамантового ножа і контрастували цитратом свинцю (*Fluka*, Швейцарія) і ураніл ацетатом (*Merck*, Німеччина). Зрізи досліджували на електронному мікроскопі 100-CX TEM (*JEOL*, Японія) при напрузі 80 кВ.

2.3.11 Гістологічне дослідження тривимірних культур клітин

Для гістологічного дослідження культуру мікромаси фіксували 4 % розчином параформальдегіду на 0,1 М PBS та дофіксували в 1 % розчині OsO₄ протягом 1 год. Культуру заливали в епоксидні смоли Epon-Araldit за стандартною методикою. Напівтонкі зрізи товщиною 2 мкм отримували на ультрамікротомі LKB 8800 (*Bromma*, Швеція), забарвлювали толуїдиновим синім і крезилвіолетом та досліджували за допомогою світлового мікроскопа.

Препарати гідрогелів для гістологічного дослідження фіксували в 4 % розчині параформу протягом 24 год. Після фіксації препарати зневоднювали за стандартною методикою в розчинах етанолу зростаючої концентрації та в бензолі: 30 хв у 70 % розчині етанолу; 30 хв – у 80 % розчині етанолу; 30 хв – у 90 % розчині етанолу; 30 хв – у 96 % розчині етанолу; 12 год у 96 % розчині етанолу; 30 хв у 100 % розчині етанолу; 30 хв у суміші 100 % етанолу та бензолу в співвідношенні 1:1; двічі по 30 хв у бензолі. Препарати витримували в суміші бензолу і парафіну в співвідношенні 1:1 протягом 30 хв при температурі 37 °С, тричі переносючи в розплавлений при 57 °С парафін типу 6 (*Richard-Allan Scientific*, США).

За допомогою ротаційного мікротому HM 325 (*Microm*, Німеччина) робили гістологічні зрізи товщиною 6 мкм, переносили їх на предметні скельця і

висушували в термостаті при 37 °С. Зрізи депарафінували двічі по 5 хв у бензолі і витримували 5 хв у 96 % етанолі та 5 хв у 70 % розчині етанолу.

Зрізи забарвлювали розчином гематоксиліну Ерліха протягом 10 хв, промивали і забарвлювали 0,1 % розчином еозину протягом 2 хв. Препарати зневоднювали в 96 % розчині етанолу протягом 3 хв, двічі відмивали в бензолі, заливали канадським бальзамом і покривали покривними скельцями. Отримані зрізи досліджували за допомогою світлооптичного мікроскопа ВХ 51 (*Olympus*, Японія). Морфометричний аналіз проводили за допомогою програмного забезпечення "Image J" (*National Institutes of Health*, США).

2.4 Доклінічна оцінка регенеративних ефектів стовбурових клітин на моделях пошкодження тканин у мишей

2.4.1 Моделювання пошкодження кісткової тканини

Пошкодження кістки в мишей здійснювали за розробленою нами методикою (пат. України № 60512). Мишам лінії FVB (n = 46) під загальною анестезією (2,5 % розчин авертину 400 мг/кг) після обробки шкіри операційного поля 70 % розчином етанолу проводили розріз шкіри в середній третині стегна і за допомогою хірургічних пінцетів розводили передню та медіальну групи м'язів для оголення стегнової кістки. У нижній третині стегнової кістки перпендикулярно до краніальної поверхні за допомогою стоматологічного бора діаметром 1 мм, закріпленого в електродрилі, створювали дефект кісткової тканини на глибину до ендосту. Дефект прикривали м'язами і розріз шкіри зашивали П-подібним швом, для легкого повторного розкриття рани перед трансплантацією клітин у зону пошкоджень у ранні терміни.

Через 24 год рану відкривали повторно і у створений дефект правої стегнової кістки поміщали сформовану культуру мікромаси ММСК діаметром 1 мм, а пошкодження лівої стегнової кістки слугувало контролем природної регенерації тканини. Кістки прикривали м'язами і зашивали рану шкіри. Тварини підлягали евтаназії через 3 тижні від початку експерименту. Виділяли стегнові кістки і проводили гістологічне дослідження зони пошкодження.

2.4.2 Моделювання критичної ішемії кінцівок

Мишам лінії FVB (n = 34) під загальною анестезією (2,5 % розчин авертину 400 мг/кг) після обробки операційного поля 70 % розчином етанолу проводили розріз шкіри по медіальній поверхні стегна миші від коліна до пахової складки. Шкіру відпрепарували від поверхневих фасцій та краї рани максимально розводили ранорозширювачами. Двома затискачами фіксували жирову тканину пахової ділянки і роз'єднували її за допомогою електрокоагулятора. Між передньою і медіальною групами м'язів візуалізували судинно-нервовий пучок стегна. За допомогою мікрохірургічних пінцетів стегнову артерію відпрепарували від вени і нерва в ділянці після відходження гілки *a.epigastrica* та в місці переходу в *a.poplitea*. Після виведення судини з фасціального футляру накладали подвійні лігатури в проксимальній та дистальній точках, артерію пересікали і шкіру зашивали безперервним обвивним швом.

У першій серії експериментів через 24 год після моделювання критичної ішемії кінцівки під загальною анестезією (2,5 % розчин авертину 400 мг/кг) обробляли операційне поле на стегні та знімали провізорні шви, відкриваючи ділянку перев'язки стегнової артерії. Під шкірою формували ложе під розміри трансплантата та підсаджували гідрогель, заселений ММСК жирової тканини. Рану зашивали безперервним обвивним швом. Через 2 та 4 тиж. після трансплантації тварини підлягали евтаназії, трансплантати препарували та досліджували за допомогою гістологічних методів.

В іншій серії експериментів через 3 тиж. після моделювання критичної ішемії кінцівок тваринам за допомогою інсулінового шприца за допомогою 3 мікроін'єкцій у м'язи гомілки трансплантували 1×10^6 розморожених та відмитих ендотеліальних прогеніторних клітин з аорти миші в 100 мкл 0,9 % розчину NaCl. Тваринам контрольної групи вводили аналогічним способом 100 мкл 0,9 % розчину NaCl.

У третій серії експериментів через 3 тиж. після моделювання ішемічного пошкодження тваринам під загальною анестезією (2,5 % розчин авертину 400 мг/кг) в асептичних умовах розсікали шкіру стегна та трансплантували у сформоване підшкірне ложе над стегновою артерією гідрогель, заселений

ендотеліальними прогеніторними клітинами з аорти миші. Тваринам контрольної групи трансплантували гідрогель без клітин. Рану зашивали безперервним обвивним швом та обробляли антисептиками.

2.4.3 Моделювання пошкодження міокарда

Для моделювання кардіоміопатії в мишей лінії FVB ($n = 38$) застосовували підшкірне введення препарату ізопротеренол (*Sigma-Aldrich*, США) в дозі 100 мг/кг у 0,1 мл 0,9 % розчину NaCl протягом 5 днів. Як контрольну групу використовували тварин, яким вводили 0,1 мл 0,9 % розчину NaCl підшкірно за аналогічною схемою. Перед введенням препарату, через 3 та 7 тиж. після першої ін'єкції виконували електрокардіографію, визначали толерантність до фізичного навантаження та проводили гістологічне дослідження міокарда.

Через 21 добу після першого введення ізопротеренолу виконували трансплантацію 1×10^6 ММСК плаценти людини в 0,9 % розчині NaCl у хвостову вену в об'ємі 100 мкл. Тваринам контрольної групи вводили 0,9 % розчин NaCl за аналогічною схемою. Через 7 діб записували ЕКГ. Через 2 або 28 діб після трансплантації клітин тварини підлягали евтаназії. Виділені на секції серця промивали в 1 мл 0,9 % розчину NaCl та розрізали на фрагменти для імунофлуоресцентного дослідження міокарда методом проточної цитометрії та імуногістохімії на виявлення донорських клітин, а також для гістологічного дослідження.

Додатково було розроблено модель локального термічного пошкодження серця, яка передбачає оперативний доступ через абдомінальний розріз та локальне пошкодження його верхівки через діафрагму металевим зондом, нагрітим до температури 100 °C, протягом 20 секунд. При такому способі відсутня необхідність інтубації трахеї та штучної вентиляцію легень з використанням високовартісного обладнання; зменшується тривалість оперативного втручання. Температура нагрівання зонда та час його контакту забезпечують оптимальні показники глибини пошкодження міокарда та не викликають загибелі експериментальних тварин, що дозволяє стандартизувати місце, площу та глибину ураження для його подальшого гістологічного аналізу.

2.4.4 Моделювання дисфункції ніші ММСК жирової тканини мишей

Для відтворення умов пошкодження ніші стовбурових клітин жирової тканини використовували модель оваріоектомії [326]. Оваріоектомію проводили мишам лінії СВА/Са під загальною анестезією (2,5 % розчин авертину 400 мг/кг внутрішньоочеревинно). Голили дорсальну поверхню тіла та обробляли операційне поле 70 % етанолом. Робили розріз шкіри довжиною 1-2 см по серединній лінії спини на рівні поперекового відділу хребта. Рану розширювали пінцетами, шкіру обережно відпрепарували від фасцій тупим зондом. Під м'язами бокової стінки живота, візуалізували жирову подушку, що вкриває яєчник. Безпосередньо над нею виконували розріз м'язів до 0,5 см, виводили назовні жирову подушку разом з яєчником, перев'язували ріг матки шовним матеріалом та відсікали яєчник мікрохірургічними ножицями. Після контролю гемостазу ріг матки повертали в черевну порожнину, краї м'язів зшивали П-подібним швом. Процедуру повторювали з протилежного боку з другим яєчником. Після двосторонньої оваріоектомії рану шкіри зашивали безперервним вузловим швом та обробляли порошком гентаміцину сульфату "Гентаксан" (Борщазівський ХФЗ, Україна). Контрольним тваринам виконували псевдооперацію, яка передбачала аналогічні етапи хірургічного втручання за винятком видалення яєчників.

2.4.5 Гістологічне дослідження тканин

Після евтаназії тварин за допомогою хірургічних інструментів препарували та висікали стегнові кістки, м'язи гомілки або серця. Стегнові кістки, біоптати стегнових м'язів та міокарда для гістологічного дослідження фіксували в 4 % розчині параформальдегіду на PBS (рН = 7,4) протягом 24 год. Для декальцинування стегнові кістки після фіксації поміщали на 24 год при температурі 20-24 °С у розчин Ріхмана-Гельфанда-Хілла, що містив 8 % соляної кислоти (1 н) і 10 % мурашиної кислоти та промивали в проточній воді.

Після фіксації препарати зневоднювали за стандартною методикою в розчинах етанолу зростаючої концентрації та в бензолі: 30 хв у 70 % розчині

етанолу; 30 хв – у 80 % розчині етанолу; 30 хв – у 90 % розчині етанолу; 30 хв – у 96 % розчині етанолу; 12 год у 96 % розчині етанолу; 30 хв у 100 % розчині етанолу; 30 хв у суміші 100 % етанолу та бензолу в співвідношенні 1:1; двічі по 30 хв у бензолі. Для стегнових кісток кожен етап повторювали двічі. Препарати витримували в суміші бензолу і парафіну в співвідношенні 1:1 протягом 30 хв при температурі 37 °С, тричі переносили в розплавлений при 57 °С парафін типу 6 (*Richard-Allan Scientific*, США).

За допомогою ротаційного мікротому НМ 325 (*Microm*, Німеччина) робили гістологічні зрізи товщиною 6 мкм для міокарда та 12 мкм для стегнових кісток і м'язів, переносили їх на предметні скельця і висушували в термостаті при температурі 37 °С. Зрізи депарафінували двічі по 5 хв у бензолі і витримували 5 хв у 96 % етанолі та 5 хв у 70 % етанолі.

Зрізи забарвлювали розчином гематоксиліну Ерліха протягом 10 хв, промивали і забарвлювали 0,1 % розчином еозину протягом 2 хв. Зрізи м'язової тканини стегна та міокарда додатково забарвлювали трихромом за Массоном. Препарати зневоднювали в 96 % розчині етанолу протягом 3 хв, двічі відмивали в бензолі, заливали канадським бальзамом і вкривали покривними скельцями. Зрізи досліджували за допомогою світлооптичних мікроскопів ВХ 51 (*Olympus*, Японія) та Ахіолаб (*Carl Zeiss*, Німеччина). Морфометричний аналіз проводили за допомогою програмного забезпечення "Image J" (*National Institutes of Health*, США).

2.4.6 Імуногістохімічне дослідження міокарда

Парафінові зрізи, отримані за аналогічною методикою, як для гістологічного дослідження, депарафінували двічі по 5 хв при 37 °С у хлороформі, регідратували 5 хв при кімнатній температурі в 100 % розчині етанолу, 3 хв – у 96 %, 1 хв – у 70 %, 1 хв – у 50 % розчині етанолу та двічі по 5 хв у 0,1 М фосфатно-сольовому буфері (рН = 7,4).

Для пермеабілізації зразки обробляли 0,3 % розчином Triton X-100 (*Sigma-Aldrich*, США) на 0,1 М фосфатному буфері при кімнатній температурі протягом 10 хв. Неспецифічне зв'язування блокували протягом 30 хв при кімнатній

температурі за допомогою 0,1 М фосфатного буферу, що містив 1 % нормальної сироватки кіз (*Sigma-Aldrich*, США), 0,3 % Triton X-100 та 0,5 % сироваткового альбуміну бика (*Sigma-Aldrich*, США).

Первинні мишачі антитіла проти мітохондрій людини (*Molecular Probes Inc.*, США) в розведенні 1:50 на 0,1 М фосфатному буфері, що містив 0,3 % Triton X-100 та 0,5 % сироваткового альбуміну бика, наносили на зрізи та інкубували при температурі 4 °С протягом 18 год. Після інкубації препарати відмивали від первинних антитіл тричі по 10 хв у 0,1 М фосфатному буфері.

Зрізи інкубували протягом 1,5 год при кімнатній температурі з кролячими вторинними антитілами, кон'югованими з флуорохромом Alexa 488 (*Molecular Probes Inc.*, США), у розведенні 1:1000 на 0,1 М фосфатному буфері. Після інкубації препарати відмивали від вторинних антитіл тричі по 10 хв у 0,1 М фосфатному буфері. Для візуалізації ядер зрізи інкубували з барвником Hoechst 33342 (*Molecular Probes Inc.*, США) у розведенні 1:10000 протягом 5 хв при кімнатній температурі та відмивали 10 хв у 0,1 М фосфатному буфері.

Предметні скельця покривали бальзамом для люмінесцентної мікроскопії Vectashield Mount Medium (*Vector*, США) та досліджували на лазерному скануючому конфокальному мікроскопі FV 1000-BX61 Wi (*Olympus*, Японія) за допомогою прикладного програмного забезпечення.

2.4.7 Лазерна доплерівська флоуметрія

Для оцінки рівня перфузії м'язів гомілки та стегна використовували лазерну доплерівську флоуметрію. Під загальною анестезією (2,5 % розчин авертину 400 мг/кг) після обробки операційного поля 70 % розчином етанолу проводили розріз шкіри по медіальній поверхні гомілки довжиною 2 мм. Оптичне волокно лазерного доплерівського флоуметра moorVMS-LDF-1 (*Moor Instruments*, Великобританія) прикладали перпендикулярно до м'язів гомілки та проводили запис рівня перфузії за допомогою програмного забезпечення moorVMS, v.2.1 (*Moor Instruments*, Великобританія). Дані реєстрували тричі по 1 хв для кожної кінцівки. Рану шкіри зашивали одинарним вузловим швом.

2.4.8 Електрокардіографія в мишей

Реєстрацію ЕКГ проводили на термопапір за допомогою портативного електрокардіографа Biomedica-2240 (OTE, Італія). Тварин вводили в наркоз та фіксували електроди зі зволженими серветками на кінцівках за стандартною схемою: червоний – права передня кінцівка, жовтий – ліва передня, зелений – ліва задня, чорний – права задня. Реєстрували ЕКГ у відведеннях I, II, III, aVR, aVL, aVF протягом 4-5 сек у кожному відведенні при швидкості протягування термопаперу 50 мм/сек.

Розраховували частоту серцевих скорочень, тривалість та амплітуду комплексу QRS, характеристики сегменту ST, визначали екстрасистоли та їх тип [146]. Після запису ЕКГ тварини підлягали відновленню протягом 2 годин перед подальшими дослідженнями.

2.4.9 Оцінка толерантності до фізичного навантаження

Тест примусового плавання в мишей використовується для оцінки психосоматичних реакцій піддослідних тварин на різноманітні впливи, а також для визначення толерантності серцево-судинної системи до фізичного навантаження [57].

Мишей поміщали в прозорий скляний циліндр висотою 30 см та діаметром 150 мм, заповнений водою з температурою 30 °С. Рівень води складав 20 см, що не дозволяло тваринам ставати задніми кінцівками на дно, а гладкі стінки не давали змоги опиратись на них для відпочинку. Миші вимушені були утримувати власне тіло на поверхні води шляхом плавання в обмеженому просторі.

Секундоміром визначали час активного плавання до першої зупинки при втомі для відпочинку, а також загальний час вимушеного плавання, який фіксували після третьої зупинки тварини із зануренням голови під воду. Після дослідження тварин витирали та поміщали в суху нагріту до 30 °С клітку. Дослідження проводили у визначені експериментом строки двічі з інтервалом 2 год та розраховували середнє арифметичне двох спроб.

2.5 Пілотне клінічне дослідження безпеки та ефективності трансплантації ММСК плаценти людини у хворих з ішемічною кардіоміопатією

У пілотне клінічне дослідження було залучено 8 пацієнтів віком від 27 до 67 р., серед яким було 7 чоловіків та 1 жінка. Усі пацієнти мали діагноз ішемічної кардіоміопатії, ускладненої серцевою недостатністю III-IV функціонального класу за NYHA (New York Heart Association Functional Classification). Спочатку були визначені критерії включення пацієнтів у дослідження: клінічний діагноз ішемічної кардіоміопатії: документована наявність ішемічної хвороби серця за даними коронаро-вентрикулографії, наявність дисфункції лівого шлуночка (за даними електрокардіографії, ехокардіографії, чи МРТ); вік 18-70 років; фракція викиду лівого шлуночка в межах 15-35 %; наявність серцевої недостатності III-IV функціонального класу за NYHA; наявність показань до коронарного шунтування – стеноз основних коронарних артерій > 70 %; наявність постінфарктної зони в більш ніж двох сегментах за даними МРТ; письмова поінформована згода.

Критерії не включення в дослідження передбачали: вік < 18 або більше > 70 років; когнітивні порушення, що унеможливають надання інформованої згоди чи дотримання режиму лікування; участь у інших клінічних дослідженнях; наявність в анамнезі епізодів трансплантації органів чи клітин; переважно септальна локалізація постінфарктної фіброзної зони; необхідність виконання пластики лівого шлуночка; наявність діагностованого супутнього пухлинного процесу в будь-яких органах чи тканинах; протипокази до проведення МРТ; термінальна стадія серцевої недостатності без інфузії катехоламінів; гострий інфаркт міокарда в попередні 28 днів; кардіогенний шок; шлуночкова тахікардія чи фібриляція шлуночків у попередні 28 днів; тромбоз лівого шлуночка; товщина стінки лівого шлуночка < 8 мм у зоні ін'єкції; перенесені раніше кардіохірургічні втручання; вагітність чи потенціальна можливість вагітності (для жінок репродуктивного віку); хронічний гемодіаліз; цироз печінки; гематокрит < 25 %, концентрація лейкоцитів < $2,5 \times 10^9$ /л, концентрація тромбоцитів < 100×10^9 /л; наявність в анамнезі онкозахворювання; активна інфекція; позитивний тест на ВІЛ; позитивний тест чи наявність в анамнезі гепатиту В, С; наркоманія або

алкоголізм в останні 2 роки; хромосомні хвороби; інші стани, що обмежують очікувану тривалість життя до 1 року. Умовами припинення дослідження було визначено розвиток гострого інфаркту міокарда; кардіогенного шоку, шлуночкової тахікардії чи фібриляції шлуночків, гострої ниркової недостатності; діагностування супутнього пухлинного процесу в будь-яких органах; виникнення важких несподіваних побічних реакцій, які можна пов'язати із введенням клітинного препарату; відмова пацієнта від подальшої участі в дослідженні.

Під час проведення дослідження пацієнтам дозволялось застосування препаратів, що призначені лікарем як життєво необхідна терапія, та препаратів, які постійно вживались для лікування супутніх захворювань. Доза препаратів, що приймалися, залишалась незмінною впродовж всього періоду дослідження. Якщо в ході випробування виникала необхідність зміни дози або призначення нового препарату, продовження дослідження для пацієнта допускалось за умови, що ці зміни не мають значного позитивного або негативного впливу на перебіг основного захворювання. Також під час проведення дослідження пацієнтам рекомендувалось дотримувати звичного режиму харчування і фізичних навантажень, уникаючи прийому алкоголю.

Для оцінки безпеки клітинної терапії під час кожного візиту дослідником проводилось опитування пацієнта, при якому враховували наявність і ступінь проявів як прогнозованих, так і несподіваних побічних реакцій. Переносимість і безпеку досліджуваного препарату оцінювали на підставі: 1) об'єктивних даних, отриманих дослідником у ході проведення дослідження; при цьому будь-який, клінічно значущий негативний прояв розглядали як побічне явище, якщо воно не викликане природним перебігом захворювання або очікуваним ефектом від застосування супутньої терапії; 2) суб'єктивних відчуттів пацієнта, таких як біль за грудиною, задишка, набряки, відчуття перебоїв у роботі серця.

Усі випадки побічних реакцій, виявлені пацієнтом або лікарем, включно з явищами, що не мають прямого зв'язку з досліджуваним препаратом, були проаналізовані і зареєстровані в історії хвороби та індивідуальній реєстраційній формі хворого із зазначенням часу виникнення і припинення, характеру, ступеня

тяжкості, взаємозв'язку з досліджуваним препаратом, описом заходів, які були потрібні для ліквідації, результату. Оцінку якості життя проводили за опитувальниками MLHFQ (Minnesota Living with Heart Failure Questionnaire) та HeartQoL (Heart Quality of Life). Поряд із стандартними загально-клінічними лабораторними дослідженнями, інструментальне дослідження показників фракції викиду та регіонарної скоротливості міокарда проводили методом speckle-tracking-ехокардіографії.

Для трансплантації використовували препарат кріоконсервованих алогенних ММСК плаценти людини, виготовлений в Інституті клітинної терапії. Клітинний препарат доставляли з кріобанку в парах рідкого азоту та в передопераційній розморожували і відмивали від кріопротектора за стандартною процедурою. Через торакальний доступ під час реваскуляризаційного оперативного втручання на серці за допомогою шприца з голкою виконували до 25 інтраміокардіальних мікроін'єкцій по 0,2-0,4 мл суспензії клітин у 0,9 % розчині NaCl загальним об'ємом до 6 мл. Загальна терапевтична доза для ММСК плаценти становила 15×10^7 клітин. Контрольні етапи дослідження передбачали оцінку даних на початку дослідження, через 1, 2, 3, 6 та 12 місяців після трансплантації клітин.

2.6 Статистичний аналіз даних

Статистичний аналіз результатів проводили за допомогою методів параметричної (t-критерій Стьюдента) та непараметричної (U-критерій Вілкоксона-Манна-Уїтні) статистики [102]. Нормальність розподілу визначали за допомогою критерію Шапіро-Уїлка. Обробку даних проводили за допомогою програмного забезпечення MS Excel 2010 (Microsoft, США) та Statistica 7.0 (StatSoft Inc., США). Вибірка даних у досліджах *in vivo* містила результати, отримані з груп по 4-12 тварин, для дослідів *in vitro* – як мінімум з 3-х експериментів. Серії експериментів проводили методом рандомізованих блоків. Результати для кожної експериментальної групи наведені у вигляді середнього арифметичного \pm стандартна похибка середнього (Mean \pm SEM). Відмінності середніх значень показників між групами порівняння вважали достовірними при $p < 0,05$.

РОЗДІЛ 3 ХАРАКТЕРИСТИКА ТА РЕГЕНЕРАТИВНИЙ ПОТЕНЦІАЛ ММСК ЖИРОВОЇ ТКАНИНИ МИШЕЙ

3.1 Порівняльна характеристика моношарових культур ММСК кісткового мозку та жирової тканини мишей *in vitro*

Для підтвердження відповідності досліджуваних в подальших експериментах культур критеріям ММСК та визначення переваг оптимального джерела стовбурових клітин було проведено оцінку морфофункціональних характеристик культур адгезивних клітин, отриманих з підшкірної та вісцеральної жирової тканини мишей, у порівнянні з культурами клітин з кісткового мозку, як найбільш відомого та дослідженого джерела.

На першому пасажі культура ММСК кісткового мозку була гетерогенною за морфологічними характеристиками. Окрім переважної кількості веретеноподібних клітин спостерігали присутність округлих за формою клітин. Ймовірно, вони є частиною пулу адгезивних гемопоетичних попередників макрофагально-моноцитарного ряду, які елімінувались в подальших пасажах. У динаміці культивування клітини в культурі кісткового мозку мали певні морфологічні відмінності, а саме: вони збільшувалися в розмірах, переважна кількість характеризувалася полігональністю з більшою площею адгезії з поверхнею.

На 2-3 пасажі округлі неадгезивні клітини були відсутні, переважна кількість клітин невеликі за розмірами і мали веретеноподібну форму, моношар формували рівномірно (рис. 3.1 А). На 3-4 пасажі в культурах кісткового мозку були присутні переважно великі розпластані багатоядерні або одноядерні клітини, які не досить активно проліферували, тому моношар формувався повільно (рис. 3.1 Б).

В культурі клітин з вісцеральної жирової тканини початкова популяція складалась з відносно швидко проліферуючих адгезивних клітин зірчастої форми; невеликих фібробластоподібних клітин, здатних до утворення колоній навіть після другого пасажу; багатоядерних або одноядерних великих клітин зі значною кількістю виражених ядерців, які були локалізовані у ядрі досить рівномірно. Також були присутні округлі, ймовірно, гемопоетичні прогеніторні клітини, які

виживали завдяки прикріпленню до адгезивних розпластаних клітин, а також епітеліоподібні клітини, які формували острівці з вираженою крайовою ділянкою, що вказує на суттєву роль контактної міжклітинної взаємодії в умовах культивування *in vitro*.

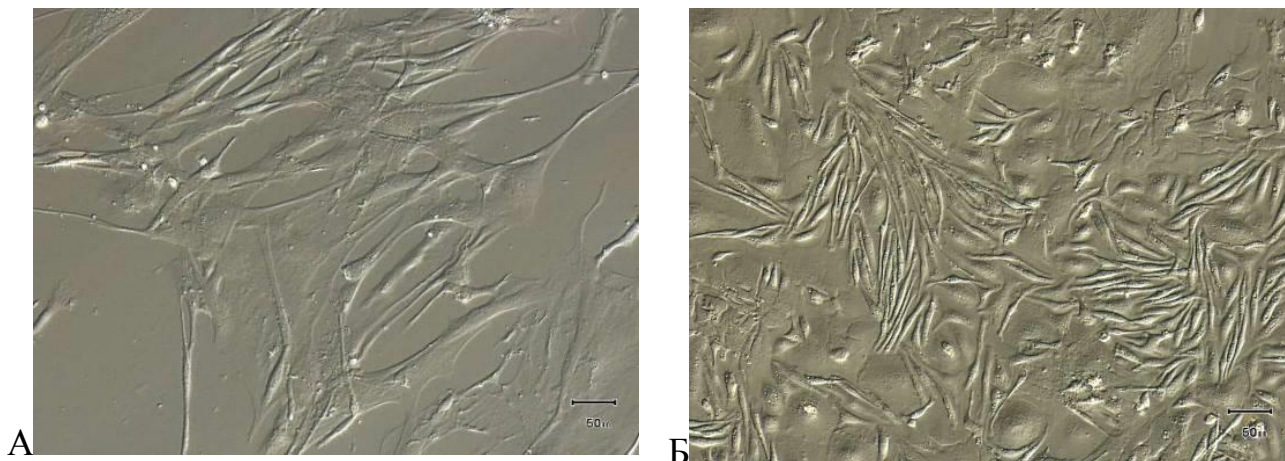


Рисунок 3.1 – Мікрофото культур стромальних клітин кісткового мозку миші: 2-й пасаж (А), 3-й пасаж (Б). Світлова мікроскопія, фазовий контраст, шкала – 50 мкм.

На 2-3 пасажах культура містила досить видовжені веретеноподібні клітини, які при ущільненні моношару орієнтувались поздовжньо та формували ділянки паралельно орієнтованих клітин (рис. 3.2 А). Виявлено великі розпластані округлі клітини з одним або багатьма ядрами, подібні до таких в культурах клітин кісткового мозку, які формували гомогенні острівці. Також можна було спостерігати острівці ендотеліоподібних *cobblestone-like* клітин. Культуру вісцеральної жирової тканини культивували 5-7 пасажів, після чого в ній починали переважати великі не проліферуючі клітини. Таке переродження ставало ознакою старіння та загибелі культури.

Початкова культура з підшкірної жирової тканини складалась з гетерогенної популяції клітин, яка досить швидко проліферувала. Присутні короткі клітини трикутної форми з одним довгим виростом цитоплазми; невеликі епітеліоподібні клітини, які формували *cobblestone-like* острівці; видовжені фібробластоподібні

клітини з вираженим ядром і переважно двома гомо- або гетерогенними ядерцями. При висіванні з великою щільністю клітини швидко подвоювали популяцію і за 3-4 доби формували моношар. З пасажами гетерогенність культури зменшувалась.

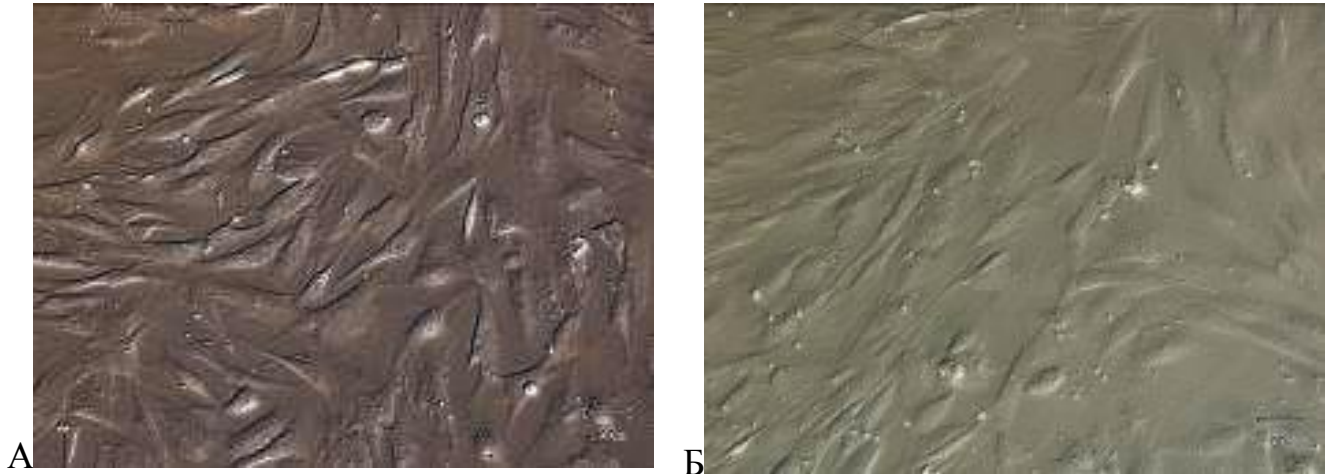


Рисунок 3.2 – Мікрофото культур ММСК з вісцеральної (А) та підшкірної (Б) жирової тканини мишей, 2-й пасаж. Світлова мікроскопія, фазовий контраст; шкала – 50 мкм.

На 2-3 пасажах культури складались з досить видовжених веретеноподібних клітин, які при ущільненні моношару формували ділянки паралельно орієнтованих груп (рис. 3.2 Б). З'являлись великі розпластані округлі клітини з одним або багатьма ядрами, подібні до таких в культурах кісткового мозку, які формували гомогенні острівці.

Культуру клітин підшкірної жирової тканини культивували протягом 8-9 пасажів. Незважаючи на те, що субкультивування проводили за 90-95 % конфлюентності моношару, часові проміжки між пасажами збільшувалися, а кількості клітин на одиницю площі поверхні зменшувалися, що свідчить про зникнення з популяції проліферуючих фібробластоподібних клітин, або їх переродження у великі не проліферуючі клітини. Тому можна зробити висновок про доцільність подальшого використання для трансплантації клітин не пізніше 3-4-го пасажу.

Отже, отримані первинні популяції клітин з усіх досліджуваних джерел були неоднорідними за морфологією на ранніх пасажах. В динаміці культивування популяції ставали більш гомогенними, однак в культурах, насамперед, кісткового мозку залишались присутні клітини з різними характеристиками. За морфологічними параметрами більшість клітин культури ММСК жирової тканини мали витягнуту або полігональну форму з декількома відростками, ядра чітко візуалізувались. У порівнянні з первинною культурою ММСК з кісткового мозку, вони мали значно більші розміри, більшу площу адгезії, та вищу швидкість досягнення граничної конфлюентності. Крім того, для культури ММСК жирової тканини притаманний дифузійний ріст моношару, а в деяких випадках спостерігався ріст шляхом збільшення розмірів колонії клітин. У подальших пасажах культура складалась із адгезивних клітин видовженої форми, які утворювали моношар. Тобто, за морфологічними характеристиками культури клітин з жирової тканини миші більш чітко відповідали класичним критеріям ММСК.

Аналізуючи здатність до колонієутворення трьох типів клітин, було встановлено деякі особливості. Середня кількість отриманих ядровмісних клітин становила: для кісткового мозку з однієї кістки – $18,5 \pm 4,7 \times 10^6$; підшкірної жирової тканини з однієї жирової подушки – $17,7 \pm 9,4 \times 10^6$; вісцеральної жирової тканини аналогічного об'єму – $2,4 \pm 0,6 \times 10^6$ ($n = 10$). Стандартний протокол для клітин кісткового мозку передбачає висівання 2×10^5 ядровмісних клітин на 1 см^2 культуральної поверхні пластикового культурального флакону. Кількість утворених колоній підраховували через 12-13 діб і враховували лише ті колонії, кількість клітин в яких становить не менше 50. В середньому для кісткового мозку цей показник становив $36,8 \pm 6,2$ фібробластоподібних колонієутворюючих одиниць в перерахунку на 10^6 висаджених ядровмісних клітин. При застосуванні цього протоколу до клітин з різних типів жирової тканини середня кількість колоній для підшкірної тканини становила $274,3 \pm 12,1$ колонієутворюючих одиниць, а для вісцеральної жирової тканини – $597,5 \pm 18,3$ колонієутворюючих одиниць в перерахунку на 10^6 висаджених ядровмісних клітин ($p \leq 0,05$).

Було виявлено відмінності в морфології утворюваних колоній клітинами кісткового мозку та жирової тканини. Клітини кісткового мозку були меншими за розмірами, формували компактні колонії, які, розростаючись, займали культуральну поверхню у вигляді моношару, клітини не наповзали одна на одну (рис. 3.3 А, В). В культурі ММСК жирової тканини було виявлено, що клітини мали більш видовжену веретеноподібну форму, а колонії на ранніх стадіях менш компактні в порівнянні з колоніями клітин з кісткового мозку (рис. 3.3 Б). Однак, невдовзі спостерігали утворення нагромаджень клітин у вигляді мікросфер, прикріплених до культуральної поверхні розпластаними елементами по периметру (рис. 3.3 Г).

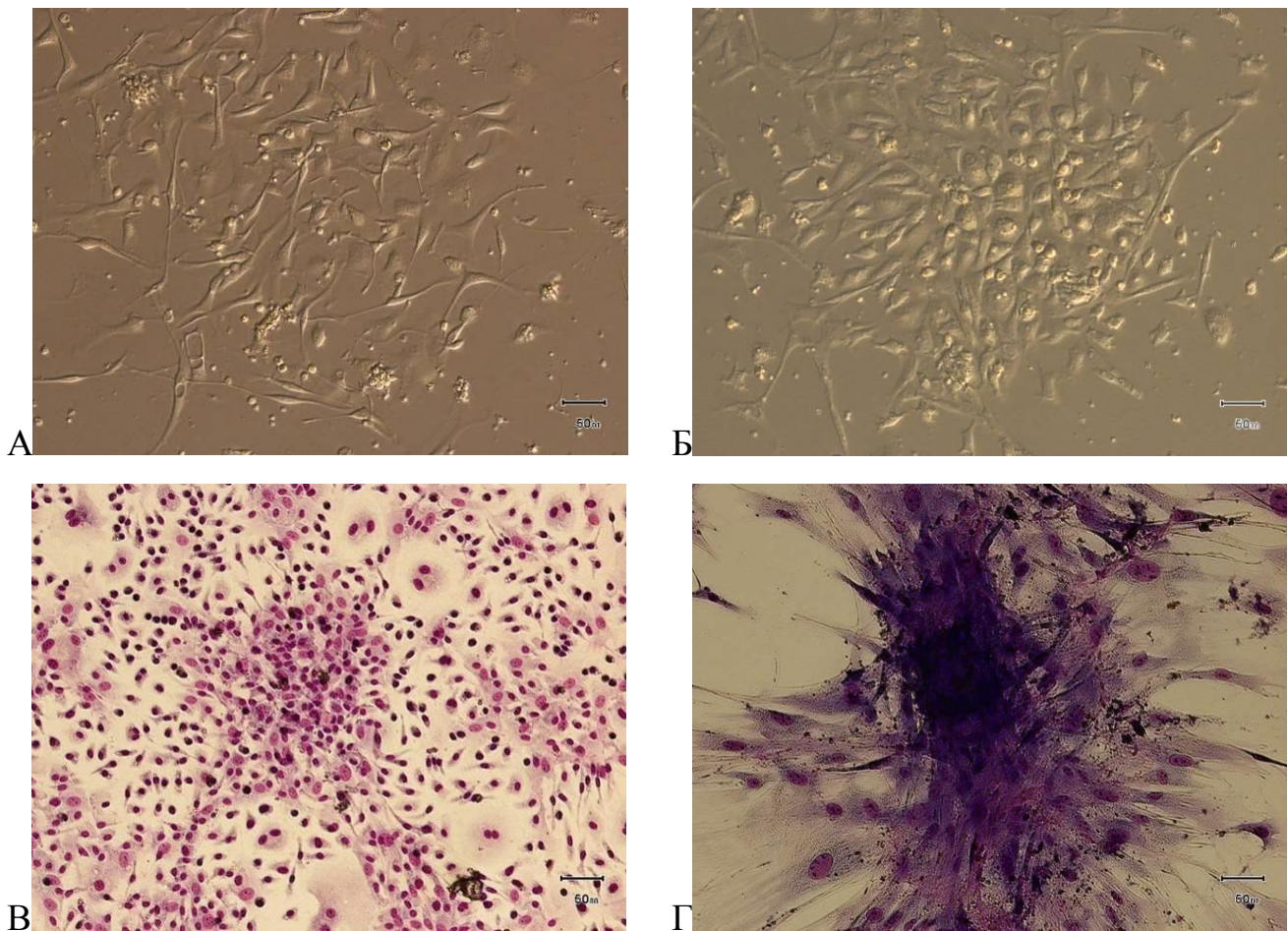


Рисунок 3.3 – Мікрофото культур ММСК кісткового мозку миші на 7-у (А) та 12-у добу культивування (В); та культур ММСК підшкірної жирової тканини миші на 5-у (Б) та 12-у добу культивування (Г). Забарвлення азур-еозином (В, Г). Світлова мікроскопія, фазовий контраст; шкала – 50 мкм.

Час спостереження для клітин з різних типів жирової тканини становив 7-8 діб, оскільки проліферативна активність у них виявилася значно вищою, ніж у клітин кісткового мозку. Тому було вирішено зменшити їх кількість для початку культивування і збільшити час спостереження. В наступному блоці експерименту кількість отриманих ядровмісних клітин після ферментування зразків жирової тканини становила в перерахунку на 1 г: для підшкірної – $10,3 \pm 2,5 \times 10^6$; для вісцеральної – $2,2 \pm 0,8 \times 10^6$ ($n = 8$). За модифікованих умов протоколу кількість висаджених ядровмісних клітин складала 4×10^4 на 1 см^2 культуральної поверхні; підрахунок проводили через 12 діб. В результаті, було отримано культури з різним характером колонієутворення без чіткої кореляції з вихідною кількістю клітин. При зменшенні кількості внесених ядровмісних клітин з підшкірної жирової тканини менше 4×10^4 після завершення терміну культивування колоній зафіксовано не було. Однак, при детальному дослідженні флаконів було виявлено групи елементів різної морфології в складі невеликих колоній, кількість клітин в яких не перевищувала 25 (рис. 3.4).

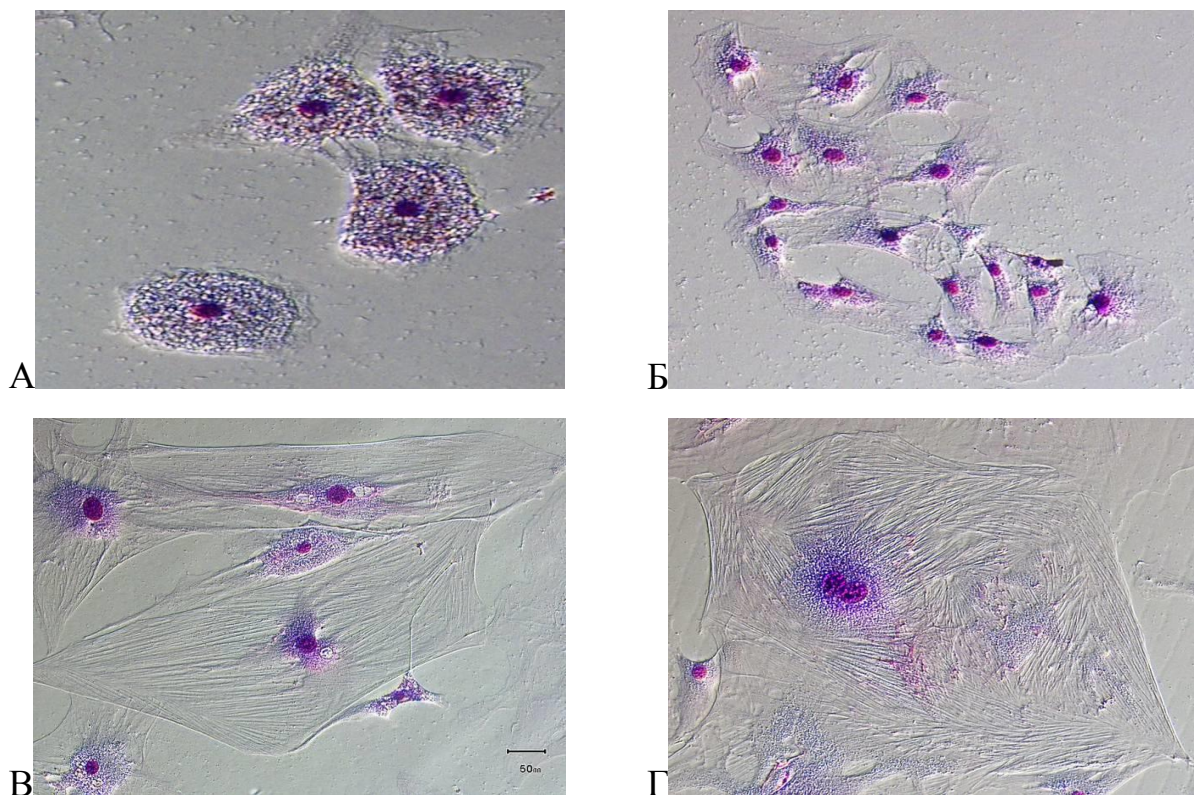


Рисунок 3.4 – Мікрофото цитопрепаратів клітин з різною морфологією в культурі підшкірної жирової тканини миші: А – округлі, діаметром 80-95 мкм; Б –

малі полігональні, розмірами 80 на 60 мкм; В, Г – великі полігональні, розмірами 100-220 на 650 мкм. Забарвлення азур-еозином. Світлова мікроскопія, фазовий контраст; шкала – 50 мкм.

При визначенні ефективності клонування для кожного з типів клітин, було встановлено, що для клітин кісткового мозку цей показник становить 0,0025 %, для клітин підшкірної жирової тканини – 0,0035 %, і для клітин вісцеральної жирової тканини – 0,0112 % (табл. 3.1). Отримані дані цілком збігались з даними літератури щодо вмісту фібробластоподібних колонієутворюючих одиниць в кістковому мозку та в жировій тканині. Після аналізу отриманих величин було встановлено, що вони підпорядковувались розподілу Пуассона щодо рідкісних подій. Зокрема, для кісткового мозку подія зустрічається, в середньому, з частотою 1/40000 (1 колонієутворююча клітина на 40000 ядровмісних клітин в зразку), межі коливання становлять від 1/17000 до 1/125000.

Таблиця 3.1 – Ефективність клонування культур ММСК кісткового мозку мишей.

№	Кількість отриманих мононуклеарних клітин з однієї кістки ($\times 10^6$ клітин/мл)	Кількість утворених колоній в перерахунку на 10^6 мононуклеарних клітин	Ефективність клонування (%)
1	23,4	21,8	0,00218
2	26	7,2	0,00072
3	16,8	59,2	0,00592
4	13,9	12,8	0,00128
5	27,6	8	0,0008
6	13,8	19,4	0,00194
7	8,2	10	0,001
8	16,8	15,6	0,00156
9	18	59,4	0,00594
10	20,4	38,2	0,00382
M\pmm	18,5 \pm 1,9	25,2 \pm 6,4	0,0025 \pm 0,00064

Відомо, що суттєве значення при дослідженні характеристик ММСК належить оцінці їхніх проліферативних властивостей, оскільки культура має максимальні темпи приросту популяції до 4-5 пасажів, після чого відповіді на стимули проліферації і диференціювання уповільнюються. Для аналізу питомих показників приросту клітин *in vitro* було проведено порівняння проліферативного потенціалу культур ММСК кісткового мозку та підшкірної жирової тканини шляхом підрахунку кількості нарощених клітин в різні часові проміжки. На ранніх строках досягнення конфлюентності (1-3-а доба) питома швидкість приросту популяції була достовірно вищою у ММСК жирової тканини (на 71,4 % на 1-му пасажі, 58,1 % на 2-му та 65,5 % на 3-му), в порівнянні з ММСК кісткового мозку (рис. 3.5 А). У проміжку між 4-ю та 6-ю добами в межах кожного пасажу достовірної різниці між питомою швидкістю приросту кількості ММСК різного походження не виявлено (рис. 3.5 Б).

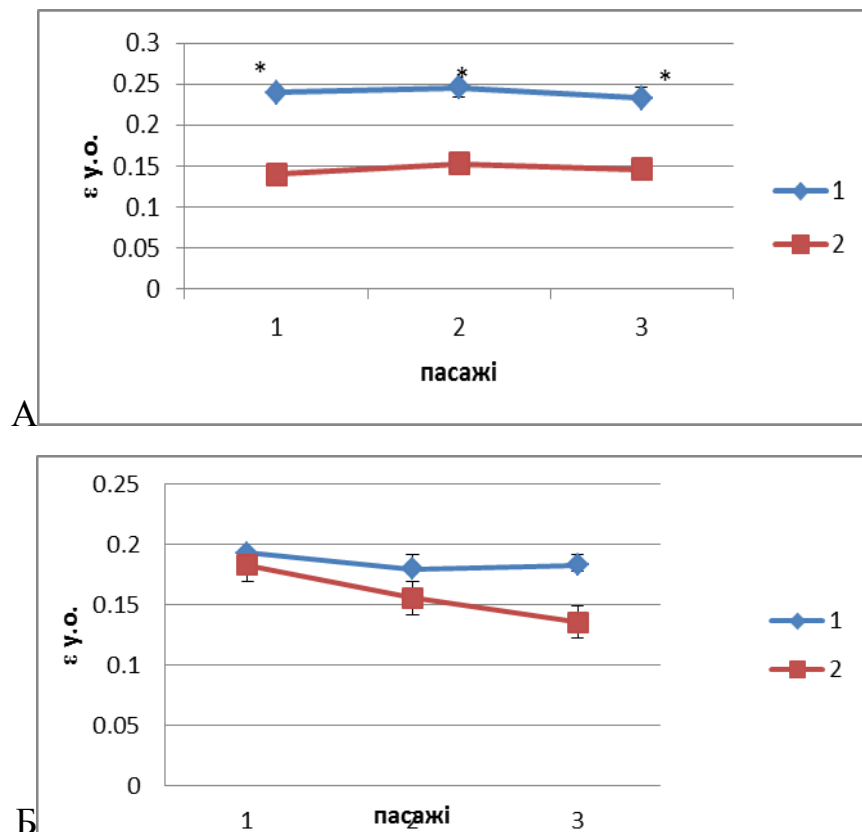


Рисунок 3.5 – Питома швидкість приросту кількості клітин в культурі на ранніх (А) строках досягнення конфлюентності (1-3-а доба) та пізніх (Б) строках (4-6-а доба) протягом 3 пасажів, ум. од. Примітки: 1 – ММСК жирової тканини, 2 – ММСК кісткового мозку; * – $p < 0,05$ у порівнянні з ММСК кісткового мозку.

Вочевидь, це пов'язано з наближенням стаціонарної фази культивування. Але слід зазначити, що стромальні клітини з жирової тканини мали певну тенденцію до більш високих значень цього показника в порівнянні з ММСК кісткового мозку, тобто, фаза логарифмічного росту в них триває довше і тому кількість отриманих клітин більша. При цьому в межах усіх 3 пасажів для ММСК жирової тканини відмічено зниження питомої швидкості приросту популяції до 6-ї доби, в той час як для ММСК кісткового мозку на першому пасажі цей показник наростає та стабілізується на подальших пасажах (рис. 3.6).

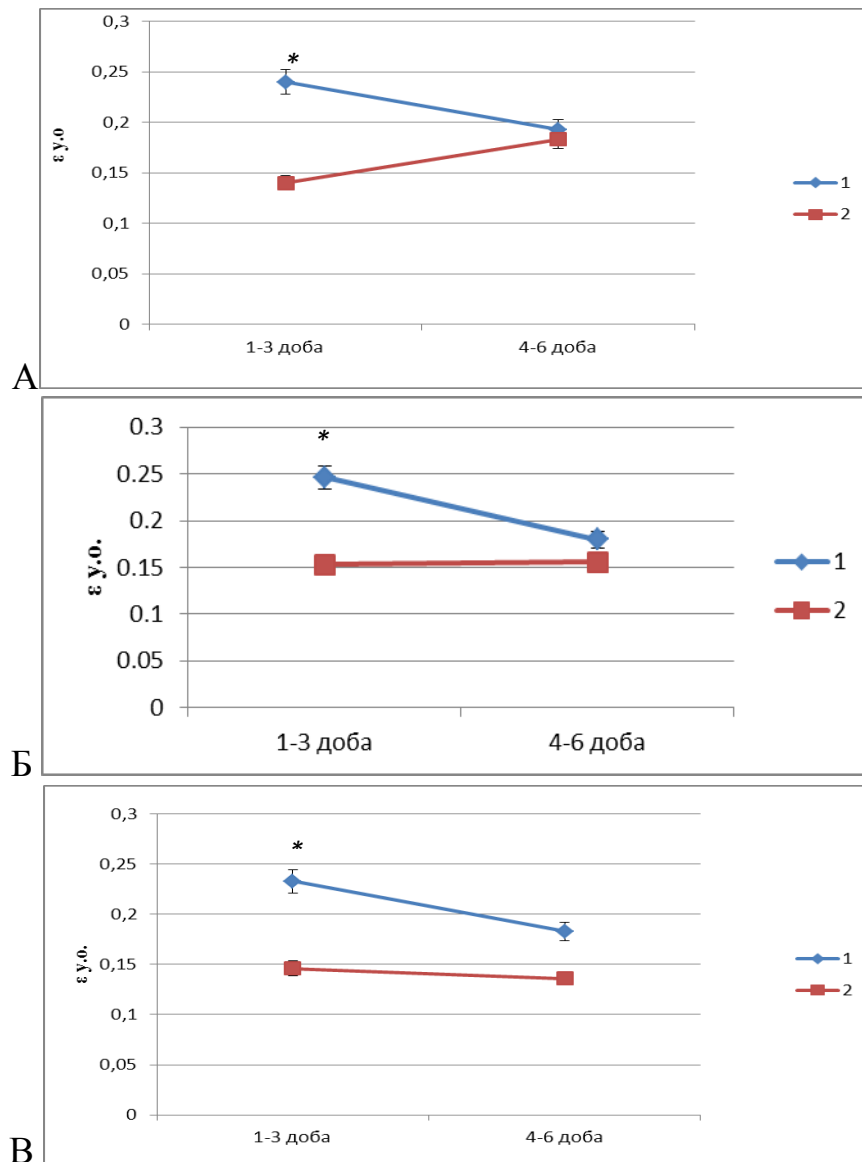


Рисунок 3.6 – Динаміка зміни питомої швидкості приросту кількості клітин в культурі в межах 1-го (А), 2-го (Б) і 3-го (В) пасажів, ум. од. Примітки: 1 – ММСК жирової тканини, 2 – ММСК кісткового мозку; * – $p < 0,05$ у порівнянні з ММСК кісткового мозку.

Також було встановлено, що для культур ММСК кісткового мозку характерний більш тривалий теоретичний максимальний період культивування, в порівнянні з клітинами жирової тканини: 3,2 міс. культивування та 2,9 міс., відповідно (рис. 3.7). Тобто, завдяки більшій проліферативній активності ММСК жирової тканини швидше вичерпують ліміт Хейфліка і культури припиняють ріст раніше.

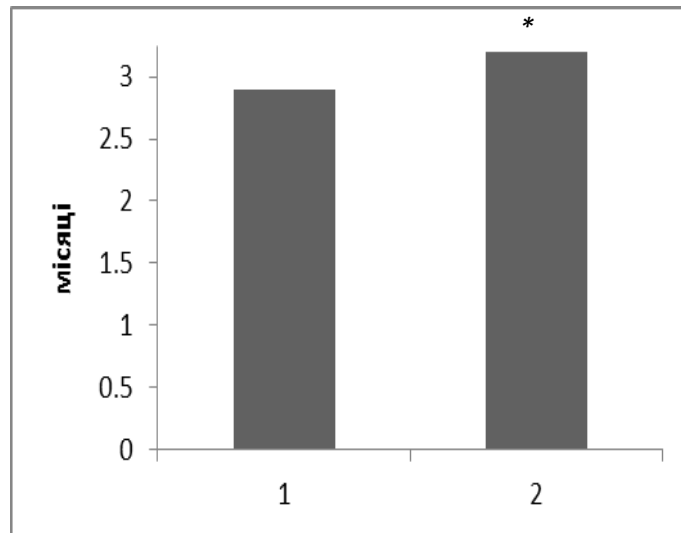


Рисунок 3.7 – Теоретичний максимально можливий час культивування ММСК жирової тканини (1) та кісткового мозку (2).

Примітка: * – $p \leq 0,05$ у порівнянні з ММСК жирової тканини.

Додатково встановлено, що ММСК жирової тканини добре витримують кріозберігання з подальшим культивуванням без зміни фенотипу та суттєвого зниження потенціалу диференціювання. Кріозберігання ММСК дозволяє скоротити час нарощування достатньої для трансплантації клітинної маси, а також використовувати матеріал, взятий у пацієнта заздалегідь, наприклад, до променевої або хіміотерапії. Як кріопротектор традиційно використовують також DMSO у концентраціях від 4 % до 10 %, трегалозу та ін. Якщо за даними літератури у середньому після 1 міс кріозберігання виживають 92 % клітин, через 6 міс – 85 %, а через рік – приблизно 70 %, то у нашому дослідженні при застосуванні 10 % DMSO показник життєздатності розморожених після кріоконсервування ММСК жирової тканини становив $95,2 \pm 1,8$ %.

Наступним критерієм відповідності ММСК є експресія специфічних поверхневих маркерів на мембрані клітин. Серед широкого спектру їхніх фенотипічних характеристик виділяють:

- молекули адгезії: тетраспан (CD9), β 1-інтегрин (CD29), α 4-інтегрин (CD49d), ICAM-1 (CD54), ендоглін (CD105), ALCAM (CD166);
- рецептори гіалуронату (CD44), трансферину (CD71);
- ферменти: амінопептидаза (CD13), 5'-екто-нуклеотидаза (CD73), цинк-зв'язуюча металопротеїназа (CD10);
- молекули екстрацелюлярного матриксу: Thy1 (CD90), Muc18 (CD146), колаген I та III типу, остеопонтин, остеоонектин;
- молекули цитоскелету: віментин і гладком'язовий альфа-актин;
- компоненти системи комплементу: фактор, що посилює розпад комплементу (CD55), протектин (CD59).

При цьому культивовані ММСК не повинні нести на собі деякі молекули адгезії α M-інтегрин (CD11b), β 2-інтегрин (CD18), ICAM-3 (CD50), NCAM (CD56), E-селектин (CD62E), β 4-інтегрин (CD104), Fc-рецептор (CD16), а також гемопоетичні маркери CD14, CD31, CD45 та антигени головного комплексу гістосумісності HLA-DR.

За допомогою методу проточної цитометрії на лазерному проточному цитофлюориметрі-сортері BD FACSAria було проведено мультипараметричне імунофенотипування для порівняльного аналізу експресії маркерів CD34, CD44, CD45, CD73, CD90, CD117, Sca-1, CD38 в культурі клітин кісткового мозку, підшкірної та вісцеральної жирової тканини.

Встановлено, що за деякими показниками клітини з жирової тканини обох типів подібні до клітин кісткового мозку, а за іншими суттєво відрізнялись. Для культур ММСК кісткового мозку на перших пасажах характерна відносно висока експресія гемопоетичних маркерів CD45 та CD117 (> 5 %), в той час як рівень CD90 може бути досить низьким – 22 ± 4 % (рис. 3.8) [183].

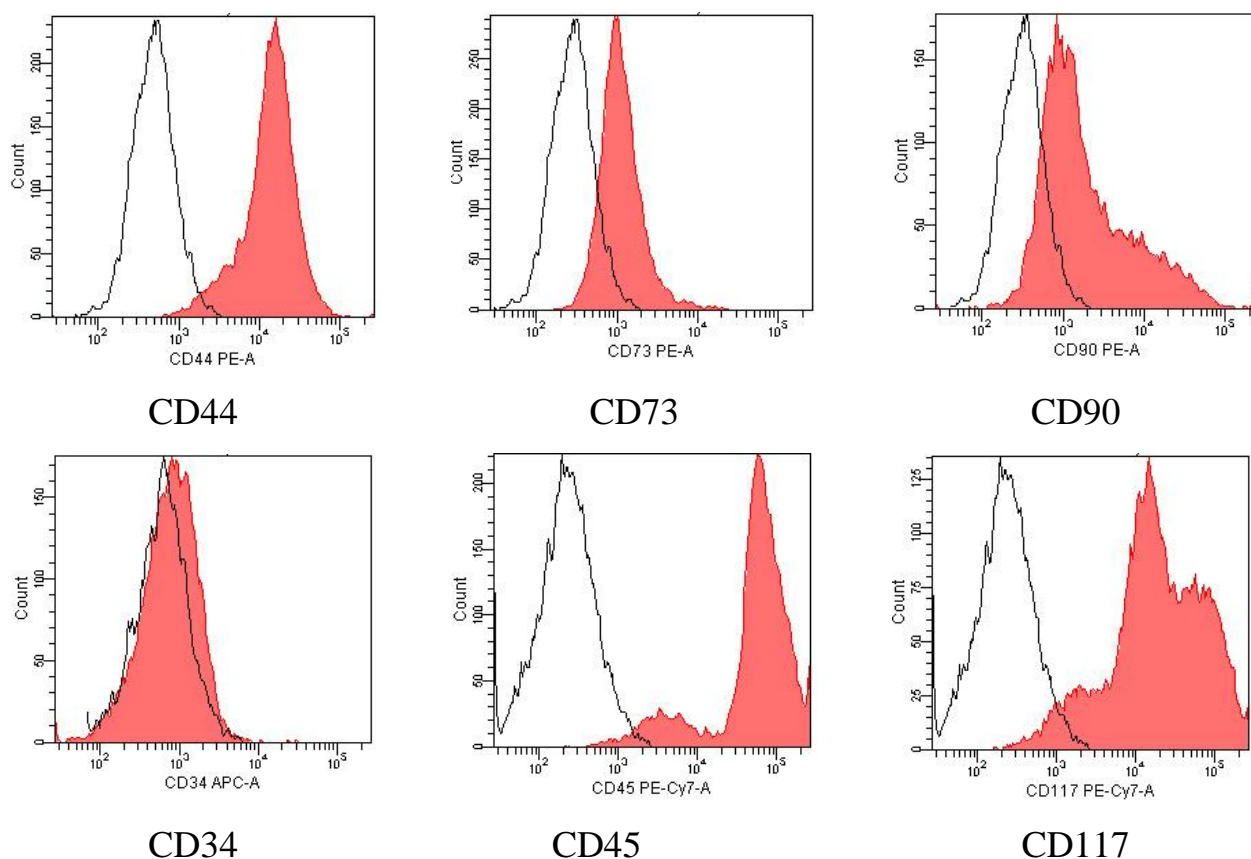


Рисунок 3.8 – Гістограми експресії поверхневих маркерів в первинній культурі стромальних клітин кісткового мозку миші, 2 пасаж: чорний контур – фоновий рівень флюоресценції клітин (ізотип-контроль), суцільна заливка – рівень флюоресценції в зразку з додаванням моноклональних антитіл. Програмне забезпечення BD FACSDiva 6.1.2.

Починаючи з 3-го пасажу культура ММСК кісткового мозку характеризується високими рівнями експресії CD44 ($95,7 \pm 4,0$ %), CD90 ($97,0 \pm 2,3$ %), CD73 ($84,2 \pm 5,3$ %) і низькою експресією гемопоетичних маркерів CD45 ($5,0 \pm 2,3$ %), CD117 ($4,2 \pm 1,5$ %; $n = 7$).

На відміну від кісткового мозку, для ММСК з жирової тканини вже з перших пасажів характерний низький рівень експресії гемопоетичних маркерів CD45 і CD117 (< 3 %), але до 2-3-го пасажу залишалась популяція клітин, що експресували CD34 ($12,0 \pm 4,0$ %). Також, у порівнянні з ММСК кісткового мозку, рівень експресії CD73 дещо нижчий – $58,0 \pm 12,0$ % (рис. 3.9-3.10).

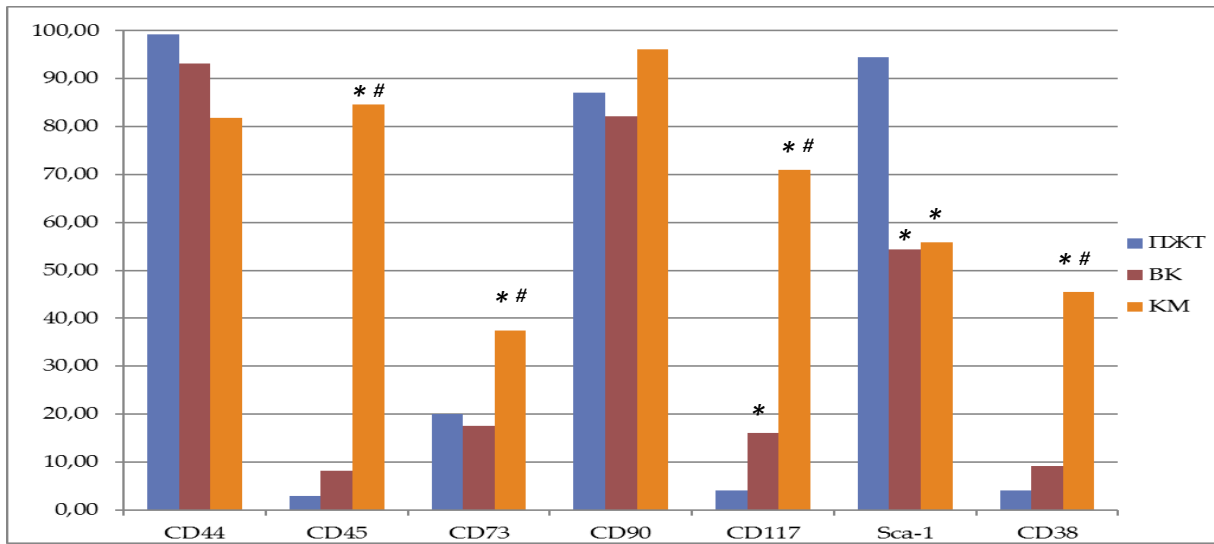


Рисунок 3.9 – Рівні експресії поверхневих маркерів CD44, CD45, CD73, CD90, CD117, Sca-1, CD38 в культурі клітин кісткового мозку (КМ), підшкірної жирової тканини (ПЖТ) та вісцеральної жирової клітковини (ВК) миші, пасаж 1.

Примітки: * – $p \leq 0,05$ у порівнянні з клітинами підшкірної жирової тканини; # – $p \leq 0,05$ у порівнянні з клітинами вісцеральної жирової клітковини.

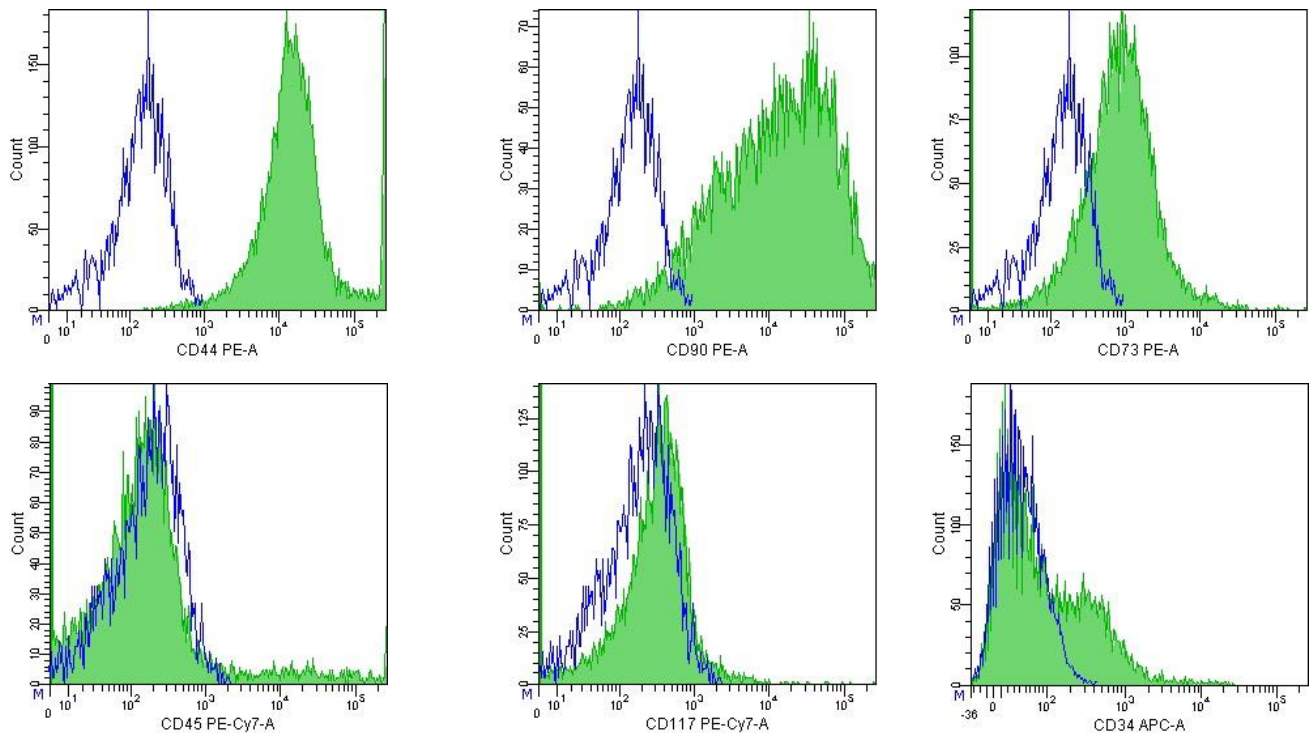


Рисунок 3.10 – Гістограми експресії маркерів CD44, CD90, CD73, CD45, CD117 і CD34 в культурі ММСК підшкірної жирової тканини миші, 2-й пасаж: синій контур – фоновий рівень флюоресценції клітин (ізотип-контроль), суцільна заливка – рівень флюоресценції в зразку з додаванням моноклональних антитіл. Програмне забезпечення BD FACSDiva 6.1.2.

В динаміці пасажування в культурах ММСК з підшкірної та вісцеральної жирової тканини відмічено наростання до 3-го пасажу експресії мезенхімальних маркерів CD44 (до $96,4 \pm 3,5$ %), CD90 (до $96,2 \pm 2,1$ %) та CD73 (до $70,1 \pm 8,3$ %), а також низьку експресію гемопоетичних маркерів CD45 ($2,1 \pm 0,8$ %) і CD117 ($2,2 \pm 0,7$ %), що відповідає типовому для ММСК фенотипу. При цьому експресія CD90 була більш виражена в ММСК з підшкірної жирової тканини як на 2-му, так і на 3-му пасажах (рис. 3.11) [184].

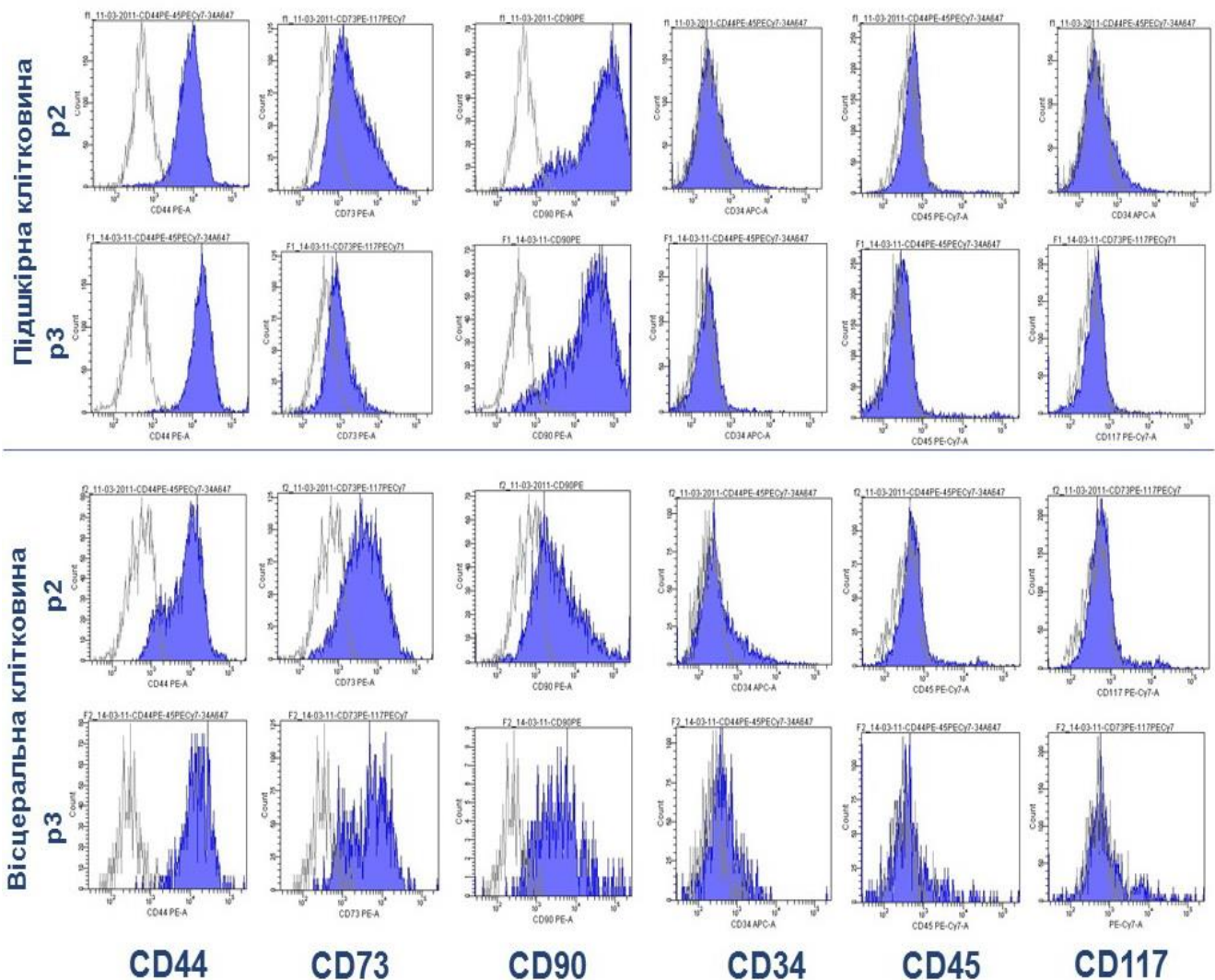


Рисунок 3.11 – Гістограми експресії поверхневих маркерів CD44, CD73, CD90, CD34, CD45, CD117 в культурі ММСК підшкірної та вісцеральної жирової тканини миші: чорний контур – фоновий рівень флюоресценції клітин, суцільна заливка – рівень флюоресценції в зразках з додаванням моноклональних антитіл. Програмне забезпечення BD FACSDiva 6.1.2.

Для підтвердження типових мультипотентних властивостей отриманих культур клітин, було оцінено їхній потенціал до спрямованого остео-, хондро- та адипогенного диференціювання, що є третім ключовим критерієм ММСК. Підтвердженням остеогенного фенотипу диференційованих клітин є забарвлення солей кальцію в екстрацелюлярному матриксі барвником Alizarin Red S, забарвлення культури на лужну фосфатазу, експресія генів остеокальцину, остеопонтину, остеопротегерину та ін. (рис. 3.12).

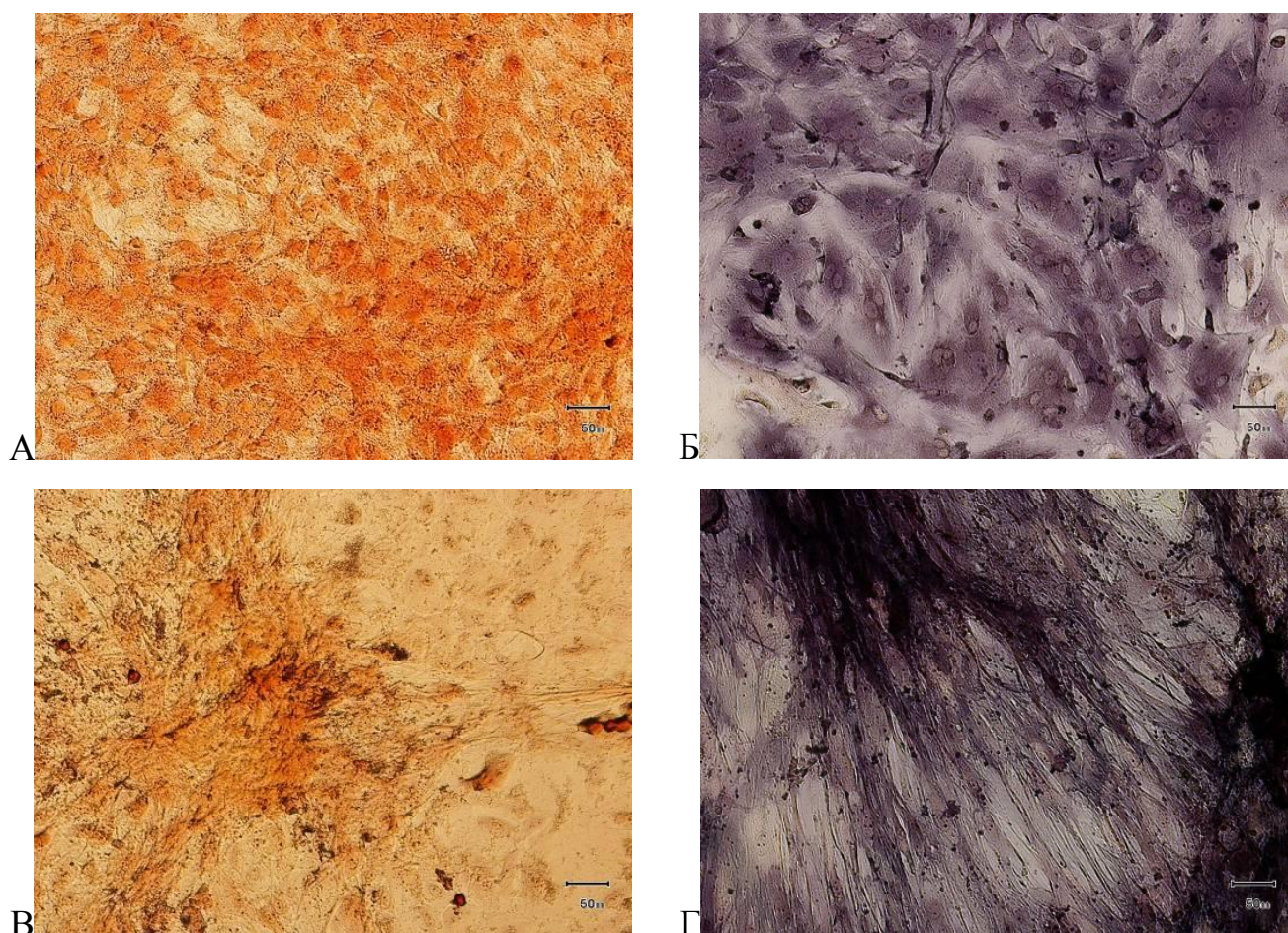


Рисунок 3.12 – Мікрофото цитопрепаратів культур ММСК кісткового мозку (А, Б) та жирової тканини мишей (В, Г), диференційованих в остеогенному напрямі, 21 доба культивування: А, В – фарбування Alizarin Red S на солі кальцію (червоний колір); Б, Г – фарбування BCIP/NBT на лужну фосфатазу (фіолетовий колір). Світлова мікроскопія, шкала – 50 мкм.

При спрямованому остеогенному диференціюванні ММСК кісткового мозку та жирової тканини на другий тиждень культивування не спостерігали суттєвих відмінностей в специфічному гістохімічному забарвленні на солі кальцію цитопрепаратів як контрольної групи, так і клітин, культивованих в остеогенному середовищі. На третій тиждень культивування в моношарі в умовах остеогенного середовища спостерігали інтенсивну мінералізацію міжклітинного матриксу солями кальцію, яку виявляли за допомогою забарвлення цитопрепаратів барвником Alizarin Red S, а також продукцію лужної фосфатази, яку виявляли за допомогою фарбування барвником ВСІР/НВТ на основі нітросинього тетразолію (рис. 3.12).

Додатково ефективність спрямованого остеогенного диференціювання клітин була підтверджена імуноцитохімічним фенотипуванням на остеопонтин, який є маркером остебластів (рис. 3.13).

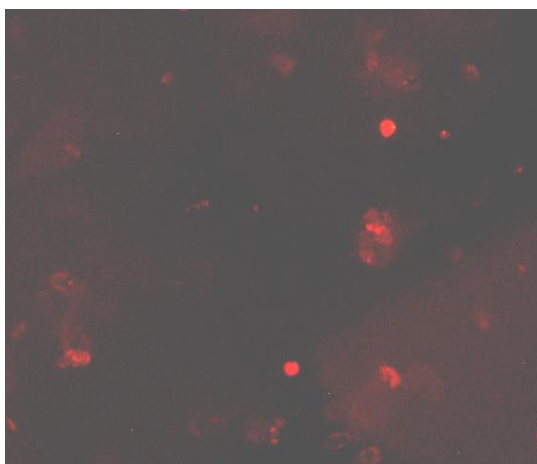


Рисунок 3.13 – Мікрофото цитопрепаратів культур ММСК жирової тканини мишей, спрямовано диференційованих в остеогенному напрямі. Імуноцитохімічне забарвлення на остеопонтин (червоний колір). Флуоресцентна мікроскопія, шкала – 50 мкм.

При спрямованому адипогенному диференціюванні ММСК за допомогою додавання індуктивного середовища з дексаметазоном, індометацином, ізобутилметилксантином та інсуліном вже через 14 діб культивування у відповідному індуктивному середовищі за допомогою специфічного фарбування барвником Oil Red O виявлено присутність ліпідних гранул у цитоплазмі клітин (рис. 3.14).

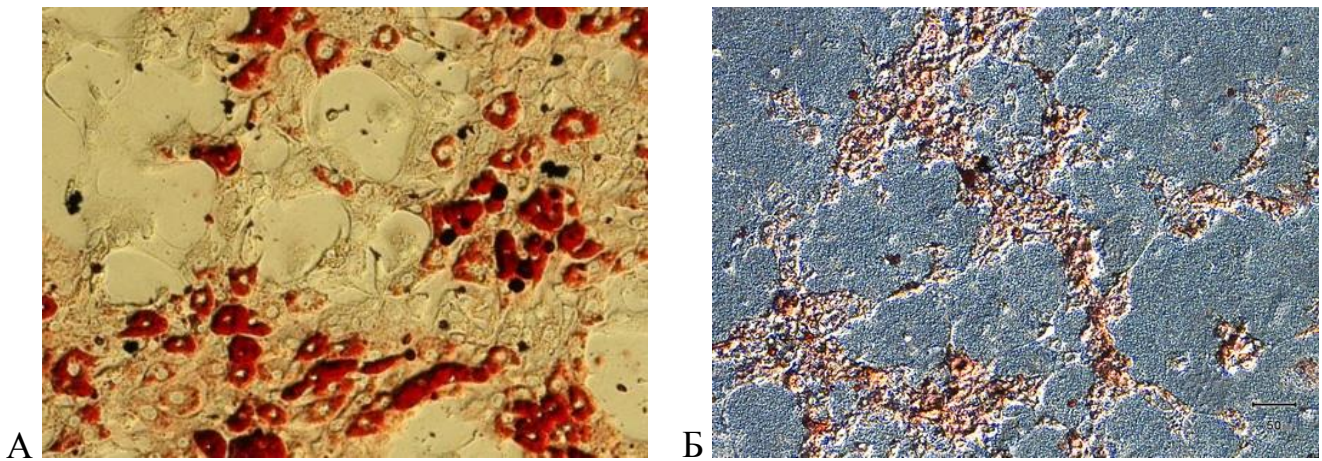


Рисунок 3.14 – Мікрофото цитопрепаратів культур ММСК кісткового мозку (А) та жирової тканини (Б) мишей, диференційованих в адипогенному напрямі, 14-а доба культивування, фарбування Oil Red O на ліпідні вакуолі. Світлова мікроскопія, фазовий контраст; шкала – 50 мкм.

Для дослідження процесів дозрівання клітин хряща і синтезу ними компонентів міжклітинного матриксу розроблені різні способи моделювання утворення хрящової тканини *in vitro*. Дослідниками запропоновано низку методик для хондрогенного диференціювання ММСК, відмінності яких полягають у різних складових середовища для культивування та їхніх концентраціях. Згідно з переважною більшістю протоколів, хондрогенне диференціювання пропонують проводити у формі тривимірних культур, а саме культури мікроорганізмів, яку утворюють за допомогою центрифугування попередньо розмножених *in vitro* ММСК у моношарі; заселення клітинами декальцинованих кісток або полімерних матриксів тощо. Однак, для спостереження за змінами морфології клітин у динаміці та порівняння культур з різних джерел більш зручним може бути диференціювання ММСК у моношарі.

Для забезпечення оптимальних умов при спрямованому хондрогенному диференціюванні у нашому дослідженні ММСК жирової тканини культивували у високих щільностях. Основними індуктивними компонентами середовища для хондрогенного диференціювання визначено TGF- β та IGF-I. IGF-I має хондропротекторну дію, стимулює хондроцити до посилення синтезу позаклітинного матриксу, а також асоційований з активацією остеоцитів, будучи

анаболічним фактором кісток. Цей високопроникний білок у високих концентраціях здатен активувати рецептори інсуліну, доповнюючи його ефекти [343]. У свою чергу, TGF- β є одним з найбільш ранніх сигналів хондрогенної конденсації. Він стимулює синтез фібронектину, який вже регулює молекули адгезії N-CAM. *In vitro* TGF- β , окрім хондрогенної індукції, може спричинити диференціювання ММСК у напрямі гладких м'язів.

Після внесення в культуру індуктивного середовища протягом 24-72 год. спостерігали конденсацію моношару в різних ділянках і утворення мікросфер, прикріплених до пластику розпластаними клітинами. Зменшення розмірів клітин, їх ущільнення і самоорганізація в об'ємну структуру забезпечують меншу розпластаність ММСК на культуральній поверхні і можуть сприяти збільшенню кількості міжклітинних контактів, а разом з присутністю в середовищі TGF- β визначають хондрогенну спрямованість диференціювання культури. Клітини в експериментальних культурах, які не були залучені до утворення конгломератів, набували округлої форми. До завершення терміну диференціювання утворені сфери дещо збільшувалися в діаметрі, а на пластику, звільненому внаслідок конденсації, з'являлися розпластані клітини. В деяких випадках проліферуючі клітини утворювали не щільний моношар навколо агрегатів.

Водночас, клітини в контрольних культурах залишалися розпластаними на поверхні культурального пластику без конденсації. Протягом усього часу спостереження вони не утворювали мікроагрегатів, однак деяке відокремлення моношару можна було спостерігати в пристінкових ділянках культуральних чашок на 17-21 добу, що пояснюється надмірною щільністю моношару.

Перед конденсацією прехондроцитарні мезенхімальні клітини продукують позаклітинний матрикс, багатий фібронектином, гіалуронаном та колагенами різних типів. Позаклітинний матрикс взаємодіє з молекулами адгезії щоб активувати внутрішньоклітинні сигнальні шляхи для ініціації переходу від хондрогеніторів до хондроцитів. При спрямованому диференціюванні від 3 тижнів до 2 місяців молекули матриксу, такі як фібронектин та гіалуронова кислота, зв'язують фактори росту і діють як їхні резервуари. Після зв'язування з

рецепторами на поверхні мембрани фактори росту ініціюють сигнальний каскад регуляторних білків у клітині, що проявляється зміною її біологічної активності та продукцією специфічних компонентів екстрацелюлярного матриксу.

При фарбуванні фіксованих у моношарі клітин барвником Alcian Blue (рис. 3.15 А) або Safranin O (рис. 3.15 Б) отримували інтенсивне специфічне забарвлення. Це свідчить про те, що диференційовані *in vitro* ММСК продукують муцини та протеоглікани, характерні для клітин хрящової тканини. При фарбуванні цими ж барвниками контрольної культури клітин без факторів хондрогенної індукції не отримували позитивне забарвлення.

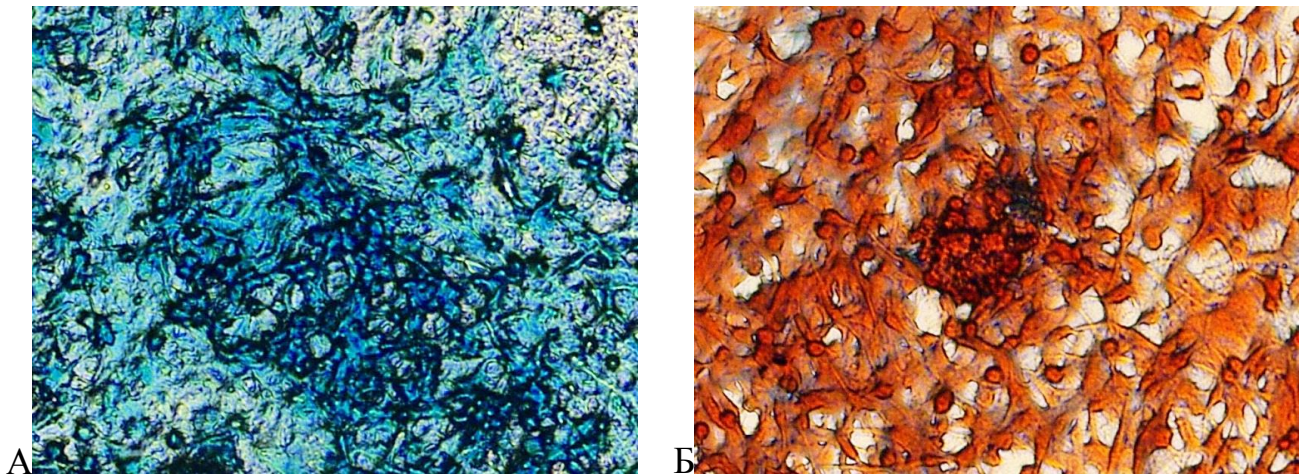


Рисунок 3.15 – Мікрофото цитопрепаратів культур ММСК мишей, диференційованих в хондрогенному напрямі *in vitro*, 21 доба: А – забарвлення Alcian Blue (блакитний колір); Б – забарвлення Safranin O (рожевий колір). Світлова мікроскопія, фазовий контраст; зб. $\times 100$.

При комбінованому застосуванні обох барвників в індукованих культурах спостерігали диференційне забарвлення: клітини зафарбовувалися в червоний колір (Safranin O), позаклітинний матрикс – в блакитний (Alcian Blue). Аналогічний розподіл забарвлення спостерігали як у розпластаних клітин (рис. 3.16 А), так і в їх агрегатах (рис. 3.16 Б), тоді як, фарбування фіксованого моношару недиференційованих ММСК за аналогічним методом не дало розподілу забарвлення (рис. 3.16 В).

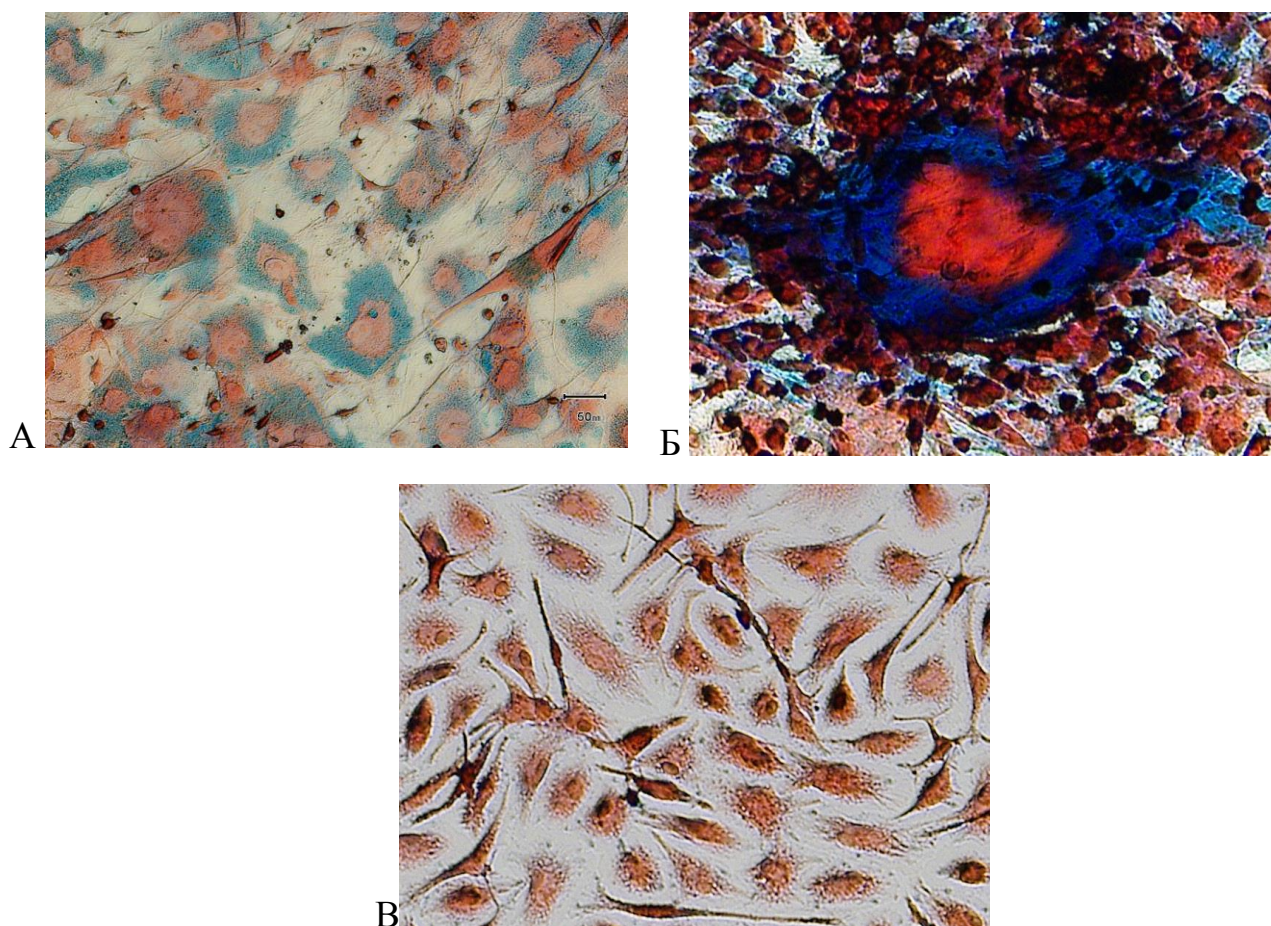


Рисунок 3.16 – Мікрофото цитопрепаратів культур ММСК мишей, диференційованих в хондрогенному напрямі *in vitro*, 21 доба; комбіноване забарвлення Alcian Blue і Safranin O: А – диференційовані клітини в моношарі; Б – диференційовані конденсовані клітини; В – контрольна культура клітини. Світлова мікроскопія, фазовий контраст; зб. $\times 100$.

У нашому дослідженні додатково було продемонстровано можливість поетапного остеогенного диференціювання ММСК жирової тканини шляхом почергового культивування клітин в хондроіндуктивному середовищі протягом 10 діб з подальшою заміною його на стандартне остеоіндуктивне, в якому прекомітовані в хондрогенному напрямі клітини культивувались ще 12 діб [184]. У такий спосіб частково моделюються умови природного органогенезу кісткової тканини в організмі, що може бути використано для підвищення регенеративних ефектів клітинної терапії при патології опорно-рухового апарату.

Також з метою з'ясування патогенетичних механізмів реалізації регенеративного потенціалу стовбурових клітин на ультраструктурному рівні при їхньому спрямованому диференціюванні було проведено електронно-мікроскопічне дослідження культур ММСК жирової тканини в нормі та в умовах остеоіндукції *in vitro*.

Ультраструктурний аналіз показав, що в умовах звичайного культивування ММСК зберігали недиференційований стан, що характеризувався фібробластоподібною формою клітин з еухроматичним ядром та нерівною поверхню мембрани з численними цитоплазматичними виступами (рис. 3.17 А). Значна кількість вільних рибосом і полірибосом обумовлювала гранулярність цитоплазми (рис. 3.17 Б). При цьому внутрішня її зона була заповнена численними округлими і видовженими електронно-щільними мітохондріями та ліпідними гранулами, в той час як периферійна частина цитоплазми містила мало органел. Проміжні філаменти, лізосоми та вакуолі були розташовані переважно на периферії. Наявність видовжених мітохондрій, ліпідних гранул та мультивезикулярних ендосомних елементів, які були розподілені по всій цитоплазмі, а також розширених цистерн гранулярного ендоплазматичного ретикулулу з ділянками низької електронної щільності вказували на значну метаболічну активність клітин в культурі без ознак їх спеціалізації.

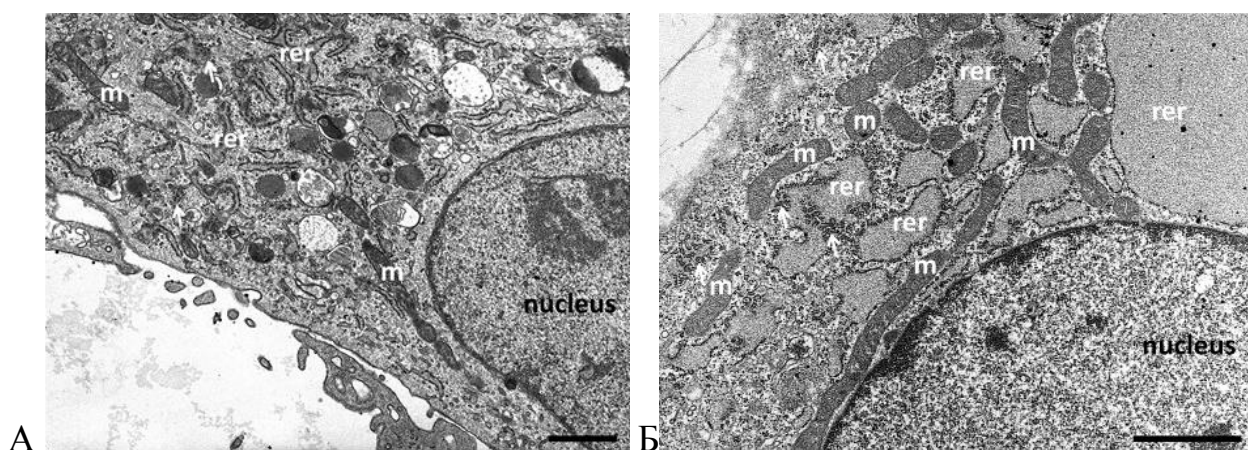


Рисунок 3.17 – Мікрофото цитопрепаратів ММСК жирової тканини, культивованих в моношарі в звичайних умовах, пасаж 2 (опис в тексті). Примітки: rer – гранулярний ендоплазматичний ретикулум, m – мітохондрії. Електронна мікроскопія, шкала = 0,5 мкм.

Вже з 10-ї доби диференціювання клітини проявляли структурні зміни в морфології, типові для остеобластів. Наприкінці остеогенної індукції (21-а доба) ММСК остаточно змінювали свою початкову фібробластоподібну форму, набували плоскої або багатокутної остеобласто-подібної морфології та починали формувати численні відростки, якими контактували між собою (рис. 3.18 В). Ядра клітин були великі, округлі, з переважанням еухроматину і невеликою кількістю гетерохроматину (рис. 3.18 А). У цитоплазмі виявляли значну кількість видовжених мітохондрій, чітко визначали гранулярний ендоплазматичний ретикулум, апарат Гольджі та проміжні пучки філаментів (рис. 3.18 С, D). Цікаво, що остеобласто-подібні клітини були оточені позаклітинним матриксом, багатим на колагенові волокна, які розташовувались, переважно, поздовжньо. Крім того, в різних місцях матриксу в межах позаклітинного простору присутні везикули різного розміру (рис. 3.18 Е). Деякі везикули були глибоко вбудовані в позаклітинний матрикс, тоді як інші виявлені серед колагенових фібрил або розміщувались вільно в міжклітинному просторі. Частина везикул в матриксі були прозорими, в той час як решта мали електронно-щільний вміст, схожий на вузлики кальцифікації.

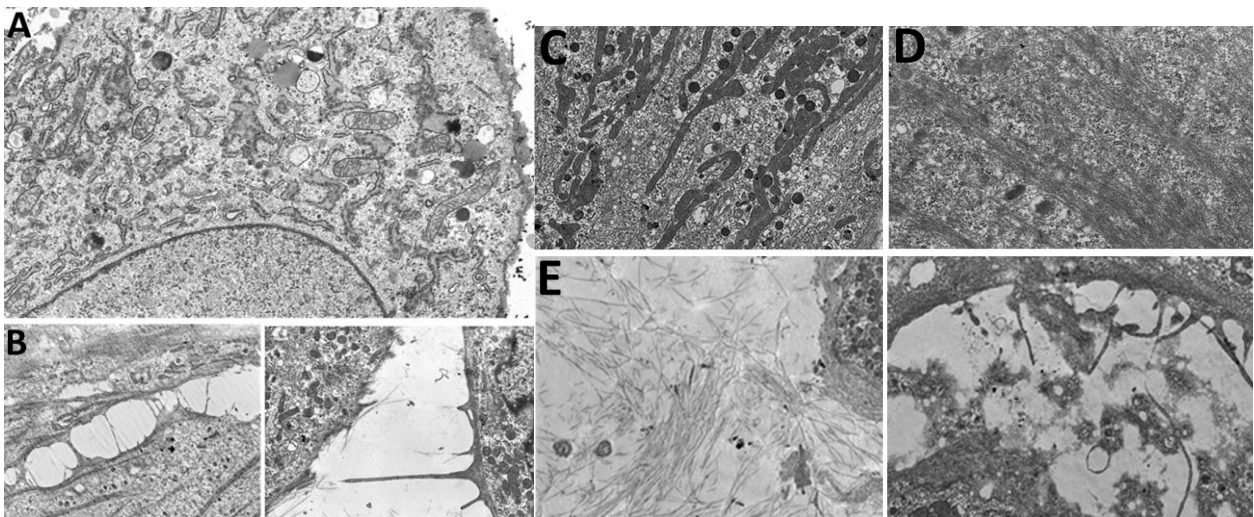


Рисунок 3.18 – Мікрофото цитопрепаратів ММСК жирової тканини мишей, 21-а доба остеогенного диференціювання (опис в тексті). Електронна мікроскопія, шкала – 0,5 мкм.

Загалом, за даними електронної мікроскопії на рівні клітини встановлено ультраструктурні зміни, які супроводжують диференціювання ММСК жирової тканини та можуть бути додатковим компонентом при оцінці якості препаратів стовбурових клітин та прогнозуванні їхньої безпеки і ефективності [354].

3.2 Характеристики об'ємних культур мікромаси ММСК жирової тканини мишей

Для підтвердження належних характеристик ММСК кісткового мозку та жирової тканини мишей, які були використані для об'ємного культивування в культурі мікромаси та гідрогелях, клітини попередньо на 2-му пасажі було проаналізовано на відповідність мінімальним критеріям ММСК за морфологією, імунофенотипом та потенціалом до спрямованого диференціювання в остеогенному та адипогенному напрямках.

Для культивування ММСК методом мікромаси після внесення в пробірку клітини центрифугували або залишали осідати. Без закріплюючих контактів, таких як поверхня культурального флакона, клітини агрегують, щоб утворити мікросферу, яка відтворює тканиноспецифічну модель *in vitro* та тривимірний трансплантат для регенерації тканини. Клітини на дні пробірки організовувалися у сфери, які не адгезували до пластику, при цьому час формування сфероїдних мікромас не залежав від способу їх осадження. Утворення мікромас спостерігали вже через 24 години після внесення суспензії клітин у пробірку. Кількість клітин для формування мікромаси необхідного діаметра (0,8-1 мм) за 12-14 днів, що склала $1-1,5 \times 10^6$ клітин на пробірку, підбирали експериментально. Відносний вміст життєздатних клітин після субкультивування з моношару в суспензію для подальшого 3D культивування, визначений методом проточної цитометрії за допомогою 7-AAD, становив 94,2%.

На ранніх етапах формування мікромас в усіх зразках клітин з різних джерел спостерігали швидше закислення культурального середовища що свідчить про більшу проліферативну активність клітин. Після того, як мікромаси остаточно формувалися, проліферативна активність клітин зменшувалася, що проявлялося в сповільненні росту мікромаси та повільному закисленні середовища. Свідченням збереження життєздатності клітин у мікросферах була прижиттєва експресія ними GFP (рис. 3.19) та активна проліферація, що проявлялося збільшенням розмірів сфер. Для порівняння, дермальні фібробласти ембріонів мишей у аналогічних умовах адгезували до культурального пластику, утворюючи щільний моношар.

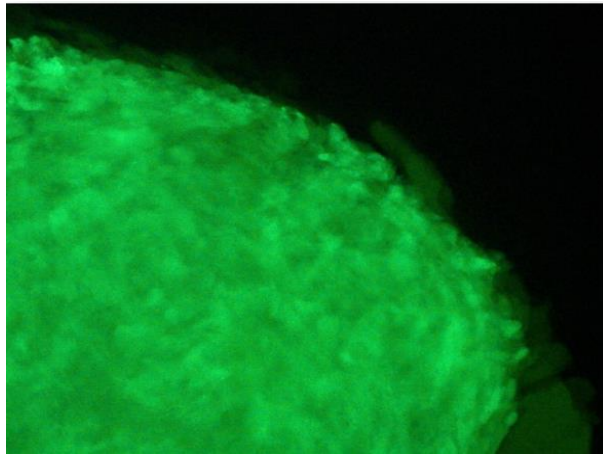


Рисунок 3.19 – Мікрофото гістологічного препарату ММСК миші в культурі мікромаси. Експресія GFP (зелений колір). Флуоресцентна мікроскопія, зб. $\times 100$.

При морфологічному дослідженні було виявлено зміну морфології клітин, які формували поверхню мікромаси. Окрім цього було встановлено, що внутрішня структура сфери не є однорідною. Для подальшого з'ясування механізмів реалізації регенеративного потенціалу ММСК в умовах об'ємних культур були розроблені протоколи спрямованого остеогенного диференціювання ММСК в культурі мікромаси.

Під світловим мікроскопом можна було виявити, що поверхня недиференційованих мікромас виглядає пухкою (рис. 3.20 А). Ймовірно, це є наслідком проліферації клітин та їх міграції при впорядкуванні в мікромасі. Однак, поверхні мікромас, які навіть протягом нетривалого часу перебували в середовищі для остеогенного диференціювання, виглядають гладенькими і компактними (рис. 3.20 Б). Вірогідно, у таких умовах у клітин на поверхні мікромас під впливом факторів диференціювання знижується проліферативна активність і їхня морфологія змінюється, що може бути корисним для постійного рівномірного обміну поживними речовинами та газами.

На гістологічних препаратах культур мікромаси недиференційованих та спрямовано диференційованих в остеогенному напрямі клітин відзначалась їхня різна морфологія і просторова організація. В культурі мікромаси недиференційованих ММСК більшість клітин мали веретеноподібну форму і були розташовані в кілька шарів по периферії препарату, що можна пояснити

збереженням проліферації в некомітованих ММСК (рис. 3.21 А). У препараті культури мікрмаси ММСК, диференційованих в остеогенному напрямі, клітини були організовані більш компактно, що пояснюється їх деякою конденсацією при остеогенному диференціюванні в напрямі остеобластів (рис. 3.21 Б).

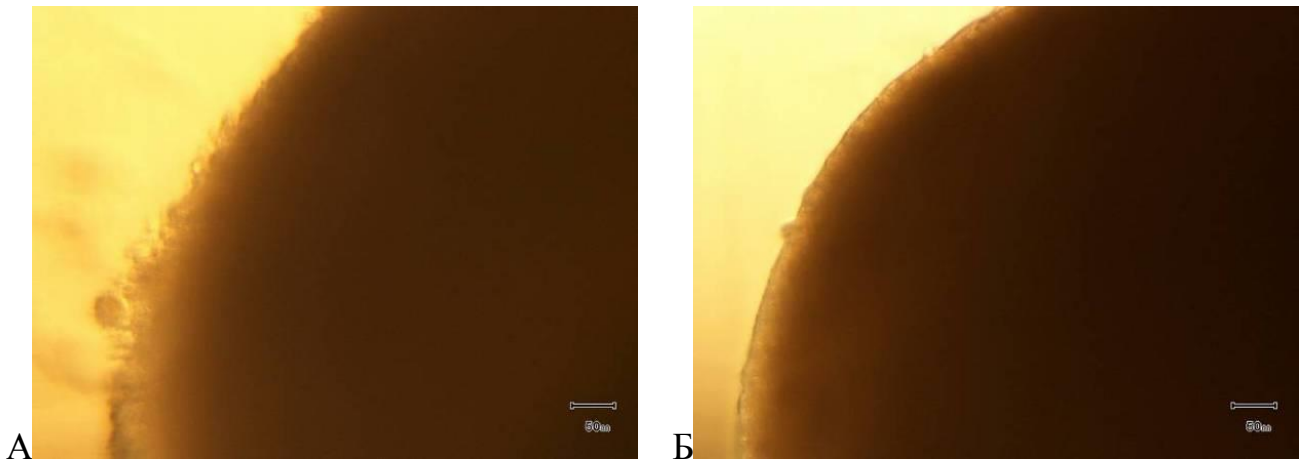


Рисунок 3.20 – Мікрофото культур мікрмаси ММСК кісткового мозку миші, недиференційованої (А) та диференційованої в остеогенному напрямі (Б). Світлова мікроскопія, зб. $\times 100$.

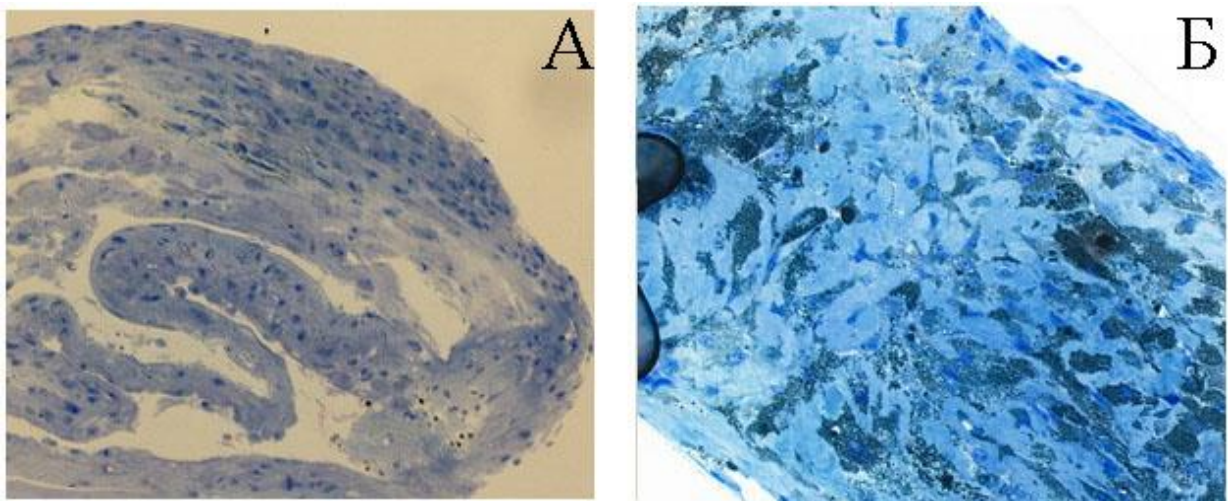


Рисунок 3.21 – Мікрофото гістологічних препаратів культур мікрмаси ММСК кісткового мозку миші, 21 доба культивування, забарвлення толуїдиновим синім та крезилвіолетом. А – недиференційована культура мікрмаси; Б – культура, диференційована в остеогенному напрямі. Світлова мікроскопія, зб. $\times 100$ [12].

При цьому морфологія диференційованих клітин в центрі була змінена, їхні ядра знаходились на більшій відстані одне від одного, ніж ядра клітин крайової зони мікромаси. Ймовірно, це пов'язано з більш інтенсивною продукцією міжклітинного матриксу всередині культури мікромаси, що нагадує самоорганізацію клітин при органогенезі кісток. При цьому в центральних ділянках обох препаратів культур мікромаси не було виявлено апоптотичних клітин або детриту, що підтверджує можливість отримання об'ємної культури життєздатних клітин для подальшої їх трансплантації.

Забарвлення фрагментів недиференційованих мікромас ММСК специфічним барвником Alizarin Red S не виявило позитивної реакції на солі кальцію, у той час як мікромаса диференційованих в остеогенному напрямі клітин чітко фарбувалася в яскравий червоний колір, що вказує на інтенсивну продукцію солей кальцію в міжклітинний простір в умовах тривимірної культури (рис. 3.22).

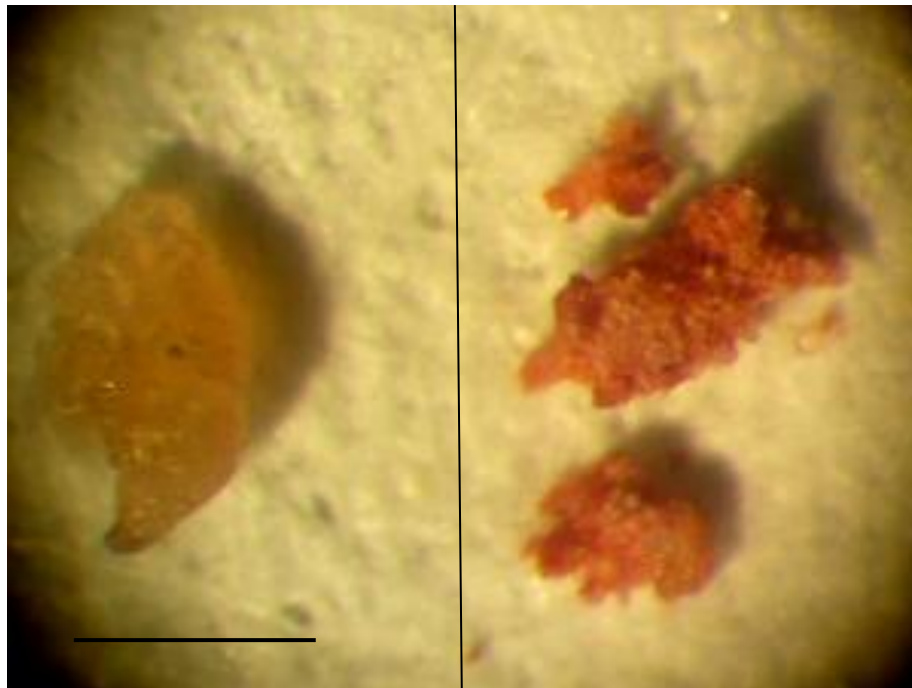


Рисунок 3.22 – Препарати культури мікромаси ММСК кісткового мозку миші, 21 доба культивування *in vitro*, забарвлення Alizarin Red S: ліворуч – недиференційована мікромаса (відсутнє специфічне забарвлення); праворуч – мікромаса, культивована з факторами остеогенної індукції (червоний колір – позитивне забарвлення на солі кальцію). Стереомікроскопія, шкала – 1 мм [12].

Важливим аспектом при цьому є оцінка проліферативного та міграційного потенціалу клітин за зміни просторових умов вирощування. Для цього сформовані мікромаси переносили на адгезивну поверхню і спостерігали інтенсивну міграцію клітин. Цікаво, що незважаючи на те, що для формування мікромаси використовували культури 2 пасажу, морфологія клітин, які мігрували на поверхню, нагадувала морфологію первинної культури. Тобто, в умовах тривимірної культури клітини зберігають високий міграційний потенціал, що є додатковим підтвердженням можливості моделювання в такий спосіб просторової ніші стовбурових клітин.

При контакті з адгезивним субстратом клітини отримують сигнали до міграції і дають початок моношаровим культурам з типовими морфологічними характеристиками. Окрім того, інтенсивна міграція клітин з мікромаси на адгезивну поверхню також доводить здатність клітин виживати в організмі. Досліджуючи морфологію клітин, які мігрували на адгезивну поверхню з диференційованих в остеогенному напрямі мікромас, можна побачити, що вона відрізняється від морфології клітин, культивованих у формі моношару, або клітин, які мігрували на культуральну поверхню з мікромас контрольної групи (рис. 3.23).

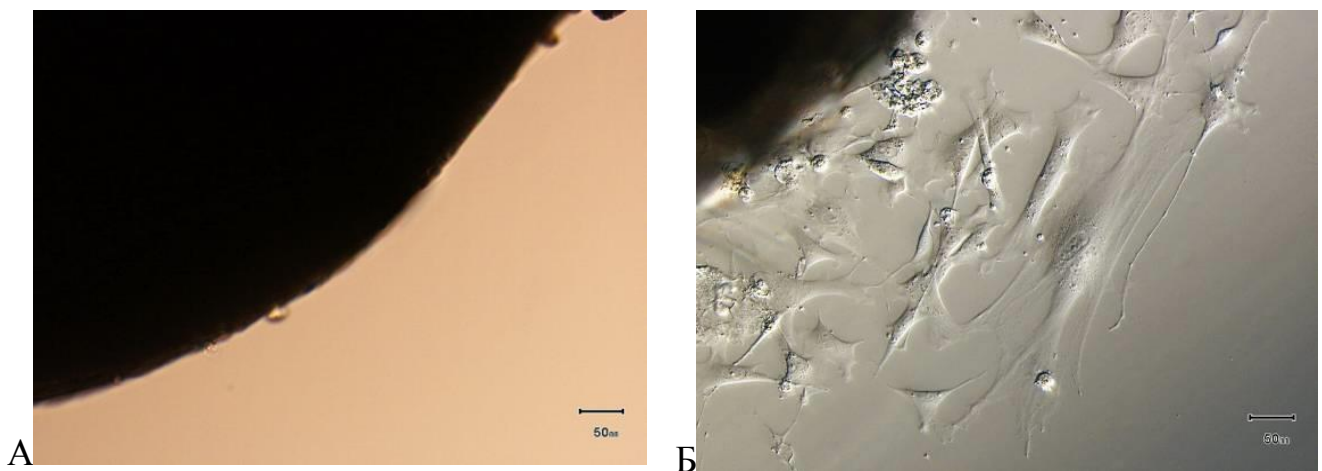


Рисунок 3.23 – Мікрофото культури мікромаси ММСК миші, перенесеної на адгезивну поверхню після остеогенного диференціювання: А – 3-а доба; Б – 7-а доба. Світлова мікроскопія, зб. $\times 100$.

При фарбуванні на лужну фосфатазу клітин, які мігрували з мікромас в умовах спрямованого остеогенного диференціювання, отримали позитивне забарвлення (рис. 3.24). Важливо, що більшу інтенсивність забарвлення на виявлення активності лужної фосфатази спостерігали в клітинах, розташованих неподалік мікромаси, в той час як у тих, які мігрували на значну відстань, вона майже не проявлялася. Відомо, що остеобласти мають знижену міграційну активність, а з дозріванням взагалі її втрачають, утворюючи остеони і замуруючись у матрикс. Тестом на міграційну активність диференційованих в остеогенному напрямі тривимірних культур було показано, що клітини в них набувають морфологічних ознак остеобластів: змінюється морфологія, зменшується міграційна активність, експресується лужна фосфатаза. При збільшенні строків спрямованого остеогенного диференціювання ММСК в культурі мікромаси від 14 до 21 доби міграційний потенціал клітин зменшується.

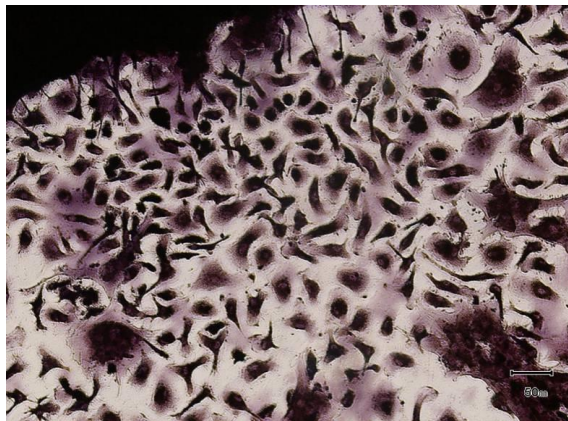


Рисунок 3.24 – Мікрофото цитопрепарату мікромаси ММСК жирової тканини миші з міграцією клітин на адгезивну поверхню, забарвлення ВСІР/НВТ на лужну фосфатазу. Світлова мікроскопія, шкала – 50 мкм.

Отже, для досліджуваних ММСК була підтверджена можливість спрямованого диференціювання по остеогенному шляху не лише в моношарових культурах, а й в умовах об'ємного культивування методом мікромаси. При цьому встановлено, що спрямоване диференціювання клітин в тривимірних умовах зменшує їхній міграційний потенціал, що необхідно враховувати при розробці новітніх підходів клітинної терапії, оскільки це впливатиме на реалізацію регенеративних ефектів у випадку значних дефектів тканин.

3.3 Регенеративний потенціал об'ємних культур мікрмаси ММСК жирової тканини при пошкодженні кісткової тканини в мишей

Для оцінки можливості використання об'ємних клітинних трансплантатів у регенерації пошкоджень кісткової тканини була проведена трансплантація отриманих культур мікрмаси ММСК кісткового мозку або жирової тканини в ділянку змодельованого пошкодження стегнової кістки в мишей.

Через 21 добу після моделювання пошкодження на макропрепаратах контрольних стегнових кісток природне відновлення кісткової тканини проходило по периферії ділянки ушкодження, при цьому 4/5 діаметра дефекту зберігалася. На препаратах кісток із застосуванням культури мікрмаси ММСК кісткового мозку ділянки змодельованого пошкодження практично повністю були заповнені новоствореною тканиною (рис. 3.25).

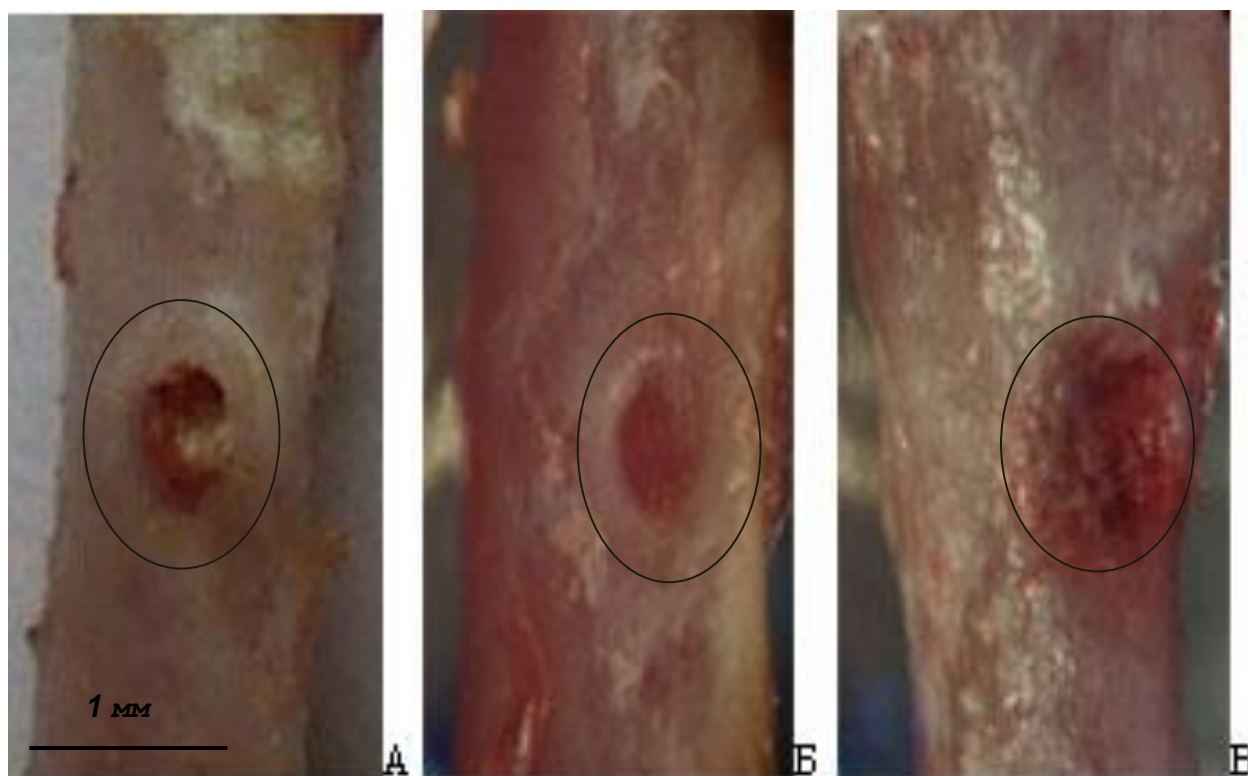


Рисунок 3.25 – Фото змодельованих дефектів стегнової кістки миші: А – через 24 год. після моделювання пошкодження; Б – через 21 добу, природна регенерація; В – через 21 добу, застосування культури мікрмаси ММСК кісткового мозку, шкала – 1 мм.

Аналогічно в зону змодельованого пошкодження кісткової тканини була трансплантована тривимірна культура мікрмаси ММСК жирової тканини з метою оцінки регенераторного потенціалу об'ємних трансплантатів з клітин іншого походження. При макроскопічному дослідженні через 21 добу після трансплантації мікрмас змодельований дефект стегнової кістки був заповнений щільною тканиною, у той час як у контрольних препаратах без застосування клітин розміри дефекту на $80 \pm 6 \%$ відповідали початковим як за діаметром, так і за глибиною пошкодження (рис. 3.26).

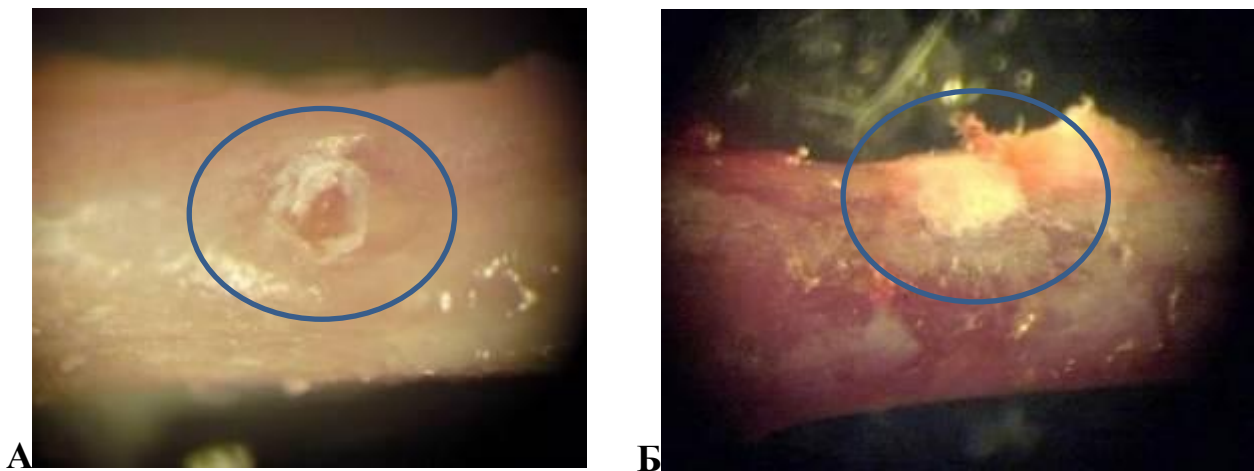


Рисунок 3.26 – Фото макропрепаратів стегнових кісток мишей через 21 добу після моделювання пошкодження: А – природна регенерація; Б – застосування культури мікрмаси ММСК жирової тканини; зб. $\times 10$.

Можемо припустити, що внесені в зону пошкодження ММСК, одержуючи сигнали від уражених тканин, можуть диференціюватися в остеогенному напрямі *in situ*, заповнювати дефект і прискорювати відновлення кістки. Враховуючи продемонстровану *in vitro* можливість спрямованого диференціювання культур мікрмаси в остеогенному напрямі, більш перспективною може бути трансплантація вже попереднього комітованих мікрмас, для більш швидкого заміщення дефекту тканинспецифічним трансплантатом. Тому в наступній частині експерименту в змодельований дефект стегнової кістки було додатково трансплантовано культури мікрмас ММСК жирової тканини, спрямовано диференційованих в остеогенному напрямі.

Для детальної оцінки регенеративних ефектів трансплантатів, застосованих у експерименті, було проведено гістологічне дослідження ділянок пошкодження кісток. При гістологічному дослідженні ділянок пошкоджень стегнових кісток у зоні трансплантації культури мікрмаси ММСК жирової тканини через 21 добу виявлено формуванням грануляційної тканини із подальшим заміщенням дефектів новоутвореною кістковою тканиною з потовщенням окістя та компактною речовиною кістки, подібно до кісткового мозоля при регенерації переломів (рис. 3.27).

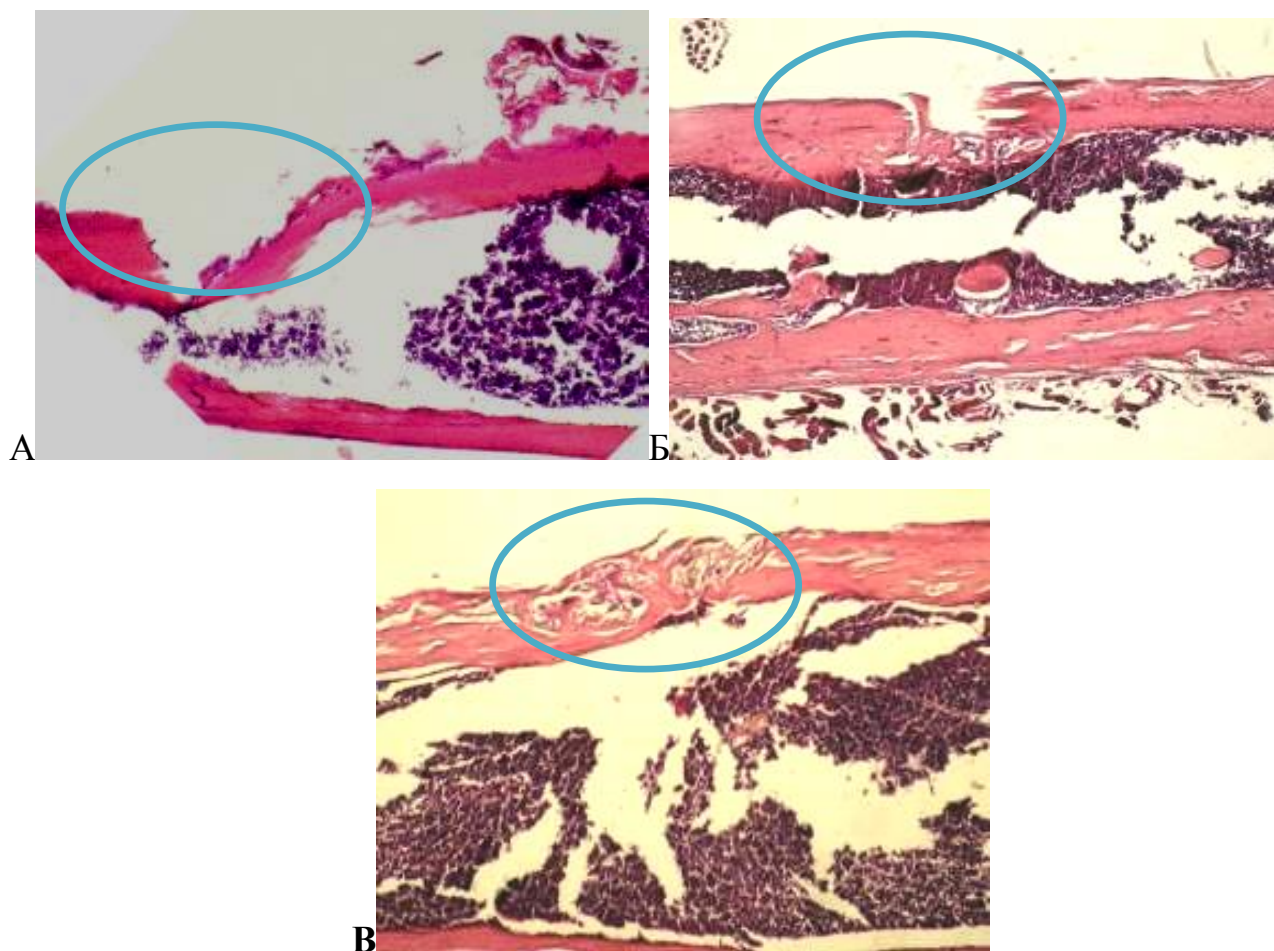


Рисунок 3.27 – Мікрофото гістологічних препаратів стегнових кісток мишей через 21 добу після моделювання пошкодження: А – без застосування клітин; Б – після трансплантації недиференційованої культури мікрмаси ММСК жирової тканини; В – після трансплантації культури мікрмаси ММСК жирової тканини, попередньо диференційованої в остеогенному напрямі. Забарвлення гематоксилін-еозином. Світлова мікроскопія, зб. $\times 200$.

При порівняльному морфологічному дослідженні гістологічних препаратів стегових кісток мишей, яким після змодельованого пошкодження кістки було трансплантовано звичайні культури мікромаси ММСК жирової тканини, встановлено, що по краях пошкодженої ділянки діафізу сформована губчата кістка, яка містила трабекули і порожнини, заповнені клітинами. У центральній ділянці пошкодженого діафізу трабекули потоншені, проміжки між ними збільшені і формували канали в кістковомозкову порожнину кістки. В оточуючих ділянках діафізу окістя і компактна речовина кістки обмежували порожнини, які не містили клітин (рис. 3.27 Б). Діаметр зони активної регенерації діафізу в місці пошкодження становив $1,3 \pm 0,2$ мм.

Водночас, при дослідженні препаратів кісток мишей, яким після змодельованого пошкодження кістки було трансплантовано культури мікромаси ММСК жирової тканини, спрямовано диференційовані в остеогенному напрямі, в ділянці пошкодження діафізу також була сформована губчата кісткова тканина, що містила трабекули і порожнини, заповнені клітинами. Деякі з проміжків з'єднані з кістковомозковою порожниною, але не формували наскрізних каналів. У ділянках діафізів, що прилягали до регенеруючої зони кістки, окістя і компактна речовина мали типову морфологію для нормальної кістки (рис. 3.27 В). Діаметр зони регенерації діафізу в місці пошкодження становив $0,37 \pm 0,12$ мм, що достовірно менше в порівнянні з групою тварин, яким проводили трансплантацію мікромаси без попереднього остеогенного диференціювання ($p \leq 0,05$).

Отже, тривимірні трансплантати культури мікромаси ММСК жирової тканини, спрямовано диференційовані в остеогенному напрямі, мають кращі показники регенерації пошкодженої кісткової тканини, у порівнянні із трансплантатами культури мікромаси без диференціювання. Посилений остеогенез у 3D культурі сфероїдів ММСК може слугувати альтернативою двовимірного культивування в технологіях інженерії кісткової тканини, забезпечуючи краще мікрооточення для взаємодії клітин та реалізації ними репаративних функцій.

3.4 Характеристики об'ємних культур ММСК жирової тканини в карбомерному гідрогелі

У наступній серії експериментів було досліджено особливості реалізації регенеративного потенціалу ММСК в умовах штучних об'ємних носіїв на основі карбомеру 974Р. За таких умов культивування клітини заселяють вже готовий каркас, який має певні властивості, що забезпечують необхідну форму, просторову організацію клітинної мережі, міжклітинний сигналінг та трофіку. Використовуючи оригінальні пропорції вихідних компонентів та модифікації часу і температури їх процесингу можна досягти певної пластичності матеріалу для надання йому необхідної форми (рис. 3.28 А) та пружно-еластичних властивостей при подальшій регідратації поживним середовищем (рис. 3.28 Б).

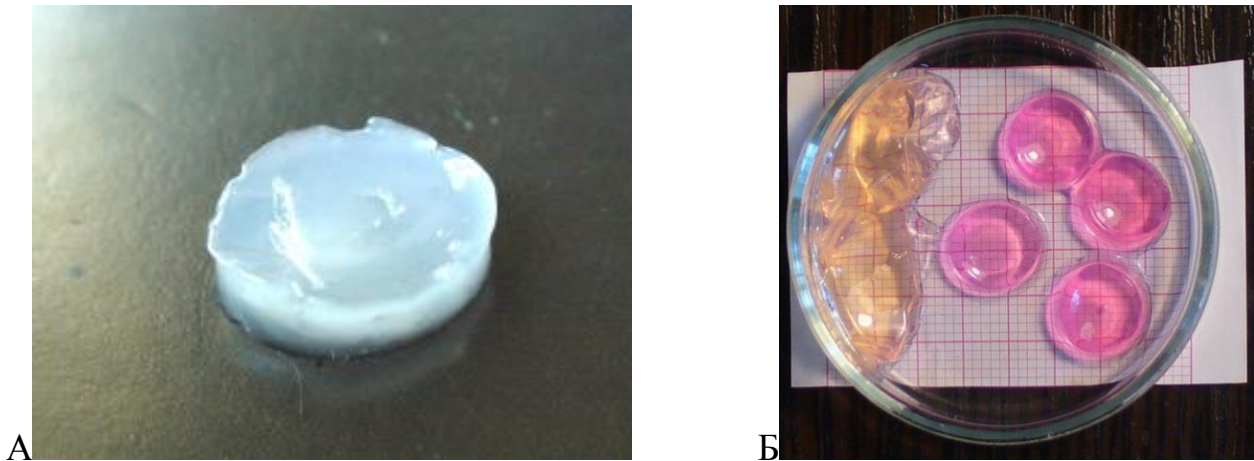


Рисунок 3.28 – Фото макропрепаратів гідрогелю на основі карбомеру 974Р: А – нативний гідрогель, Б – гідрогелі, регідратовані поживним середовищем DMEM/F12.

Під час розробки технології тривимірного культивування запропоновано регідратаційний та ін'єкційний спосіб заселення гідрогелів ММСК жирової тканини *in vitro*. Було проаналізовано вплив початкової кількості клітин на ефективність їх заселення. Встановлено, що при нанесенні 4×10^4 клітин на гідрогель циліндричної форми діаметром 10 мм (об'єм 400 мм^3) через 2 тижні культивування лише поодинокі клітини проникали на глибину до 1,5 мм від поверхні та набували видовженої форми. Більшість клітин зберігали округлу форму та знаходились на стінках гідрогелю (рис. 3.29).

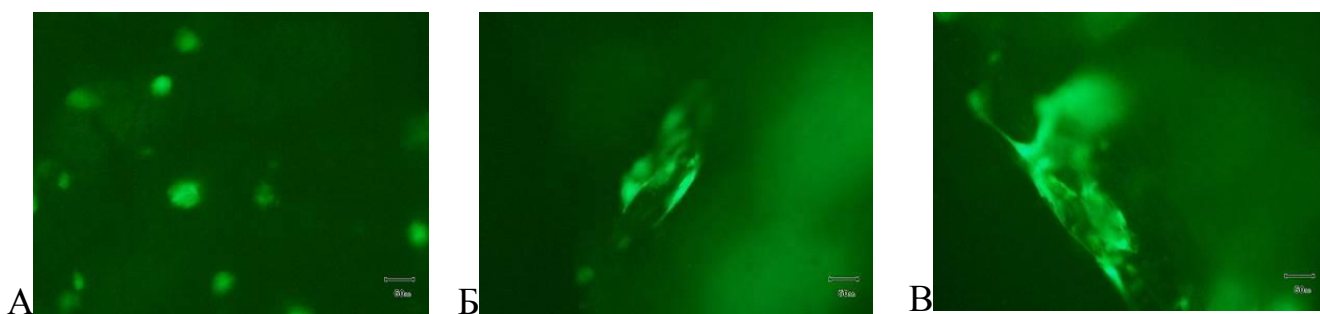


Рисунок 3.29 – Мікрофото культури ММСК жирової тканини миші в карбомерному гідрогелі при нанесенні 1×10^4 клітин на поверхню гідрогелю: А – 8-а доба культивування; Б – 18-а доба культивування; В – 29-а доба культивування. Флуоресцентна мікроскопія, експресія клітинами GFP (зелене забарвлення); шкала – 50 мкм.

При зовнішньому нанесенні 1×10^6 клітин на ранніх етапах культивування (до 14 діб) клітини розпластувались на поверхні гідрогелю. Протягом подальших 5-7 діб клітини завдяки власному міграційному потенціалу проникали в товщу гелю та набували видовженої форми, контактуючи між собою (рис. 3.30). Через 7-14 діб після проникнення кількість міжклітинних контактів збільшувалась і вони утворювали кластери та мережу з сусідніх клітин, що свідчить про їхню активну проліферацію та взаємодію.



Рисунок 3.30 – Мікрофото культури ММСК жирової тканини миші в карбомерному гідрогелі: А – 8-а доба культивування; Б – 18-а доба культивування; В – 29-а доба культивування. Флуоресцентна мікроскопія, експресія клітинами GFP (зелене забарвлення); шкала – 50 мкм.

Додатково було розроблено ін'єкційний спосіб введення ММСК у товщу гідрогелю за допомогою шприца та проаналізовано залежність ефективності заселення карбомерних гідрогелів від початкової кількості клітин. На відміну від регідратаційного способу, при ін'єкції 4×10^4 або 2×10^5 клітин у гідрогель на глибину 1-2 мм через 2 тижні культивування клітини розташовувались дифузно у всій товщі гідрогелю, набували видовженої форми, але також не контактували між собою. При ін'єкції 1×10^6 клітин у гідрогель на глибину 2-3 мм через 2 тижні культивування клітини набували полігональної форми завдяки численным відросткам, якими вони контактували між собою, формуючи мережу із сусідніх клітин (рис. 3.31).

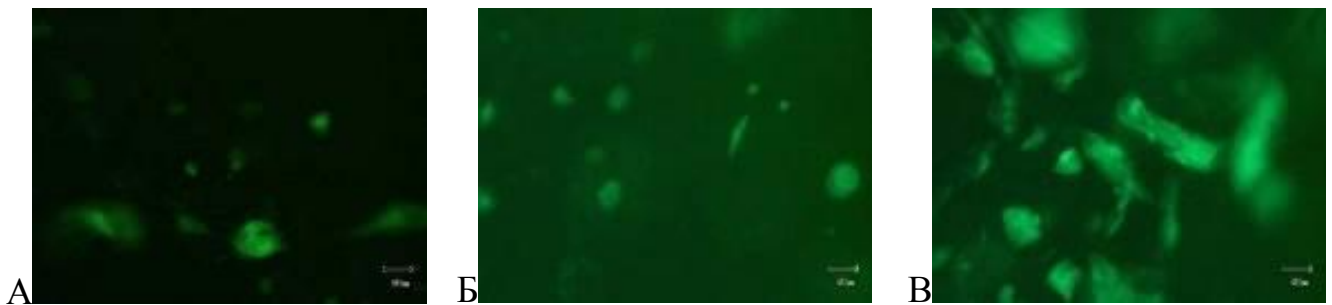


Рисунок 3.31 – Мікрофото культур ММСК жирової тканини миші в карбомерному гідрогелі при заселенні клітин шляхом мікроін'єкцій, 14-а доба культивування: А – початкова доза 4×10^4 клітин; Б – 2×10^5 клітин; В – 1×10^6 клітин. Флуоресцентна мікроскопія, експресія клітинами GFP (зелене забарвлення); шкала – 50 мкм.

Для оцінки здатності до спрямованого диференціювання ММСК жирової тканини в умовах тривимірних об'ємних культур розроблено методики їх спрямованого остеогенного диференціювання в гідрогелі. При забарвленні Alizarin Red S та BCIP/NBT препаратів гідрогелів з клітинами, які перебували в остеогенному середовищі, вже на 14-у добу виявлено позитивну реакцію на солі кальцію та лужну фосфатазу, відповідно, по периферії гідрогелю та в його товщі в місцях локалізації клітин (рис. 3.32).

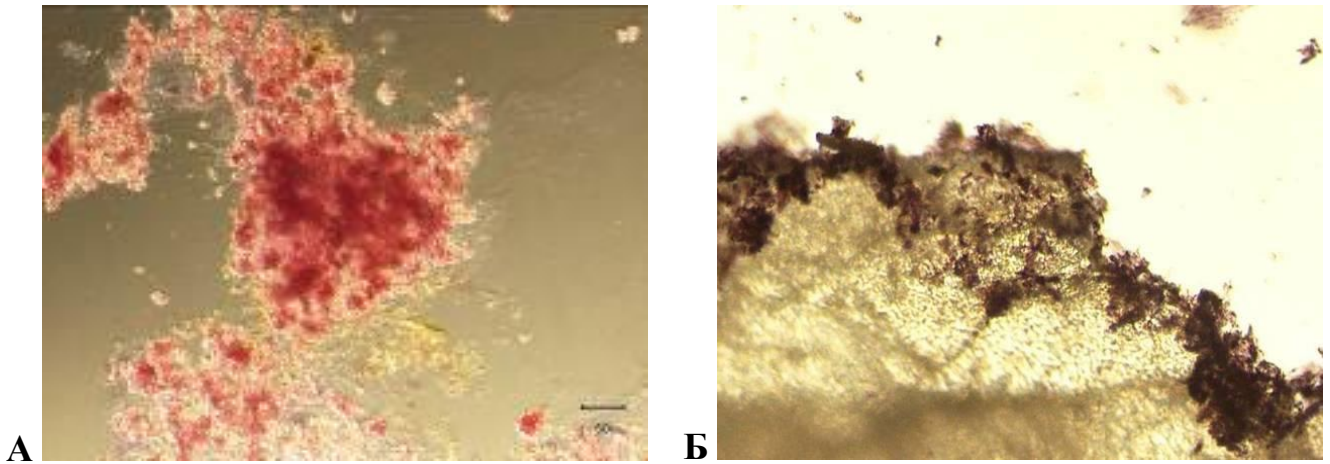


Рисунок 3.32 – Мікрофото препаратів гідрогелів, заселених ММСК жирової тканини миші, диференційовані в остеогенному напрямі: А – забарвлення Alizarin Red S на солі кальцію (червоний колір); Б – забарвлення BCIP/NBT на лужну фосфатазу (коричневий колір). Світлова мікроскопія, фазовий контраст, шкала – 50 мкм.

Отже, на першому етапі було розроблено технологію виготовлення об'ємного трансплантату на основі карбомерного гідрогелю, заселеного клітинами. Запропоновано модифіковані протоколи приготування гідрогелів на основі карбомеру і агарози в оригінальних пропорціях.

Проведено оцінку швидкості регідратації отриманих гідрогелів та їхньої здатності вивільняти барвник у динаміці культивування *in vitro*. Було підібрано оптимальну концентрацію клітин та метод заселення ними гідрогелів необхідної форми та розміру для досліджень *in vitro* та подальшої трансплантації на моделях пошкодження тканин *in vivo*.

Продемонстровано можливість спрямованого остеогенного диференціювання клітин в складі карбомерного гідрогелю. Отримані результати свідчать, що ММСК жирової тканини реалізують більший потенціал спрямованого диференціювання в умовах об'ємного тривимірного культивування, ніж у двовимірних моношарових культурах.

3.5 Регенеративний потенціал об'ємних культур ММСК жирової тканини в карбомерному гідрогелі при критичній ішемії кінцівок у мишей

На наступному етапі було оцінено здатність ММСК жирової тканини, заселених у гідрогелі, виживати в умовах *in vivo*, а також досліджено шляхи реалізації їхнього регенеративного потенціалу в складі об'ємних конструкцій при ішемічному пошкодженні тканин.

Через 14 діб після трансплантації під шкіру дорсолатеральної поверхні тіла миші гідрогелі зберігали свою форму, по периферії відмічено проростання тканин реципієнта в товщу гідрогелю (рис. 3.33 А). При цьому макроскопічно кількість судин по периферії трансплантатів була більшою в зразках, попередньо заселених клітинами *in vitro*, у порівнянні з гідрогелями без клітин (рис. 3.33 Б).

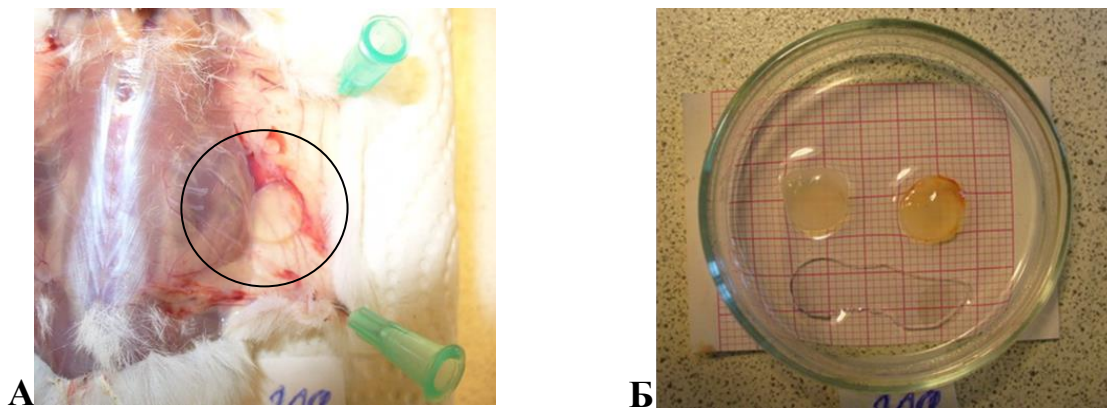


Рисунок 3.33 – Трансплантати гідрогелів, 14 діб після трансплантації: А – проростання судин реципієнта в трансплантат; Б – відпрепаровані трансплантати: ліворуч – без донорських клітин, праворуч – попередньо заселений ММСК жирової тканини миші.

При гістологічному дослідженні в товщі гідрогелів, які не були заселені донорськими клітинами перед трансплантацією, виявлено численні клітини реципієнта, які знаходяться на різній глибині від його країв (рис. 3.34 А). На препаратах трансплантатів, які попередньо були заселені клітинами, виявлено значну кількість клітин з синтезованим екстрацелюлярним матриксом між волокнами гідрогелю (рис. 3.34 Б).

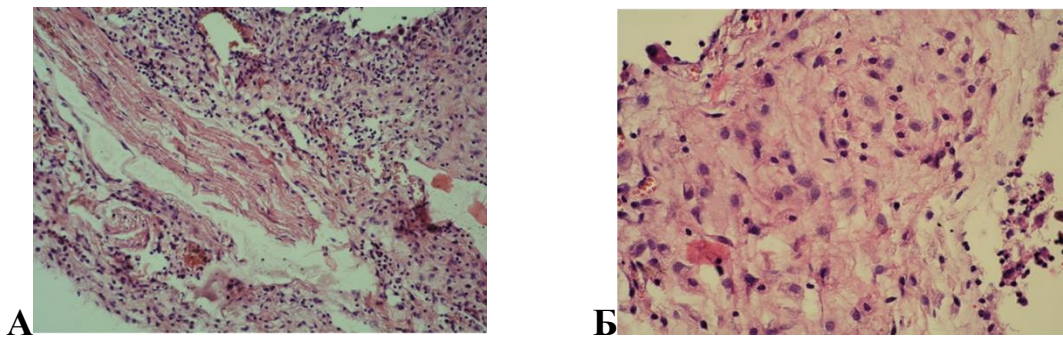


Рисунок 3.34 – Мікрофото гістопрепаратів гідрогелів, 14 днів після трансплантації, фарбування гематоксилін-еозином: А – трансплантат без донорських клітин; Б – трансплантат, попередньо заселений ММСК жирової тканини миші. Світлова мікроскопія, зб. $\times 200$.

Отже, було підтверджено здатність ММСК жирової тканини, культивованих у гідрогелях *in vitro*, виживати, проліферувати та продукувати міжклітинний матрикс *in vivo* в умовах трансплантації в організм реципієнта. При цьому також продемонстровано здатність клітин реципієнта заселяти трансплантований гідрогель *in vivo*.

Для подальшої оцінки регенеративних ефектів було змодельовано ішемічне пошкодження м'язів кінцівок у мишей шляхом перев'язки стегнової артерії. Відразу після моделювання ефективність оклюзії була підтверджена за допомогою лазерної доплерівської флоуметрії, що продемонструвала стійке достовірне зниження перфузії м'язів гомілок на 35-60 % у порівнянні з псевдооперованою кінцівкою (рис. 3.35).

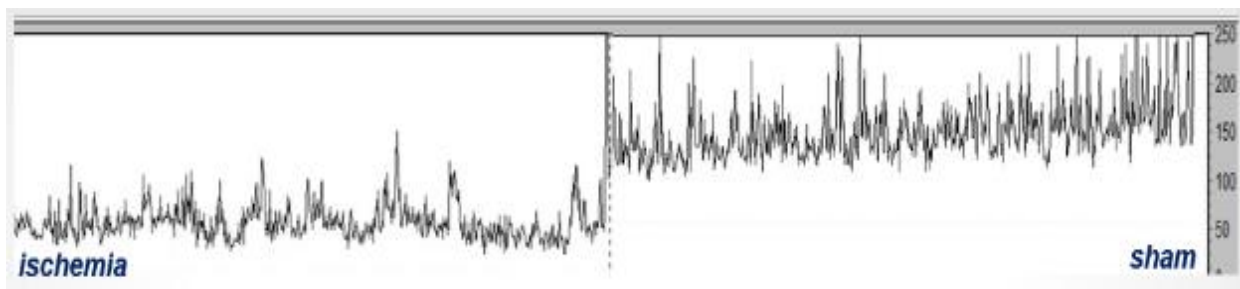


Рисунок 3.35 – Гістограми рівня перфузії м'язів гомілок миші за даними лазерної доплерівської флоуметрії: ischemia – кінцівка з перев'язаною стегновою артерією, sham – псевдооперована кінцівка без оклюзії (програмне забезпечення MoorVMS v. 2.1).

Стійкість патологічних змін при моделюванні критичної ішемії кінцівок була перевірена через 2 тижні після моделювання за допомогою інструментальних та гістологічних методів. При макроскопічному дослідженні виявлено блідість ішемізованої кінцівки та зниження її температури в порівнянні з псевдооперованою. За даними лазерної доплерівської флоуметрії у всіх піддослідних тварин встановлено стійке збереження зниженого рівня перфузії ішемізованих кінцівок у порівнянні з псевдооперованими (рис. 3.36).

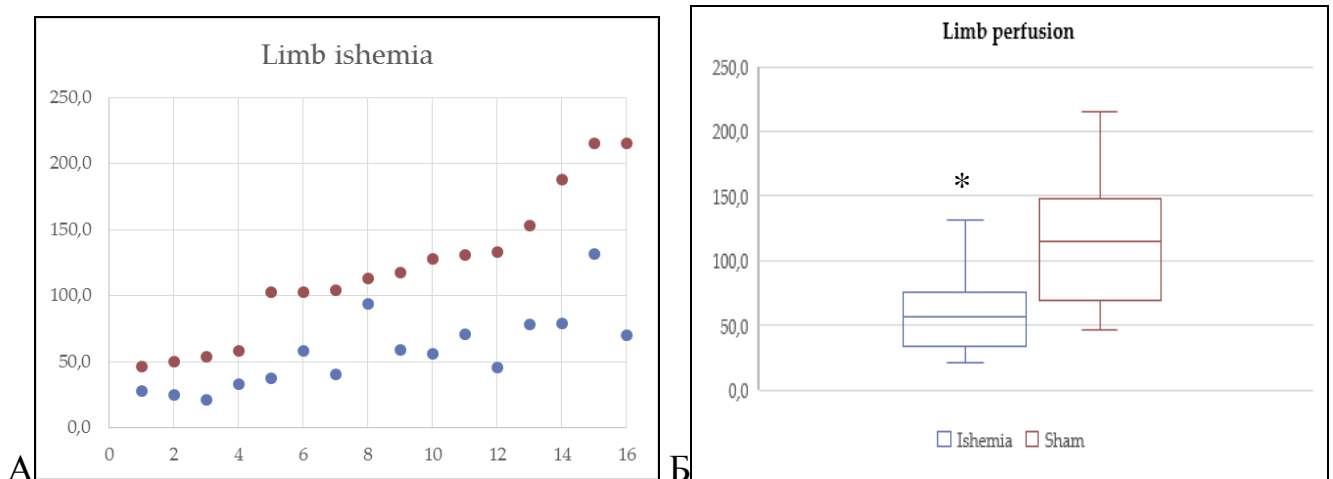


Рисунок 3.36 – Рівень перфузії м'язів гомілок мишей за даними лазерної доплерівської флоуметрії через 2 тижні після моделювання критичної ішемії: А – значення показника рівня перфузії (ум. од.) псевдооперованих (червоний колір) та ішемізованих (синій колір) кінцівок для кожної з тварин ($n = 16$); Б – середні значення показника рівня перфузії для відповідних груп порівняння ($n = 16$).

Примітка: * – $p \leq 0,05$ у порівнянні з псевдооперованою кінцівкою.

При гістологічному дослідженні біоптатів м'язів ішемізованих кінцівок через 2 тижні виявлено деструктивні зміни в м'язових волокнах у вигляді гомогенізації цитоплазми міоцитів, ядра яких стають витонченими та гетерохромними з вираженою базофілією (рис. 3.37 А). У міоцитах виявлено зменшення кількості м'язових волокон, ділянки руйнування міофібрил з гіпертрофією і гіперплазією ядер міоцитів, а також відмічено помірну лімфоцитарну інфільтрацію в прилеглій сполучній тканині (рис. 3.37 Б). При фарбуванні зрізів за методом Массона виявлено значне зменшення кількості міофібрил у м'язових волокнах (рис. 3.37 В).

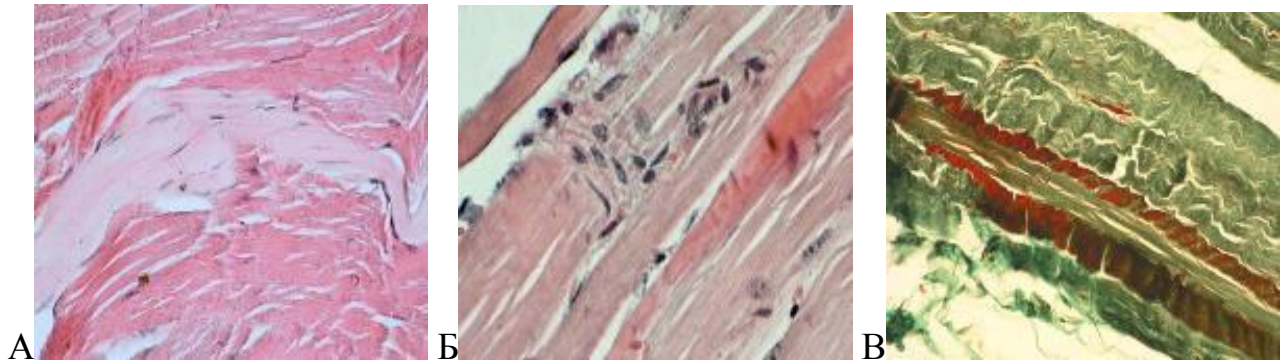


Рисунок 3.37 – Мікрофото гістологічних зрізів м'язів кінцівки миші через 2 тижні після моделювання критичної ішемії. Забарвлення гематоксилін-еозином (А, Б) та за Массоном (В). Світлова мікроскопія, зб. $\times 400$.

При трансплантації карбомерних гідрогелів, заселених ММСК жирової тканини, у тварин із змодельованою критичною ішемією кінцівки через 2 тижні шкіра стопи зберігала рожевий колір та відповідну температуру здорової кінцівки (рис. 3.38 Б).

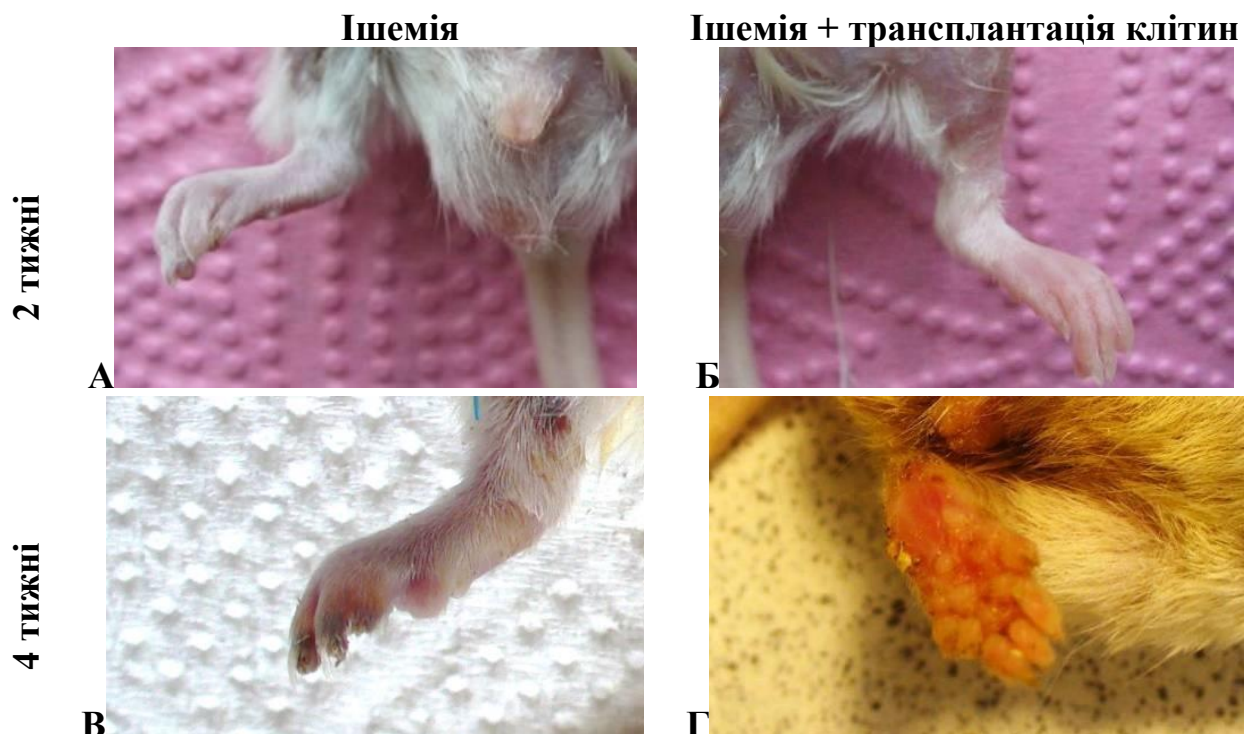


Рисунок 3.38 – Макропрепарати кінцівок мишей із змодельованою критичною ішемією та трансплантацією гідрогелів, заселених ММСК жирової тканини, через 2 (А, Б) та 4 (В, Г) тижні (опис у тексті).

У контрольній групі з критичною ішемією без трансплантації гідрогелів з клітинами шкіра стопи мала ціанотичний відтінок та нижчу температуру в порівнянні із здоровою кінцівкою (рис. 3.38, А). При цьому, порівнюючи з дослідною групою, рухова функція кінцівки була порушена. Через 4 тижні у тварин контрольної групи на фоні вираженого порушення рухової функції кінцівки відмічено некроз тканин дистальних фаланг пальців стопи (рис. 3.38 В), у той час як у мишей, яким трансплантували гідрогелі з клітинами, стопа мала рожевий колір, а кінцівка зберігала рухову функцію.

Рівень перфузії м'язів гомілки, виміряний за допомогою лазерного доплерівського флоуметра, був достовірно вищим ($p \leq 0,05$) у тварин, яким після моделювання критичної ішемії трансплантували гідрогелі з ММСК жирової тканини, як на 10-у (на 80,1 %), так і на 28-у добу (на 64,8 %) після трансплантації (рис. 3.39).

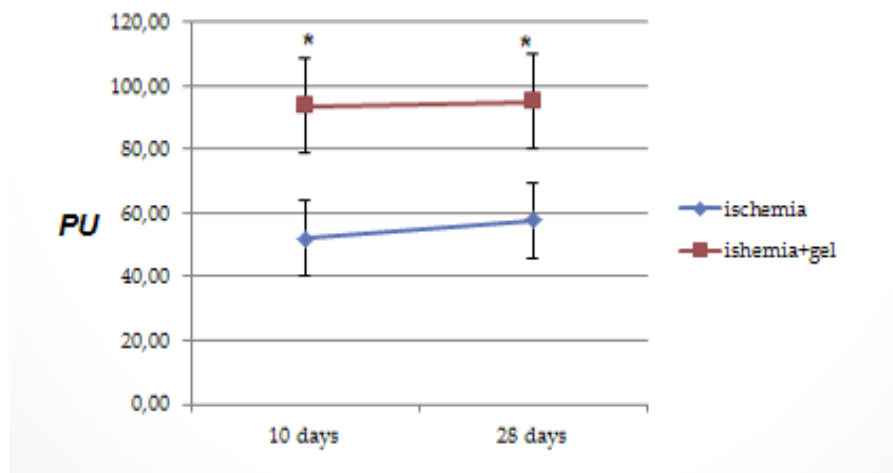


Рисунок 3.39 – Динаміка рівнів перфузії тканин гомілки в мишей із змодельованою критичною ішемією та трансплантацією гідрогелів, заселених ММСК жирової тканини; ум. од. перфузії (PU). Примітка: * – $p \leq 0,05$ у порівнянні з ішемізованою кінцівкою без трансплантації.

При гістологічному дослідженні м'язів кінцівки тварин контрольної групи через 4 тижні виявлено деструктивні зміни в м'язових волокнах у вигляді ущільнень, розривів та фрагментації (рис. 3.40 А). Симпласт містив апоптотичні клітини з чітко вираженими базофільними ядрами, розміщеними по периферії волокон. У кровоносних судинах у перимізії та ендомізії відмічали виражене кровонаповнення та стаз еритроцитів. У просвітах артеріол епімізію змішаний тромбоз з фібрином (рис. 3.40 В).

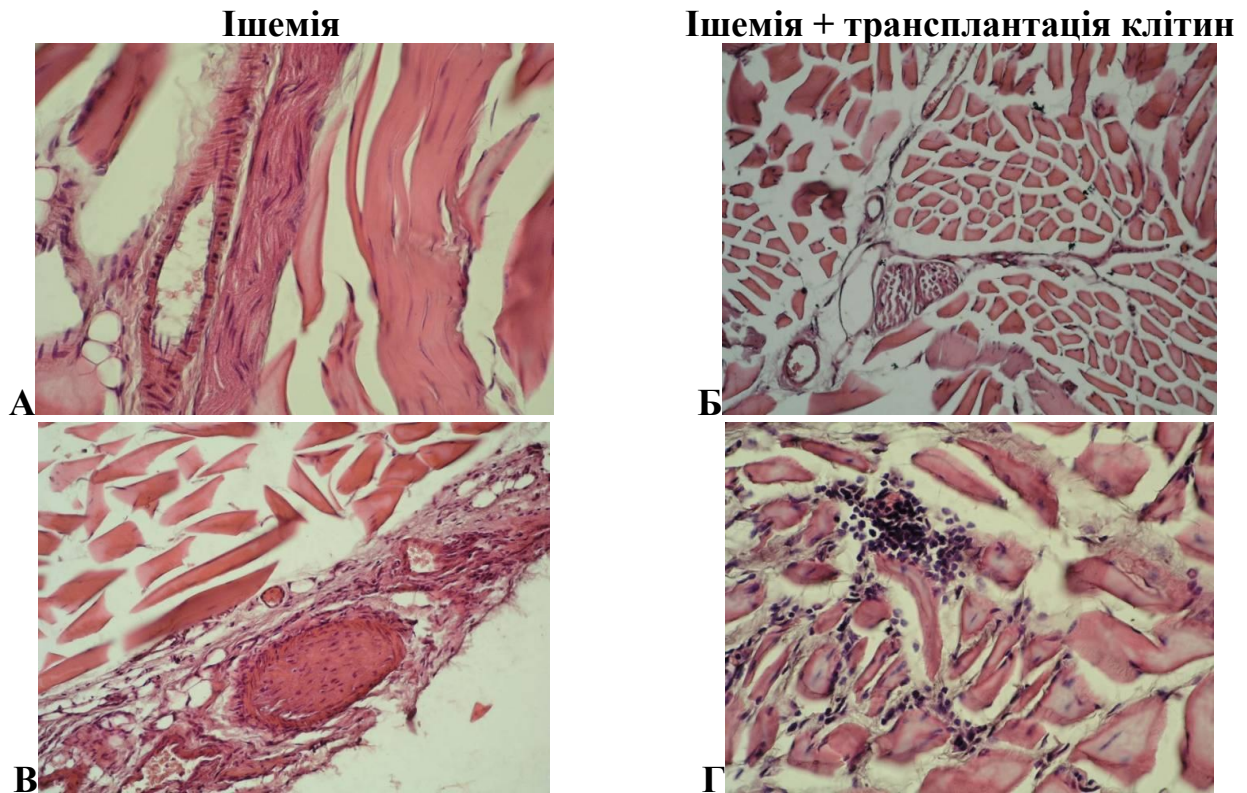


Рисунок 3.40 – Мікрофото гістологічних препаратів м'язів кінцівок мишей з критичною ішемією та трансплантацією гідрогелів з ММСК жирової тканини, 4 тижні після моделювання. Забарвлення гематоксилін-еозином. Світлова мікроскопія, зб. $\times 100$.

У препаратах тканини тварин дослідної групи з трансплантацією гідрогелів з клітинами м'язові волокна мали звичайну будову та базофільні ядра з добре вираженим хроматином, які розміщені по периферії симпласту (рис. 3.40 Б). У саркоплазмі волокон розміщені міофібрили з добре вираженою посмугованістю, проявів апоптозу не виявлено. Перимізій містить помірну кількість сполучнотканинних волокон. Кровоносні судини нормальної будови, їхні стінки вистелені витягнутим ендотелієм з базофільним ядрами. Виявлено поодинокі патологічно змінені пучки м'язових волокон з деструкцією та лімфоцитарною інфільтрацією навколо них (рис. 3.40 Г).

Отже, встановлено, що трансплантати гідрогелів, заселених ММСК жирової тканини, покращують перфузію м'язової тканини та її гістоморфологічні характеристики у тварин із змодельованою критичною ішемією кінцівки з позитивною динамікою до 4 тижня після трансплантації. Реалізація регенеративних ефектів відбувається завдяки пригніченню запалення і некрозу, активації неоангіогенезу та покращенню трофіки ішемізованих тканин.

3.6 Вікові особливості ММСК жирової тканини мишей в умовах моделювання дисфункції ніші

Зміни у функціональних характеристиках стовбурових клітин при старінні можуть мати критичний вплив як на реалізацію ними ендогенного репаративного потенціалу, так і на ефективність культивування і безпеку подальшого застосування клітинного продукту. Оскільки більшість патологічних станів, при яких виникає потреба в клітинній терапії, зустрічається переважно в людей похилого віку, беззаперечно стає актуальність встановлення критеріїв біологічної безпеки аутологічних ММСК жирової тканини, отриманих в умовах менопаузи та постменопаузального періоді, які супроводжуються дефіцитом естрогенів.

З огляду на той факт, що метаболізм жирової тканини значною мірою регулюється статевими гормонами, закономірно можна очікувати на зміни властивостей стовбурових клітин, отриманих з цього джерела при менопаузі. При цьому наслідки старіння можуть стосуватись не лише впливу на морфологію клітин та їхній проліферативний потенціал, але й на здатність диференціюватися в адипо-, остео- та хондрогенні лінії.

Тому метою одного з етапів дослідження було встановити *in vitro* характеристики морфології, проліферативного потенціалу та здатності до мультилінійного диференціювання ММСК жирової тканини в мишей з оваріоектомією в порівнянні з нормальними тваринами. Беручи до уваги значні зміни в жировій і кістковій тканині, пов'язані з гормональними змінами в літньому віці, наші дослідницькі зусилля було зосереджено саме на оцінці потенціалу остеогенного та адипогенного диференціювання клітин, що походять із жирової тканини. Ще одним із завдань було дослідити ультраструктурні характеристики багатоклітинних сфероїдів ММСК з жирової тканини, отриманих в умовах дефіциту естрогенів на моделі оваріоектомії в мишей різного віку, порівнюючи з відповідними за віком контролем. На цьому етапі наше дослідження було спрямоване на встановлення механізмів клітинної самоорганізації, контактної міжклітинної сигналізації, продукції позаклітинного матриксу та стійкості до гіпоксії залежно від розміру сфероїда.

На початку дослідження патогенетичних механізмів порушення функціональних властивостей ММСК в умовах дисфункції ніші було проведено порівняльний морфометричний аналіз структурних показників жирової тканини, як депо ММСК, у мишей різного віку із змодельованою оваріоектомією. Після цього з жирової тканини молодих та старих мишей СВА/Са з оваріоектомією або псевдооперацією було отримано первинні культури ММСК, які порівнювали за морфологічними, проліферативними, імунофенотипічними характеристиками та потенціалом спрямованого диференціювання в остеогенному та адипогенному напрямках.

Встановлено, що одночасно з достовірним зменшенням кількості адипоцитів на одиницю площі зрізу мікропрепарату жирової тканини в молодих оваріоектомованих мишей (вік 2 міс) спостерігали достовірно більші показники середньої площі адипоцитів, порівнюючи з контрольною групою тварин відповідного віку (рис. 3.41 А, Б). Так, у молодих оваріоектомованих мишей кількість адипоцитів на одиницю площі зрізу мікропрепарату ($626,0 \pm 74,1$ клітин/мм²) була достовірно меншою ($p < 0,05$) відповідно до групи порівняння без оваріоектомії ($915,0 \pm 72,3$ клітин/мм²). У молодих оваріоектомованих мишей середня площа адипоцитів становила $1112,0 \pm 51,0$ мкм² проти показника контрольної групи $794,0 \pm 37,2$ мкм² ($p < 0,001$).

У старих оваріоектомованих тварин на тлі відсутності зменшення кількості адипоцитів також відмічали достовірне збільшення їхньої середньої площі, порівнюючи з контрольною групою відповідного віку (рис. 3.41 А, Б). Хоча вірогідних змін у кількості адипоцитів у старих оваріоектомованих і контрольних мишей (вік 14 міс) не виявлено, але відмічено незначну тенденцію до зменшення кількості адипоцитів у старих оваріоектомованих мишей ($757,0 \pm 165,3$ клітин/мм²) у порівнянні з контрольною групою ($812,0 \pm 109,1$ клітин/мм²). Достовірно більшою ($p < 0,001$) була середня площа адипоцитів в групі старих оваріоектомованих мишей ($1294,0 \pm 58,7$ мкм²) у порівнянні з показником контрольної групи відповідного віку ($1061,0 \pm 56,1$ мкм²). Водночас, морфометричний аналіз судин показав відсутність достовірних змін в їхній кількості в усіх групах порівняння (рис. 3.41 В).

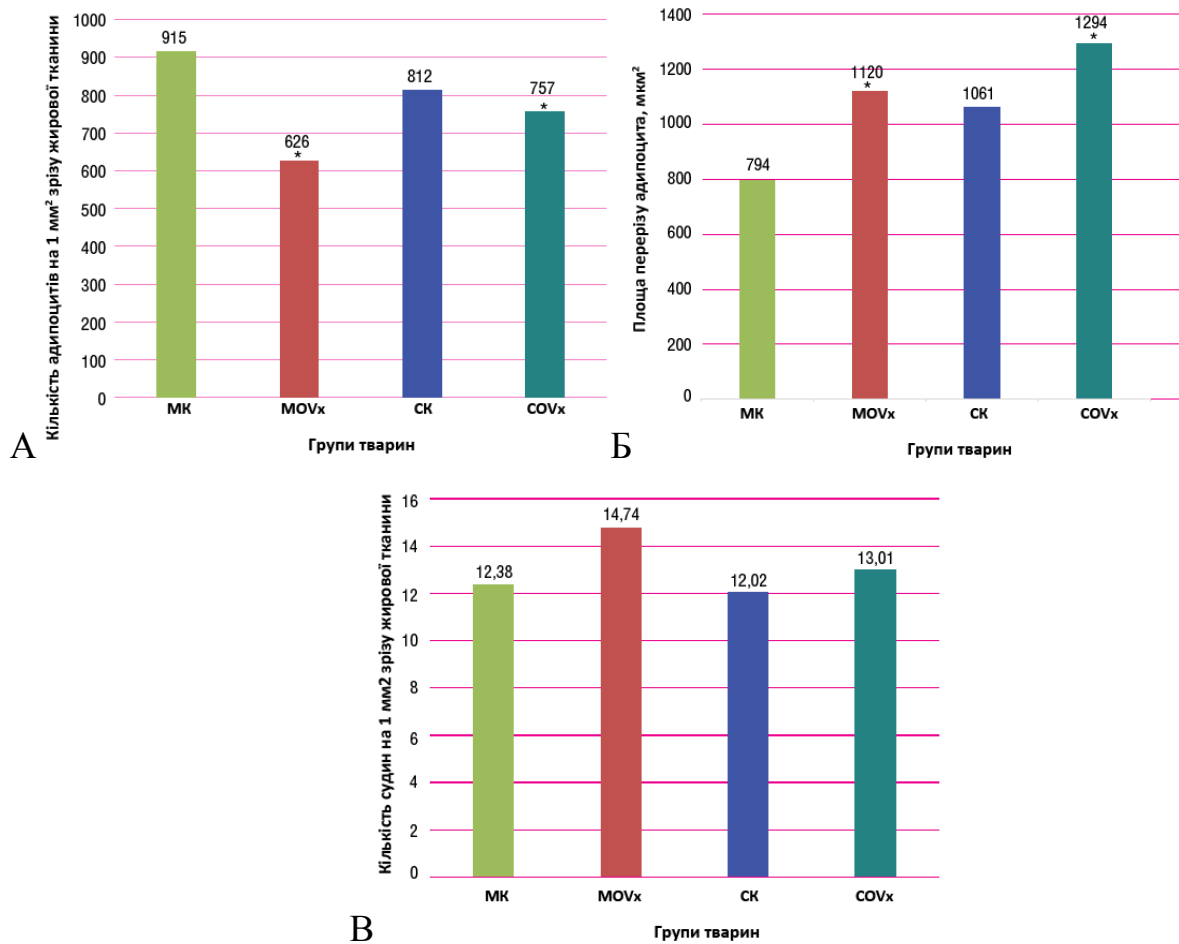


Рисунок 3.41 – Гістограми середньої кількості адипоцитів на 1 мм² площі зрізу жирової тканини (А), середньої площі перерізу адипоцита (Б) та кількості судин на 1 мм² зрізу (Б) у гістологічних препаратах жирової тканини мишей. Примітки: МК – молоді тварини, контрольна група, MOVx – молоді оваріоектомовані, СК – старі, контрольна група, COVx – старі оваріоектомовані. * – достовірні відмінності в порівнянні з контрольною групою відповідного віку.

Отже, в умовах оваріоектомії в самок мишей суттєво змінюються морфологічні характеристики жирової тканини, яка є нішею ММСК відповідного походження. При цьому збільшення адипоцитів у розмірах, ймовірно, спричинює збільшення маси тіла тварин. Так, маса молодих оваріоектомованих мишей ($25,0 \pm 1,6$ г) була достовірно більшою ($p < 0,0001$), ніж маса тварин контрольної групи ($22,5 \pm 1,2$ г) [160]. Це є додатковим підтвердженням залучення жирової тканини в патогенетичні механізми метаболічного синдрому, одним з клінічних проявів якого є ожиріння.

На наступному етапі дослідження була отримана первинна стромально-васкулярна фракція жирової тканини, з якої в процесі субкультивування виділена однорідна популяція стромальних клітин. Встановлено, що первинна культура адгезивних клітин жирової тканини як молодих, так і старих тварин, незалежно від впливу оваріоектомії, складається з різних за морфологією та розмірами елементів, що пов'язано з різноманітністю вихідної популяції клітин в складі SVF. Стромально-васкулярна фракція містить декілька типів клітин, включно з циркулюючими клітинами крові, фібробластами, перицитами, ендотеліальними прогеніторами. При заміні поживного середовища в процесі культивування слабоадгезивні та неадгезивні клітини елімінувались. На 5-7-у добу культивування кількість і розмір клітин збільшувались, завдяки чому спостерігали велику площу адгезії та швидкість досягнення конфлюенту по всій поверхні культуральних флаконів. У прикріпленому до поверхні флакону вигляді діаметр клітин варіював від 10 до 250 мкм, при цьому спостерігали певні характерні їхні форми: фібробластоподібні, веретеноподібні, зірчастоподібні, деколи з кількома відростками, з чітко візуалізованими ядрами. В середньому через 12-14 діб культивування адгезивні клітини SVF формували до 90 % конфлюентного моношару. Після субкультивування культура клітин досягала субконфлюентного стану в середньому на 3-ю добу та складалась переважно з популяції фібробластоподібних клітин.

За допомогою імунофенотипування методом проточної цитометрії в клітин з жирової тканини всіх груп першого пасажу була встановлена експресія мезенхімальних маркерів CD44 ($86,9 \pm 4,4$ %), CD73 ($38,9 \pm 11,9$ %) та CD90 ($40,9 \pm 13,7$ %), яка після подальших пасажів наростала та відповідала типовому для ММСК фенотипу (рис. 3.42). При цьому відмічалася низька експресія гемопоетичного маркера CD45 (< 3 %). Слід зазначити, що статистично значущих відмінностей за жодним із маркерів між групами контролю обох вікових груп виявлено не було, як і відмінностей між групами тварин, оваріоектомованих в молодому та старому віці [358].

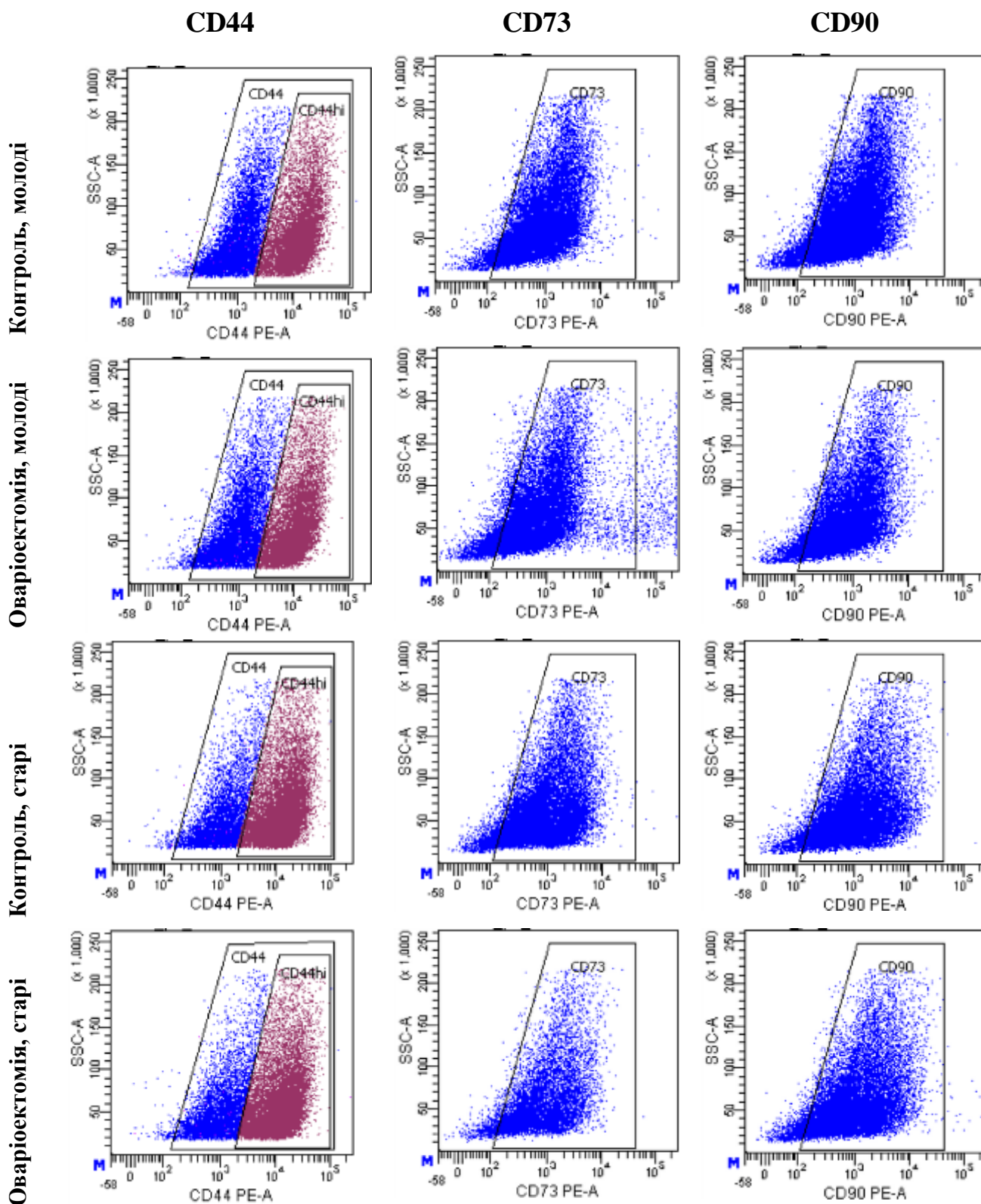


Рисунок 3.42 – Гістограми експресії стромальних маркерів CD44, CD73 і CD90 в культурі ММСК жирової тканини мишей експериментальних груп за даними проточної цитометрії, 2-й пасаж. Програмне забезпечення BD FACSDiva 6.1.2.

Ефективність утворення колоній є важливим показником якості клітинних препаратів та прогнозування ефективності реалізації їхнього регенеративного потенціалу, оскільки демонструє як здатність до самопідтримання клітинної популяції, так і до розвитку в певному напрямі. За результатами CFU-тесту показано статистично значущу різницю між колонієутворюючою здатністю ММСК жирової тканини в молодих і старих мишей. Так, на 300 ММСК жирової тканини в середньому за 14 діб утворилося $31,0 \pm 7,2$ колоній (ефективність – 10,3 %) у групі молодих тварин з оваріоектомією та $43,0 \pm 6,8$ колоній (ефективність – 14,3 %) в групі контрольних псевдооперованих тварин відповідного віку ($p < 0,05$). Водночас, показана відсутність відмінностей між показниками CFU-тесту в групах старих оваріоектомованих ($31,3 \pm 12,6$) та псевдооперованих тварин ($30,3 \pm 10,1$), але спостерігалось суттєве зниження клоногенного потенціалу ММСК жирової тканини від старих мишей, порівнюючи із групою молодих контрольних тварин ($p < 0,05$) (рис. 3.43).

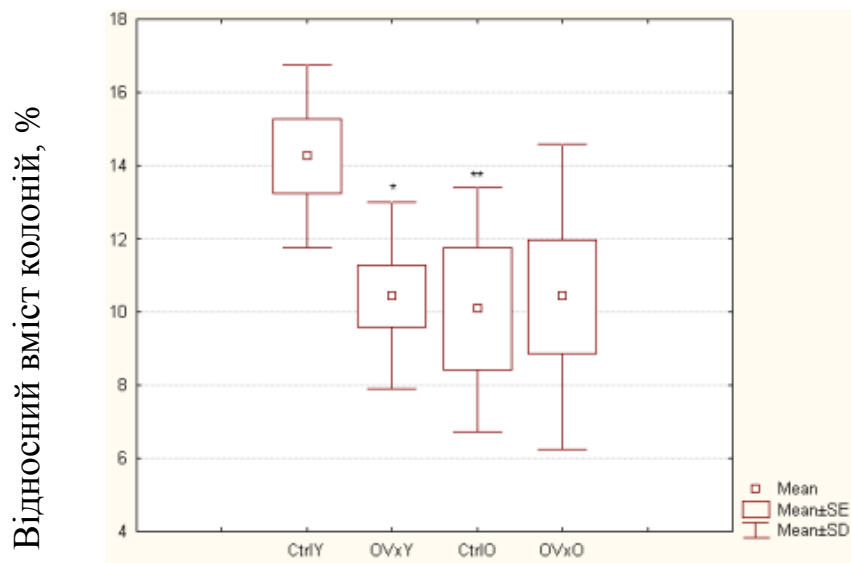


Рисунок 3.43 – Гістограми результатів CFU-тесту: ефективність колонієутворення ММСК жирової тканини в піддослідних мишей.

Примітки: CtrlY – контроль, молоді (n = 6); OVxY – оваріоектомія, молоді (n = 9); CtrlO – контроль, старі (n = 4); OVxO – оваріоектомія, старі (n = 7).

* – $p < 0,05$, ** – $p < 0,05$ – порівнюючи з контрольною групою молодих тварин.

Час подвоєння популяції (PDT тест) характеризує проліферативну активність культур клітин *in vitro* для досягнення необхідної їхньої кількості для подальших досліджень або ж терапевтичної дози для трансплантації. Також цей показник опосередковано екстраполює функціональний потенціал ММСК за здатністю активно розмножуватись у відповідь на сигнали пошкодження, що є визначальним для реалізації регенеративного потенціалу *in vivo*. Визначення кінетики росту клітин в культурі *in vitro* показало, що ММСК жирової тканини молодих тварин з оваріоектомією проліферують майже вдвічі повільніше в порівнянні з контрольними тваринами відповідного віку ($6,4 \pm 2,3$ та $3,1 \pm 1,0$ дні, відповідно; $p < 0,05$). Водночас, у старих мишей з оваріоектомією та псевдооперованих теж відзначали збільшення часу подвоєння популяції ($6,8 \pm 2,5$ та $10,9 \pm 4,2$ днів, відповідно) і, як наслідок, сповільнення проліферації клітин, порівнюючи із групою молодого контролю (рис. 3.44).

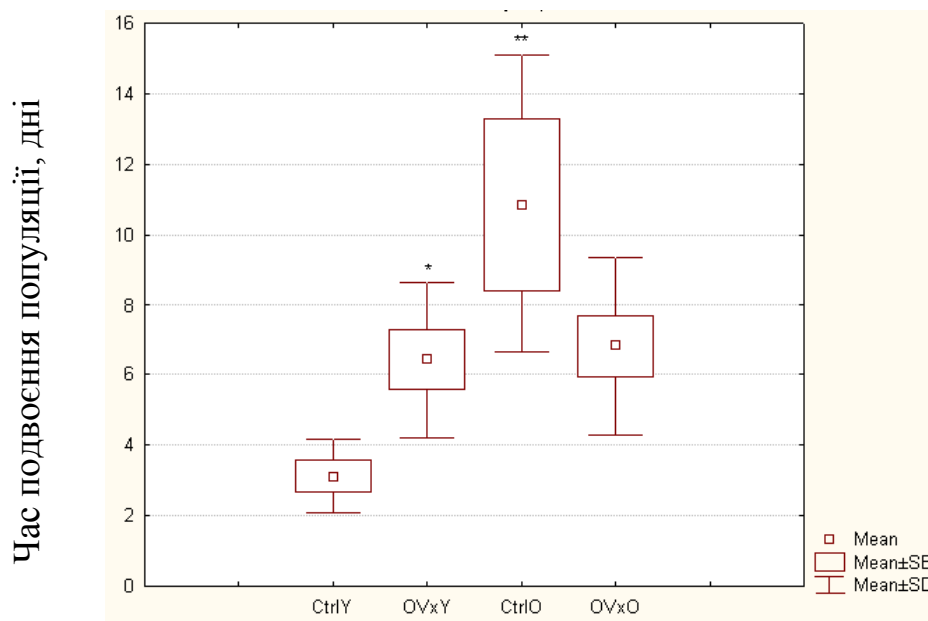


Рисунок 3.44 – Гістограми результатів PDT тесту ММСК жирової тканини мишей, кількість днів, необхідна для подвоєння популяції клітин в культурі *in vitro*.

Примітки: CtrlY – контроль, молоді (n = 5); OVxY – оваріоектомія, молоді (n = 7); CtrlO – контроль, старі (n = 3); OVxO – оваріоектомія, старі (n = 8).

* – $p < 0,05$, ** – $p < 0,05$ порівнюючи з контрольною групою молодих тварин.

Вікові особливості реалізації мультипотентного потенціалу культур ММСК жирової тканини мишей в нормі та в умовах змодельованої дисфункції ніші було оцінено за здатністю до спрямованого диференціювання в остеогенному та адипогенному напрямках. Показано, що на 14-у добу адипогенне диференціювання *in vitro* відбулось в культурах ММСК жирової тканини усіх експериментальних груп (рис. 3.45). Встановлено статистично значущу відмінність між контрольною і оваріоектомованою групами молодих мишей за результатами показників оптичної щільності середовищ диференціювання – оваріоектомія сприяла посиленню на 93,9 % адипогенного потенціалу ММСК *in vitro*. При цьому ступінь диференціювання в групах старих мишей статистично не відрізнявся від такого в групі молодих оваріоектомованих тварин (табл. 3.2).

Таблиця 3.2 – Показники оптичного поглинання середовища після фарбування барвником Oil Red O культури ММСК жирової тканини, спрямовано диференційованих в адипогенному напрямі, ум. од.; довжина хвилі 500 нм.

Молоді				Старі			
К		OVx		К		OVx	
PC	PC+ФАД	PC	PC+ФАД	PC	PC+ФАД	PC	PC+ФАД
0,096 ±	0,148 ±	0,128 ±	0,287 ±	0,132 ±	0,232 ±	0,114 ±	0,183 ±
0,10	0,10*	0,12	0,10*#	0,04	0,10*	0,01	0,01*
(n = 6)	(n = 6)	(n = 14)	(n = 8)	(n = 8)	(n = 8)	(n = 8)	(n = 12)

Примітки: PC – стандартне ростове середовище; PC+ФАД – ростове середовище з факторами адипогенного диференціювання. * – $p < 0,05$ у порівнянні з контрольними культурами тварин відповідного віку без додавання індукторів; # – $p < 0,05$ у порівнянні з молодими тваринами відповідного віку і стандартними умовами культивування.

Можна припустити, що посилене адипогенне диференціювання ММСК жирової тканини *in vitro* визначає активацію адипогенезу *in vivo* та реалізацію подальшого ожиріння, що підтверджується достовірним збільшенням ($p < 0,0001$) маси тіла оваріоектомованих тварин ($25,0 \pm 1,6$ г), порівнюючи з контрольною групою ($22,5 \pm 1,2$ г) того ж віку (рис. 3.46).

Стандартне ростове середовище

Ростове середовище з факторами адипогенного диференціювання

Контроль, молоді



Оваріоектомія, молоді



Контроль, старі



Оваріоектомія, старі

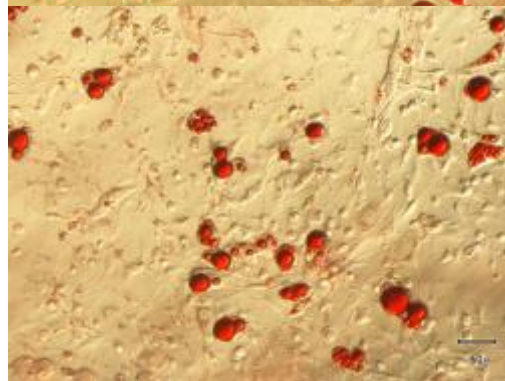
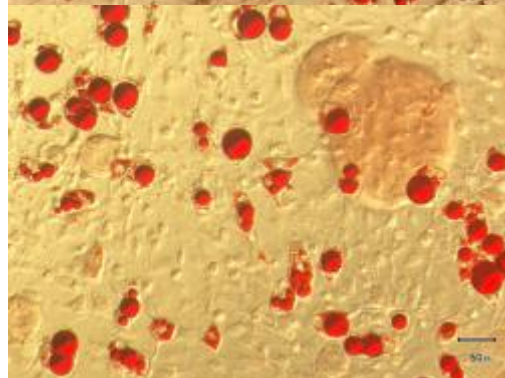
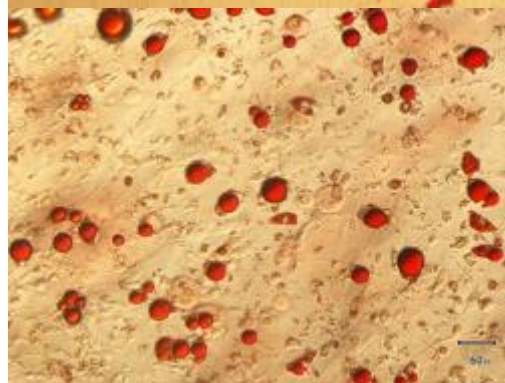
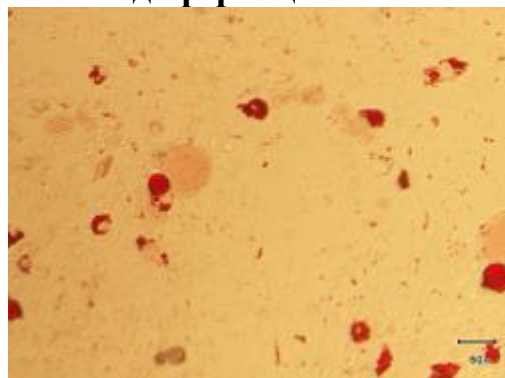


Рисунок 3.45 – Мікрофото препаратів культур ММСК жирової тканини мишей після спрямованого адипогенного диференціювання. Ліпідні включення в клітинах забарвлені барвником Oil Red O (червоний колір). Світлова мікроскопія, шкала – 50 мкм.

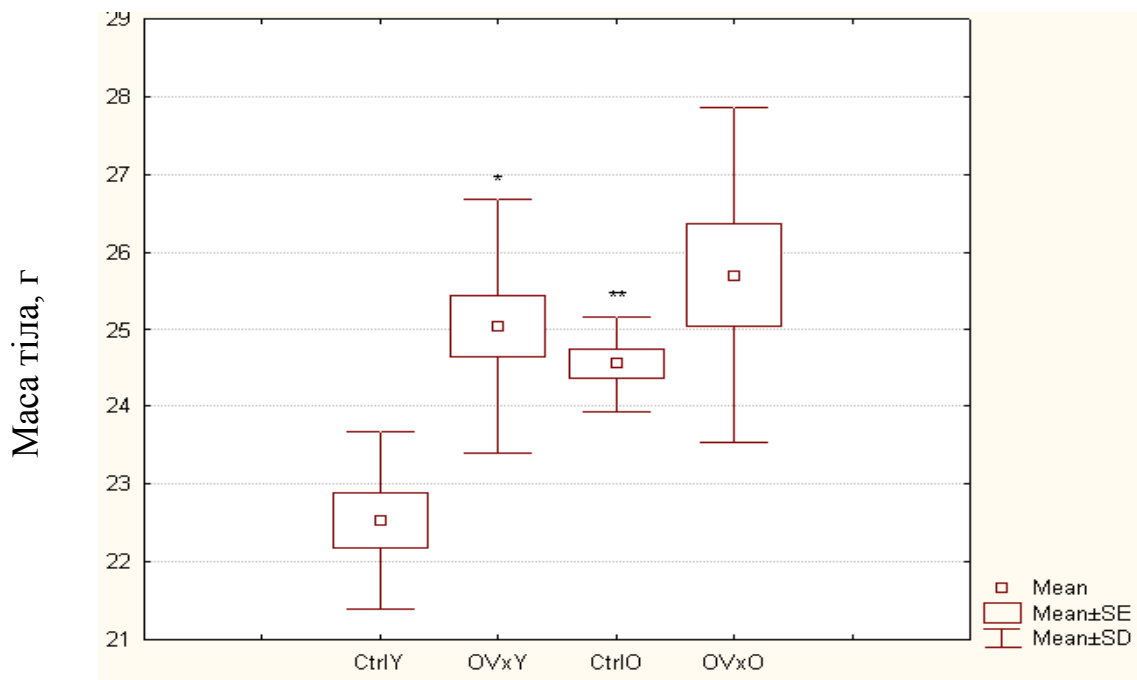


Рисунок 3.46 – Гістограми визначення маси тіла експериментальних тварин. CtrlY – контроль, молоді (n = 11); OVxY – оваріоектомія, молоді (n = 17); CtrlO – контроль, старі (n = 12); OVxO – оваріоектомія, старі (n = 11).

Примітки: * – $p < 0,0001$ у порівнянні з контрольною групою відповідного віку; ** – $p < 0,002$ у порівнянні з контрольними тваринами молодого віку.

Показано, що остеогенне диференціювання *in vitro* відбулося в культурах ММСК жирової тканини усіх експериментальних груп. У відповідь на остеогенну індукцію ММСК жирової тканини на 21-у добу культивування спостерігали високу активність лужної фосфатази (рис. 3.47) та мінералізацію міжклітинного матриксу солями кальцію (рис. 3.48).

Слід зазначити, що оваріоектомія в молодих тварин сприяла зниженню потенціалу до остеогенного диференціювання, що проявилось у зниженні на 37,3% інтенсивності мінералізації солями кальцію позаклітинного матриксу в порівнянні з відповідною за віком контрольною групою. У старих тварин обох груп статистично значущих відмінностей за цим показником не виявлено, але встановлено недостовірно менші абсолютні значення показника оптичної щільності в порівнянні з контрольною групою молодих тварин (табл. 3.3).

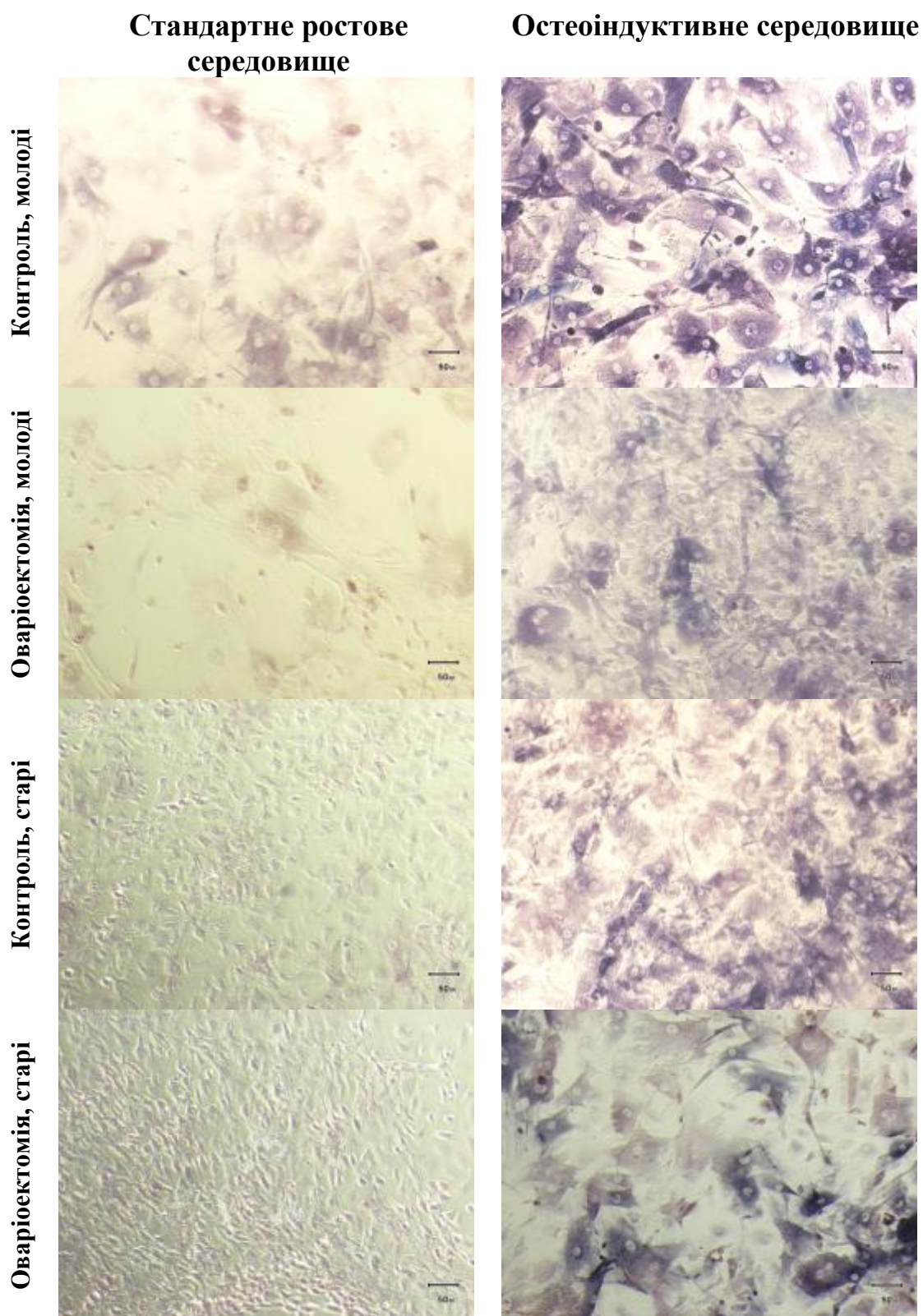


Рисунок 3.47 – Мікрофото культур ММСК жирової тканини мишей на 21-у добу культивування в ростовому середовищі без факторів диференціювання (контроль) та з факторами остеогенного диференціювання. Цитохімічне визначення активності лужної фосфатази; забарвлення ВСІР/НВТ (фіолетовий колір). Світлова мікроскопія, шкала – 50 мкм.

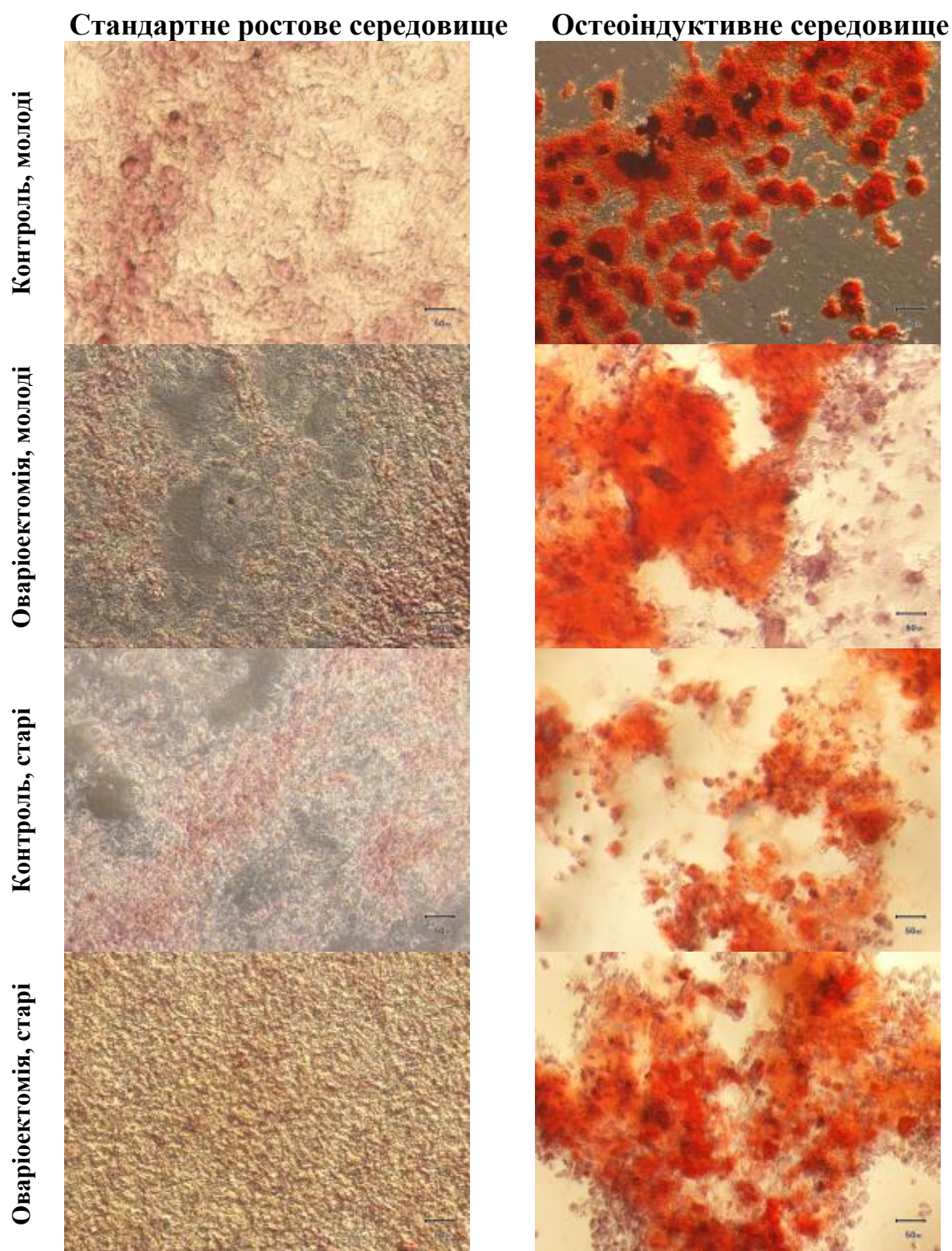


Рисунок 3.48 – Мікрофото культур ММСК жирової тканини мишей на 21-у добу культивування в ростовому середовищі без факторів диференціювання (контроль) та з факторами остеогенного диференціювання. Інтенсивність мінералізації позаклітинного матриксу солями кальцію. Забарвлення Alizarin Red S (червоний колір). Світлова мікроскопія, шкала – 50 мкм.

Таблиця 3.3 – Показники оптичного поглинання середовища після фарбування барвником Alizarin Red S культури ММСК жирової тканини мишей, спрямовано диференційованих в остеогенному напрямі, ум. од.

Молоді				Старі			
К		OVx		К		OVx	
PC	PC+ФОД	PC	PC+ФОД	PC	PC+ФОД	PC	PC+ФОД
0,35 ± 0,10 (n = 4)	0,59 ± 0,14* (n = 4)	0,29 ± 0,06 (n = 8)	0,37 ± 0,09*# (n = 8)	0,26 ± 0,07 (n = 7)	0,38 ± 0,07* ^α (n = 7)	0,28 ± 0,09 (n = 8)	0,39 ± 0,09* ^α (n = 8)

Примітки: PC – стандартне ростове середовище; PC+ФОД – ростове середовище з факторами остеогенного диференціювання; * – $p < 0,05$ у порівнянні з культурами, культивованих без додавання остеогенних індукторів; # – $p < 0,05$ у порівнянні з контрольною групою відповідного віку і умов культивування; ^α – $p < 0,05$ у порівнянні з контрольною групою молодих тварин і стандартними умовами культивування.

Отже, з жирової тканини експериментальних мишей лінії CBA/Ca обох вікових груп з оваріоектомією та псевдооперацією було виділено стромально-васкулярну фракцію та культивовано ММСК, які проліферували в культурі *in vitro* в стандартних умовах культивування та з додаванням специфічних факторів диференціювання. Показано, що незалежно від віку, гетерогенна SVF містить популяцію клітин, які характеризуються високими адгезивними властивостями, фенотипом, характерним для ММСК і здатністю до мультилінійного диференціювання в остеогенному та адипогенному напрямках. При цьому встановлено певні вікові особливості колонієутворюючого, проліферативного та диференціального потенціалу ММСК як у нормальних тварин, так і в умовах змодельованої оваріоектомією дисфункції ніші стовбурових клітин жирової тканини (збільшення часу подвоєння популяції, зниження потенціалу до колонієутворення та остеогенного диференціювання, а також посилення адипогенезу в культурі від молодих тварин), що необхідно враховувати при прогнозуванні регенеративного потенціалу клітинної терапії в пацієнтів різного віку [357].

Враховуючи результати дослідження двовимірних моношарових культур, додатково було проведено порівняльний аналіз ультраструктурних характеристик об'ємних тривимірних культур мікрмаси ММСК жирової тканини від тварин різного віку в нормі та в умовах змодельованої дисфункції ніші.

Результати електронної мікроскопії показали, що ММСК жирової тканини молодих мишей в неадгезивних умовах на початкових етапах формували культуру більш-менш однорідних за розміром багатоклітинних сфероїдів діаметром від 75 мкм до 95 мкм, які склалися з кількох шарів (рис. 3.49 А). Сфероїд складається з щільної зовнішньої зони та внутрішньої області, де круглі або полігональні клітини вбудовані в позаклітинний матрикс (ЕСМ). Внутрішня зона містила багатокутні або округлі клітини, які мали одне неправильної форми або декілька великих еухроматичних ядер з одним або декількома ядерцями (рис. 3.49 В). Ці клітини були щільно упаковані в позаклітинний матрикс з вузькими міжклітинними просторами.

Окремі подовжені клітини зовнішньої зони та частини внутрішньої зони сфероїдів також були вбудовані в позаклітинний матрикс, а їхня цитоплазма, надзвичайно багата вакуолями, містила помірну кількість ліпідних крапель. У ММСК зовнішньої частини мікрмас було багато тонких псевдоподій, що відходили від поверхні клітин (рис. 3.49 С). У внутрішній ділянці органоїда ММСК формували між собою щільні з'єднання мембран, що підкреслює активну контактну взаємодію між клітинами в умовах тривимірного культивування (рис. 3.49 D). Витягнуті електронно-щільні мітохондрії з правильною структурою крист і переважною конденсованою матрицею спостерігалися в ММСК з контрольної групи молодих тварин, що могло вказувати на високу метаболічну активність (рис. 3.49 Е). Цитоплазма з пучками проміжних філаментів мала зернистий вигляд через велику кількість вільних рибосом і полірибосом, що вказує на активний синтез білка (рис. 3.49 Е, F).

Цікаво, що цистерни шорсткого ендоплазматичного ретикулуму часто були розширені та містили помірно електронний матеріал (рис. 3.49 D-F). Крім того, трансмісійна електронна мікроскопія показала добре розвинений апарат Гольджі в

приядерній зоні, що виробляє великі гранули (рис. 3.49 F). Групи мультивезикулярних тілець, як особливий вид пізніх ендосом, також спостерігали в цитоплазмі (рис. 3.49 G). Мультивезикулярні тіла були дуже неоднорідними за розміром і морфологією. Окремі внутрішньоклітинні елементи, такі як мітохондрії, були секвестровані всередині аутофагосоми, яка потім злилася з мультивезикулярними тілами, щоб утворити амфісому (рис. 3.49 G). Окрім того, електронно-мікроскопічний аналіз виявив процес активного екзоцитозу на плазматичній мембрані ММСК у складі 3D органоїдів (рис. 3.49 H).

Трансмійсна електронна мікроскопія показала, загалом, схожу ультраструктурну архітектуру мікромас від старих тварин у порівнянні з молодими, але й були деякі суттєві відмінності. ММСК від старих мишей контрольної групи сформували культуру більш неоднорідних за розміром сфероїдів (від 60 мкм до 370 мкм у діаметрі).

На відміну від органоїдів мікромаси, утворених від молодих тварин, ММСК старих мишей не були щільно упаковані та мали широкий міжклітинний простір (рис. 3.50 A). Також було важко чітко розрізнити зовнішній і внутрішній шари мікромаси. У цих ММСК мітохондріальна популяція була гетерогенною, що може свідчити про збільшення мітохондріального поділу та/або порушення злиття мітохондрій. Були виявлені мітохондрії як з електронно-щільним конденсованим, так і з просвітленим матриксом, що вказує на їхню різну дихальну активність (рис. 3.50 B).

В цитоплазмі клітин від старих мишей також спостерігали значно менше полісом і рибосом, прикріплених до поверхні шорсткого ендоплазматичного ретикулуму, що вказує на низьку білкову синтетичну активність (рис. 3.50 C). Крім того, цитоплазма ММСК у таких сфероїдах мала помітно збільшену кількість ліпідних крапель, порівнюючи з клітинами, отриманими від молодих тварин (рис. 3.50 D). Цитоплазма була надзвичайно багатою ендосомальними елементами з типовими багатошаровими та мультивезикулярними структурами (рис. 3.50 E).

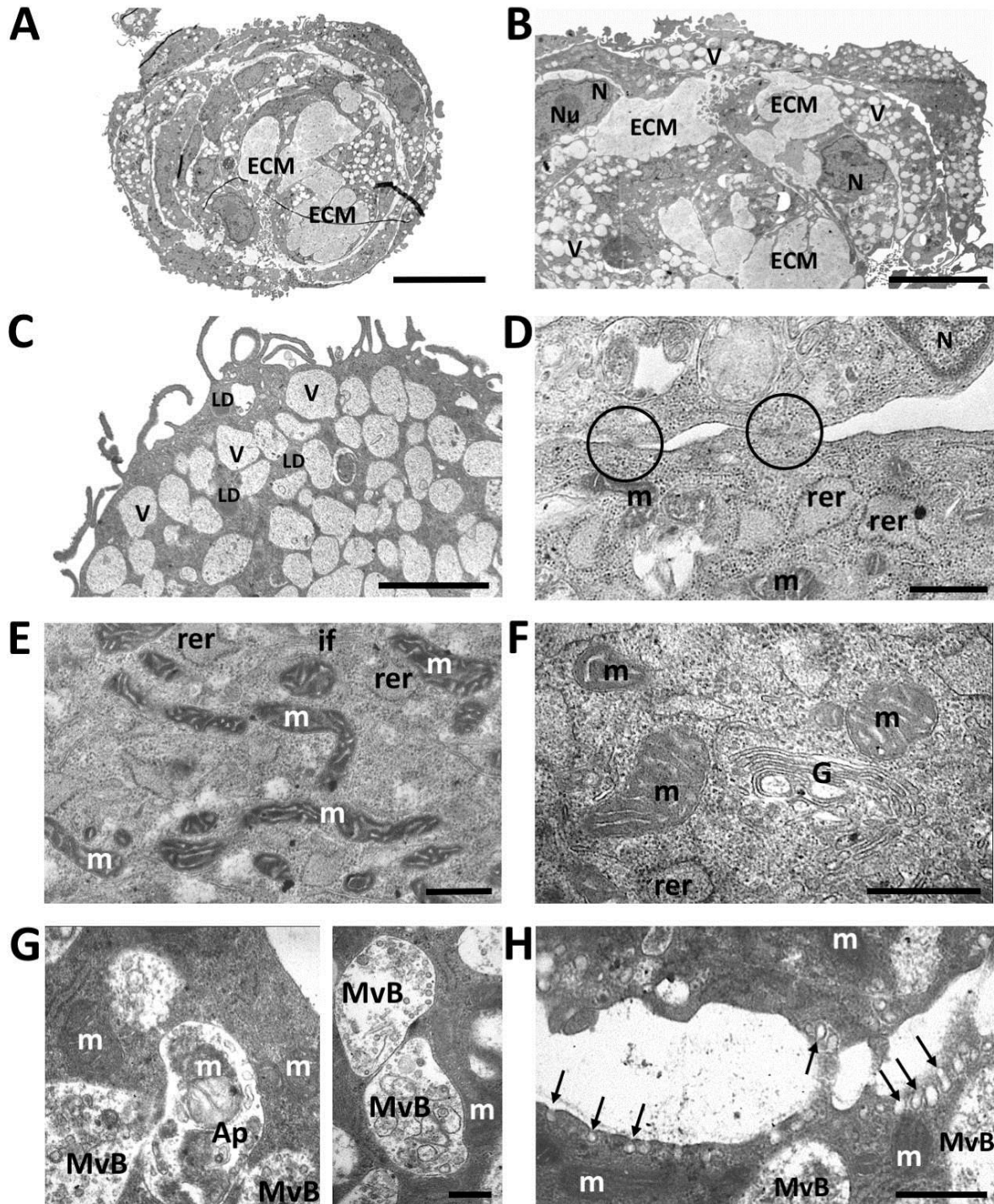


Рисунок 3.49 – Мікрофото ультраструктури сфероїдів із ММСК жирової тканини молодих мишей контрольної групи (опис в тексті). Електронна мікроскопія, масштабні шкали: А – 25 мкм, В – 15 мкм, С – 2 мкм, D, Е, Н – 1 мкм, F, G – 0,5 мкм.

Примітки: V – вакуолі, N – ядра, Nu – ядерця, LD – ліпідні краплі, m – мітохондрії, rer – шорсткий ендоплазматичний ретикулум, if – пучки проміжних ниток, G – апарат Гольджі, MvB – ендосомальні мультівезикулярні тільця, Ap – аутофагосоми; стрілки – місця активного екзоцитозу на плазматичній мембрані.

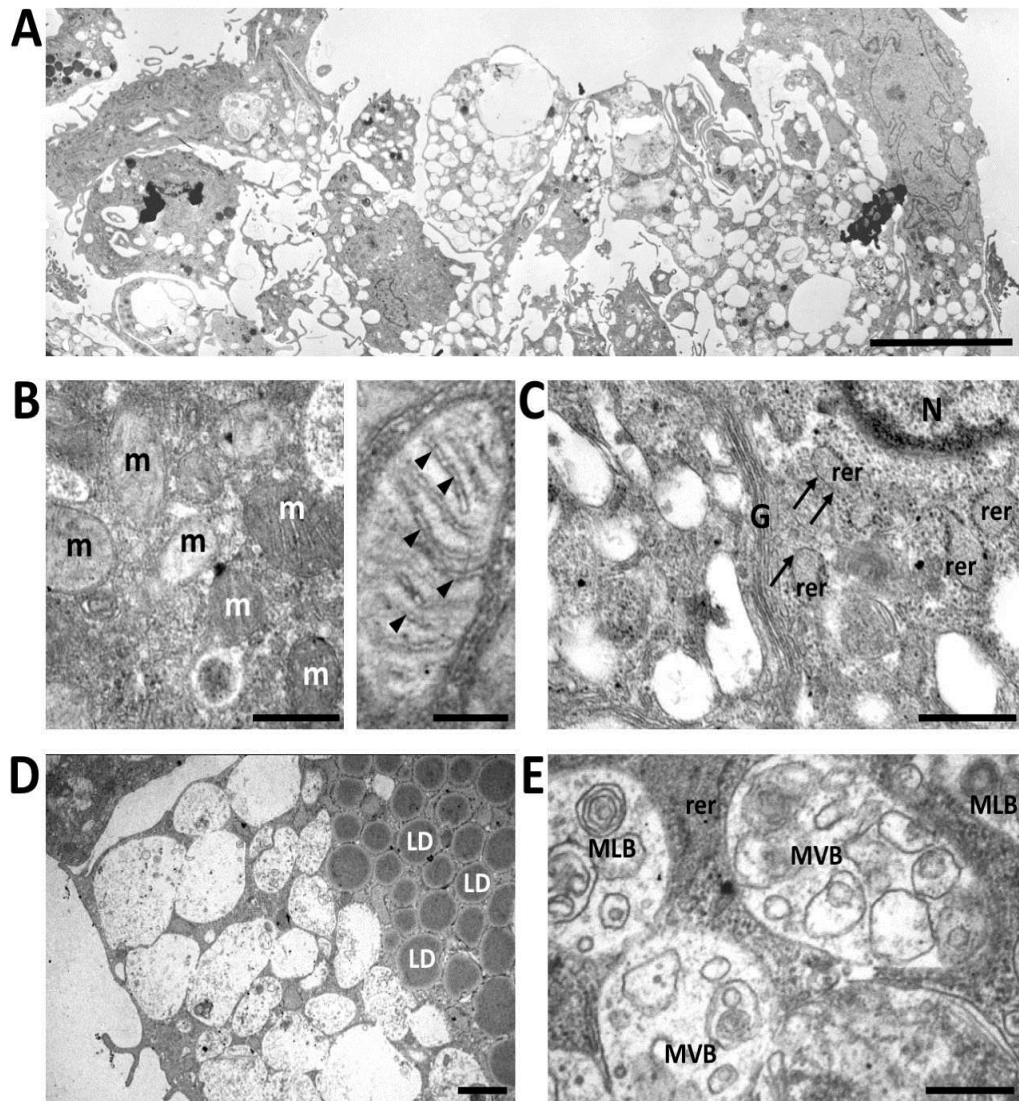


Рисунок 3.50 – Мікрофото ультраструктури сфероїдів із ММСК жирової тканини старих мишей контрольної групи (опис в тексті). Електронна мікроскопія, масштабні шкали: А – 15 мкм, В: ліворуч – 0,5 мкм, праворуч – 0,2 мкм, С, D – 1 мкм, Е – 0,5 мкм.

Примітки: m – мітохондрії, N – ядра, rer – шорсткий ендоплазматичний ретикулум, G – апарат Гольджі, LD – ліпідні краплі, MVB – мультивезикулярні тільця, MLB – багатошарові тільця; трикутники – кристи, стрілки – ділянки шорсткої ендоплазматичної сітки, які не містять рибосом.

Електронно-мікроскопічний аналіз показав, що оваріоектомія призвела до змін ультраструктури ММСК у сфероїдах. У цитоплазмі клітин від молодих оваріоектомованих мишей була значно більша кількість ліпідних крапель і ендосомальних елементів, порівнюючи з клітинами, отриманими від молодих

контрольних тварин (рис. 3.51 А). Цікаво, що суттєвою ультраструктурною особливістю ММСК від старих оваріоектомованих мишей були гігантські ліпідні краплі (3-4,5 мкм в діаметрі), які, ймовірно, утворилися шляхом злиття або коалесценції менших суміжних ліпідних крапель (рис. 3.51 Б). Для цитоплазми також характерні численні вакуолярні елементи [193].

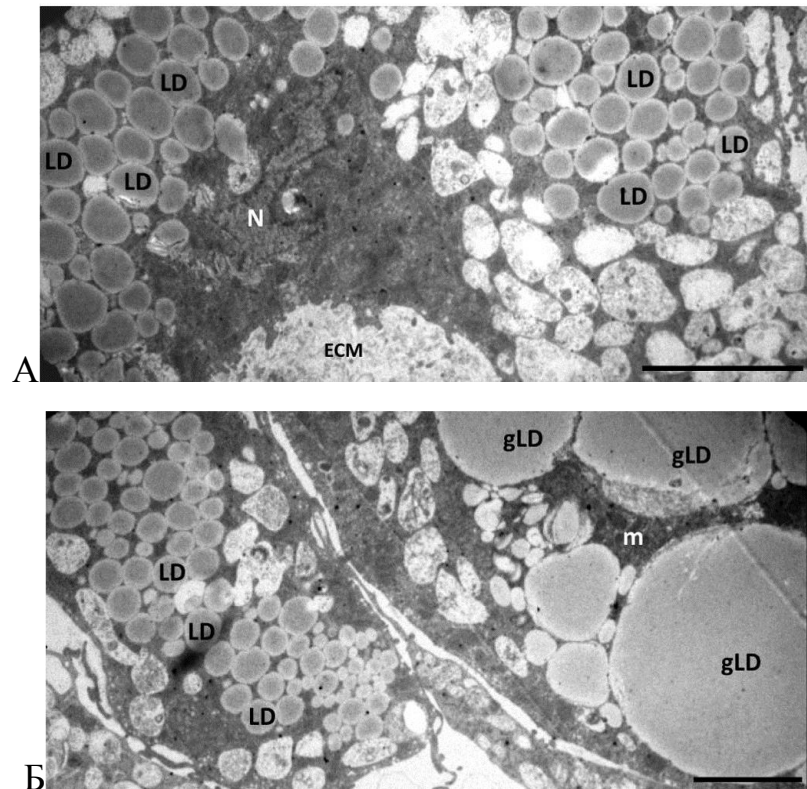


Рисунок 3.51 – Мікрофото ультраструктури сфероїдів із ММСК жирової тканини молодих (А) і старих (Б) мишей після оваріоектомії (опис в тексті). Електронна мікроскопія, масштабні шкали – 2 мкм. Примітки: LD – ліпідні краплі, gLD – гігантські ліпідні краплі, ECM – позаклітинний матрикс, m – мітохондрії, N – ядра.

В підсумку, дані електронної мікроскопії вказують на негативний вплив старіння та дисфункції ніші на ультраструктурні характеристики тривимірних сфероїдів, утворених ММСК жирової тканини, що корелює з результатами дослідження двовимірних культур від тварин різного віку. Встановлені факти є особливо актуальними в контексті з'ясування патогенетичних механізмів реалізації регенеративного потенціалу стовбурових клітин від донорів похилого віку та для обґрунтування доцільності використання алогенних клітинних препаратів належної якості від молодих донорів.

Отже, на початковому етапі за морфологічними характеристиками, експресією поверхневих маркерів та потенціалом до спрямованого диференціювання було підтверджено відповідність отриманих культур адгезивних стромальних клітин з підшкірної жирової тканини мінімальним критеріям ММСК Міжнародного товариства з клітинної терапії, що дозволило використовувати їх в подальших дослідженнях. Окрім того, було продемонстровано якісно нові морфофункціональні особливості клітин в умовах об'ємного тривимірного культивування, яке дозволяє відтворити умови ніші для належної міжклітинної взаємодії. Моделювання ж дисфункції ніші дало змогу виявити певні вікові аспекти функціонування стовбурових клітин, які необхідно враховувати при розробці новітніх методів клітинної терапії. Встановлені при цьому *in vitro* цитологічні, імунофенотипічні, функціональні критерії якості та відповідності мультипотентних стовбурових клітин жирової тканини визначають основні шляхи залучення їх у патогенетичні механізми ефективною реалізації регенеративного потенціалу при трансплантації *in vivo*, що було продемонстровано на моделях пошкодження кісткової тканини та критичної ішемії кінцівок.

Розроблені під час дослідження протоколи виділення ММСК кісткового мозку і жирової тканини та запропоновані підходи до контролю якості клітинних трансплантатів також лягли в основу оцінки їх доклінічної ефективності на моделях пошкодження нервової тканини. Зокрема, у наших спільних дослідженнях з Tsuykov O. та ін. на моделі комбінованого ішемічного пошкодження головного мозку та нейрозапалення в новонароджених мишей (модель перинатальної патології центральної нервової системи) для сингенної трансплантації були використані GFP-позитивні ММСК з жирової тканини мишей 2-3 пасажів. При фенотипуванні методом проточної цитометрії виявлено високий рівень експресії маркерів CD44, CD73 і CD90, а відносний вміст клітин з експресією гемопоетичних маркерів CD45 та CD117 становив при цьому менше 2 %. Експресія маркера гемопоезу та ангіогенезу CD34 на ранніх пасажах коливалась в межах 8-12 %. Після стереотаксичної трансплантації таких клітин встановлено відновлення поведінкових реакцій у тварин та покращення цитоархітектоніки у вогнищі пошкодження головного мозку.

Виявлено відновлення кортикоспинальної функції і кількості успішних спроб у тесті діставання їжі, а також гальмування розвитку мікро- та астрогліозу в мозолистому тілі та гіпокампі [352, 389].

Співставні позитивні результати отримано і на моделі перивентрикулярної лейкомаляції в культурі зрізів головного мозку *in vitro*. Безконтактне їх співкультивування з GFP-позитивними ММСК з жирової тканини із життєздатністю 93,6 % зменшувало вміст у кондиційному середовищі цитозольної лактатдегідрогенази, який до цього зростав в умовах індукції гіпоксії та нейрозапалення. Більш того, частина ММСК, які за морфологічними характеристиками, імунофенотипом та потенціалом до спрямованого диференціювання відповідали належним критеріям, для реалізації регенеративного потенціалу за умов перивентрикулярної лейкомаляції *in vitro* здатна диференціюватися в клітини нервової тканини [353, 389].

У наших спільних дослідженнях з Rubtsov V., Govbakh I. та ін. було оцінено вплив кріоконсервованих ММСК з жирової тканини на моторну активність та функціональний стан сідничного нерва трансгенних мишей з моделлю демієлінізуючої моторно-сенсорної периферичної нейропатії (хвороба Шарко-Марі-Тута типу 1А). ММСК характеризувались високою експресією мезенхімальних маркерів CD44, CD73, CD90, CD105, при одночасно низькому рівні гемопоетичних CD34 і CD45. Мультипотентні властивості досліджуваних клітин підтверджені на 2-му пасажі за наявності в цитоплазмі при спрямованому адипогенному диференціюванні ліпідних гранул, забарвлених Oil Red O, а також виявленням депозитів солей кальцію в екстрацелюлярному матриксі, забарвлених Alizarin Red S, та лужної фосфатази за BCIP/NBT. Вже починаючи з 2-го тижня після трансплантації, в порівнянні з мишами без введення клітин, тварини здійснили на 20 % менше зісковзувань та витратили на 11 % менше часу при проходженні тесту "балансування на перекладині". Ознакою високого регенеративного потенціалу ММСК є зростання індексу функціональності сідничного нерва, який на 10-й тиждень корелював зі зменшенням кількості зісковзувань та часу на проходження тесту балансування [294].

За допомогою електрофізіологічного дослідження виявлено, що сила скорочення трицепса гомілки після введення GFP-позитивних ММСК із життєздатністю 97,2 % була вдвічі більшою, ніж у нелікованих мишей, хоча і не відновлювалась до рівня нормальних тварин [125]. Отже, трансплантація ММСК з жирової тканини, які відповідають належним критеріям якості та відповідності, у тварин з периферичною нейропатією сприяє покращенню функціональних та морфологічних показників нервів, сили м'язів та дрібної моторики, гальмує процеси демієлінізації аксонів, що є вагомим доклінічним доказом перспектив клітинної терапії патології не лише центральної, а й периферичної нервової системи.

Також у наших спільних дослідженнях з Golovynska Iu. та ін. було оцінено морфологічні та функціональні характеристики культури ММСК кісткового мозку щурів під впливом на рецептори, які залучені в механізми мезенхімально-епітеліального переходу *in vitro*. Належні характеристики ММСК були підтверджені шляхом імунофенотипування методом проточної цитометрії (CD90 експресували 69 % клітин, з яких 65 % – на високому рівні) та спрямованого диференціювання в остеогенному та адипогенному напрямках (специфічне забарвлення на солі кальцію та ліпіди, відповідно). Встановлено, що активація рецептора EGF індукує появу морфологічних ознак, притаманних епітеліальному фенотипу, хоча низка властивостей, характерних для ММСК, все ще зберігається. EGF і тейхоєва кислота викликають посилення синтезу α -Мус і глікозаміногліканів у цитоплазмі клітин, демонструючи непрямі метаболічні ознаки підвищення їхнього регенеративного потенціалу [122]. Результати свідчать про можливість цілеспрямованої модуляції функцій стовбурових клітин під впливом певних агентів для посилення їхніх регенеративних ефектів або запобігання злоякісній трансформації ще на етапі культури *in vitro*. Оцінка впливу таргетних лікувальних засобів, які можуть змінювати специфічні властивості стовбурових клітин, також може бути введена в комплексні протоколи стандартизації клітинних продуктів.

Основні положення розділу висвітлені в публікаціях здобувача із зазначенням особистого внеску та відповідних посилань на список цитованих джерел [2, 6, 8, 9, 11, 12, 13, 14, 16, 122, 160, 182, 183, 184, 190, 191, 192, 193, 352, 353, 354, 357, 358, 389].

РОЗДІЛ 4 ХАРАКТЕРИСТИКА ТА РЕГЕНЕРАТИВНИЙ ПОТЕНЦІАЛ ЕНДОТЕЛІАЛЬНИХ ПРОГЕНІТОРІВ

4.1 Характеристика культур ендотеліальних прогеніторів *in vitro*

На першому етапі дослідження нами були розроблені протоколи отримання культур клітин-попередників з аорти мишей методом експлантів повношарових фрагментів. Додатково було розроблено алгоритм детальної характеристики первинних культур ендотеліальних клітин-попередників.

На першому пасажі культура клітин з повношарових експлантів аорти була гетерогенною за морфологічними характеристиками: окремі клітини мали витягнуту веретеноподібну форму, в той час як інші були переважно округлі (рис. 4.1).

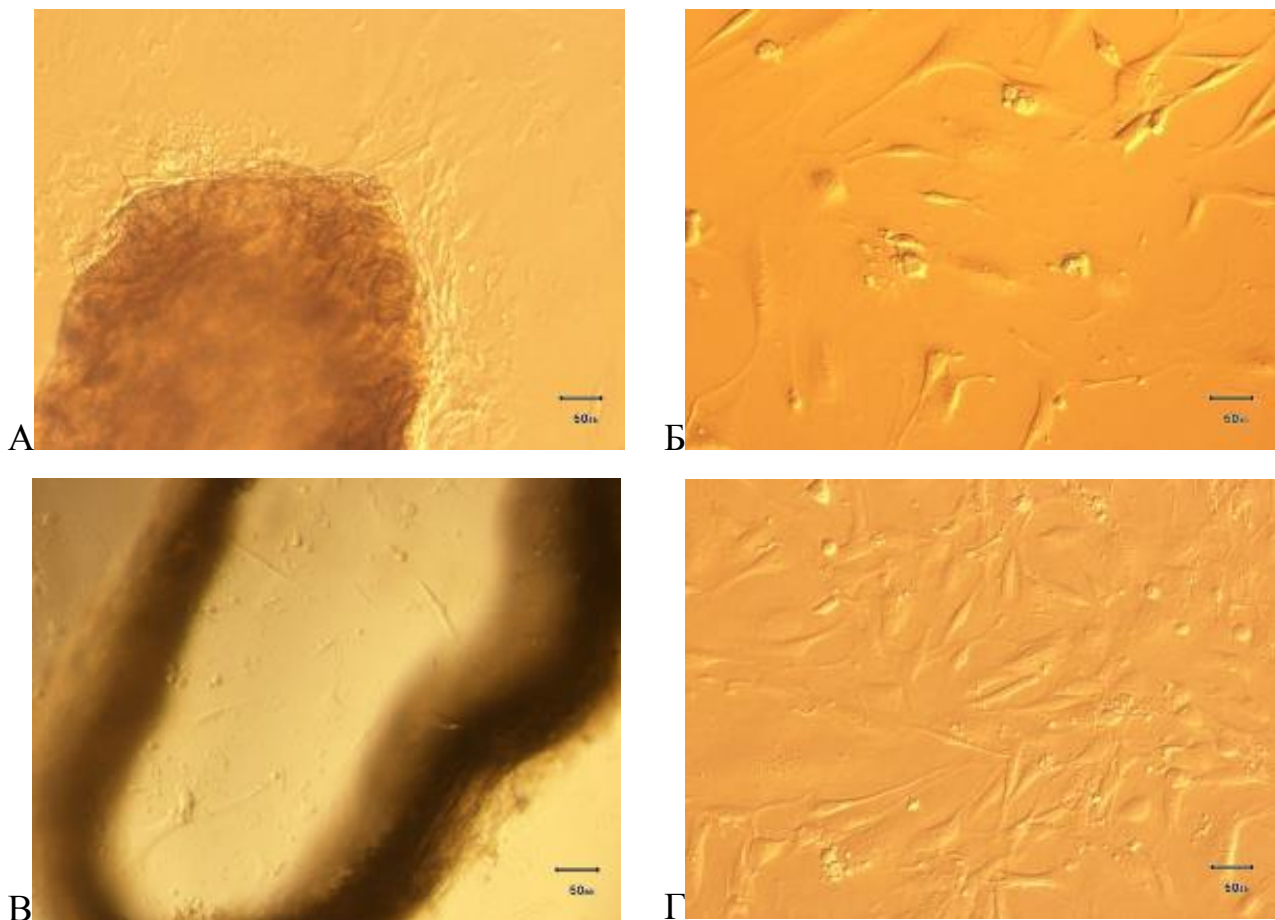


Рисунок 4.1 – Мікрофото первинної культури клітин-попередників з аорти миші: А – міграція клітин з експланту, 10-та доба культивування;

Б – 1-й пасаж культури з експлантів, 4-та доба культивування; В – міграція клітин з кілець аорти, 3-тя доба культивування; Г – 1-й пасаж культури кілець аорти, 10-та доба культивування. Світлова мікроскопія, фазовий контраст, шкала – 50 мкм.

На 2-3-му пасажах, з досягненням конфлюентності моношару 70 % і більше, культивовані клітини характеризувались однорідною фібробластоподібною морфологією, набували однакової витягнутої форми, округлі клітини елімінувались із культури (рис. 4.2).

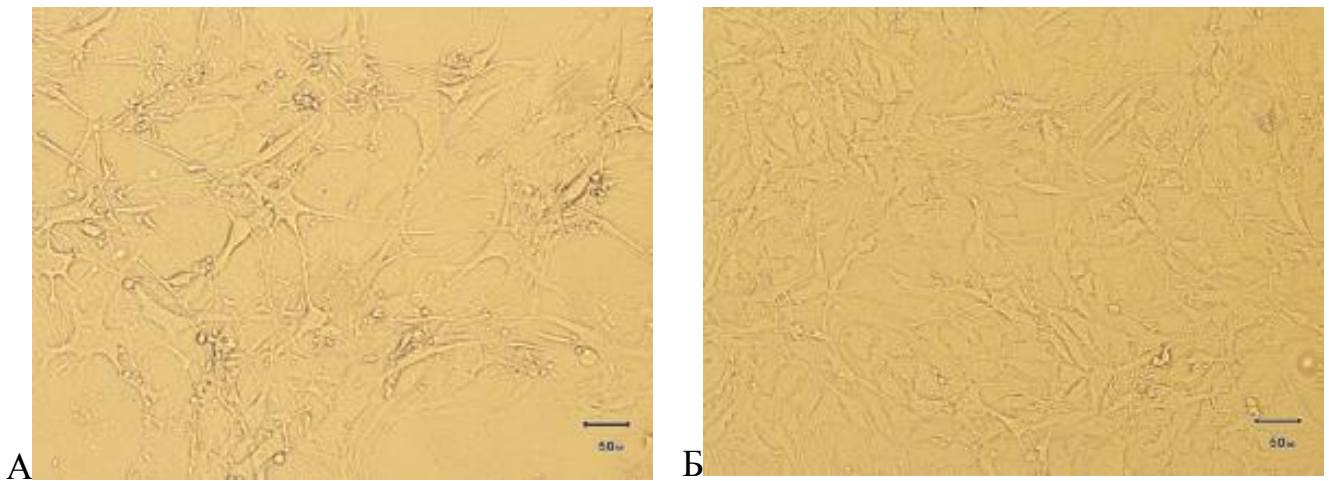


Рисунок 4.2 – Мікрофото культури клітин-попередників з аорти миші, пасаж 2 (А) та 3 (Б), конфлюентність моношару 90 %. Світлова мікроскопія, фазовий контраст, шкала – 50 мкм.

За даними мультипараметричного імунофенотипування методом проточної цитометрії культур клітин-попередників з повношарових експлантів аорти мишей було продемонстровано, що популяція перших мігруючих з експлантів клітин на низькому рівні (менше 20 %) експресує мезенхімальний маркер міжклітинних контактів CD44, рівень якого поступово наростає до другого пасажу (понад 60 %). При цьому 98 % клітин експресують CD90, зберігаючи такий же високий рівень експресії цього маркера в динаміці (рис. 4.3).

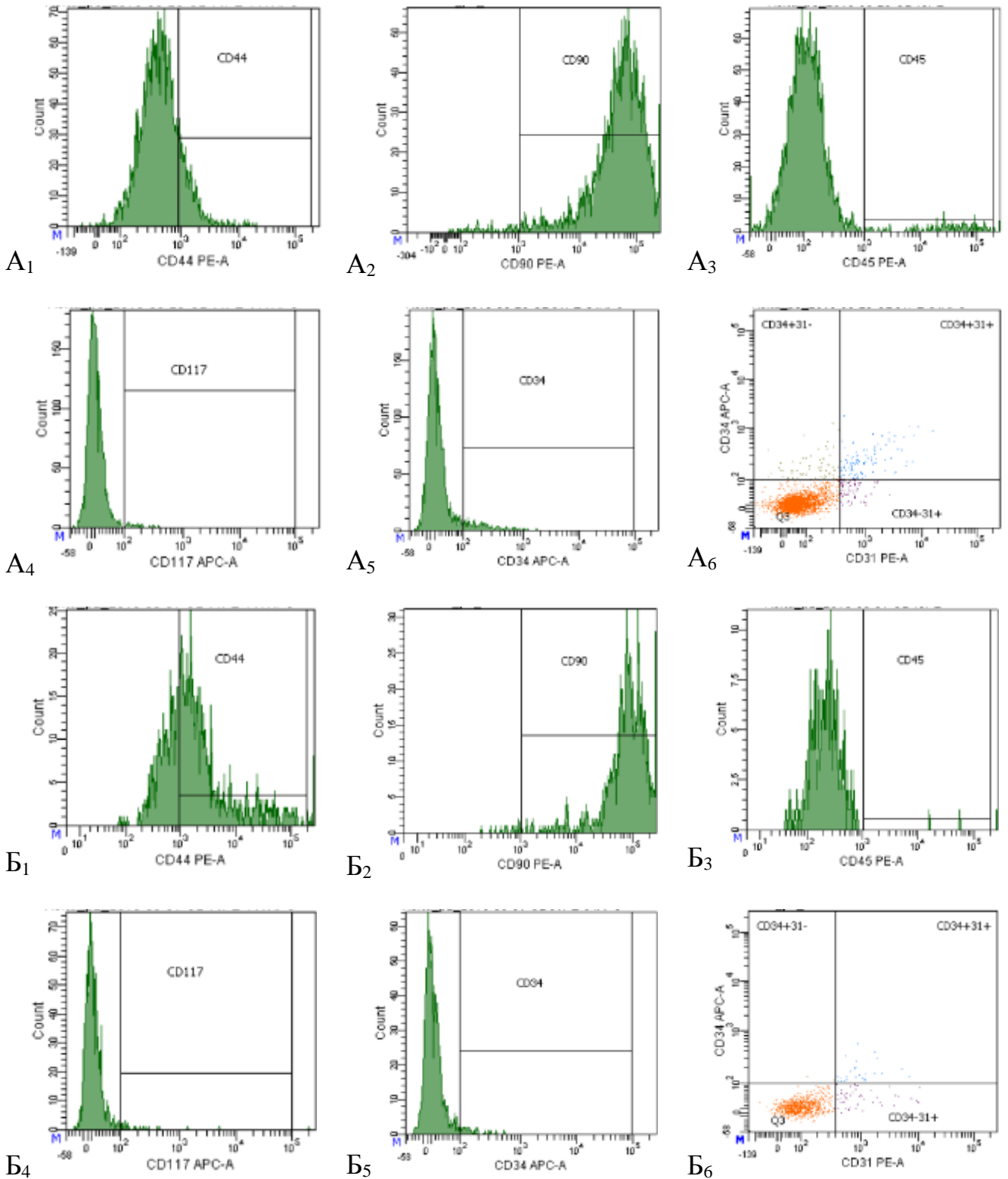


Рисунок 4.3 – Гістограми експресії маркерів CD44 (A₁, B₁), CD90 (A₂, B₂), CD45 (A₃, B₃), CD117 (A₄, B₄), CD34 (A₅, B₅) і субпопуляцій за комбінацією маркерів CD34/CD31 (A₆, B₆) у культурі клітин з повношарових експлантів аорти мишей за даними проточної цитометрії, пасаж 0 (A) та 2 (B).

Було продемонстровано присутність в отриманих культурах популяції з фенотипом ендотеліальних клітин-попередників CD34⁺CD31⁺, але їх вміст як в перші дні культивування, так і на подальших пасажах залишався досить низьким (менше 5 %).

Враховуючи результати імунофенотипування культур клітин, вочевидь, підтримання проліферації ендотеліальних клітин потребує додаткових ростових факторів, зокрема VEGF та компонентів міжклітинного матриксу. Крім того, на ангіогенний потенціал клітин у культурі можуть впливати такі фактори, як лінія мишей, вік та стать тварин.

Враховуючи значну експресію мезенхімальних стромальних маркерів у культурі з повношарових експлантів аорти мишей, було запропоновано дослідити культури клітин, отримані окремо з адвентиції та з внутрішніх шарів аорти. Прикріплені експланти адвентиції зберігали адгезію до пластику протягом усього часу культивування до першого пасажу. Частина фрагментів адвентиції не прикріпились до культуральної поверхні та вільно плавали в поживному середовищі.

Міграція клітин з експлантів адвентиції аорти мишей розпочиналась з 7-10 доби культивування. На ранніх пасажах культура була гетерогенною за морфологічними характеристиками: клітини мали переважно видовжену веретеноподібну форму з чіткою візуалізацією округлого або овального ядра та ядерець (рис. 4.4 А, Б).

Деякі з клітин набували полігональної форми та утворювали довгі відростки, які контактували з сусідніми клітинами, утворюючи кластери конфлюентного моношару. У частини клітин було виявлено вакуолізацію цитоплазми, за короткий час вони набували округлої форми та відкріплювались від поверхні культурального посуду, що свідчить про їх апоптоз.

Культура клітин з внутрішньої оболонки аорти мишей за морфологічними характеристиками складалась із однорідної популяції полігональних клітин, які щільно контактували між собою та утворювали характерні острівці моношару по типу "бруківки" (рис. 4.4 В, Г).

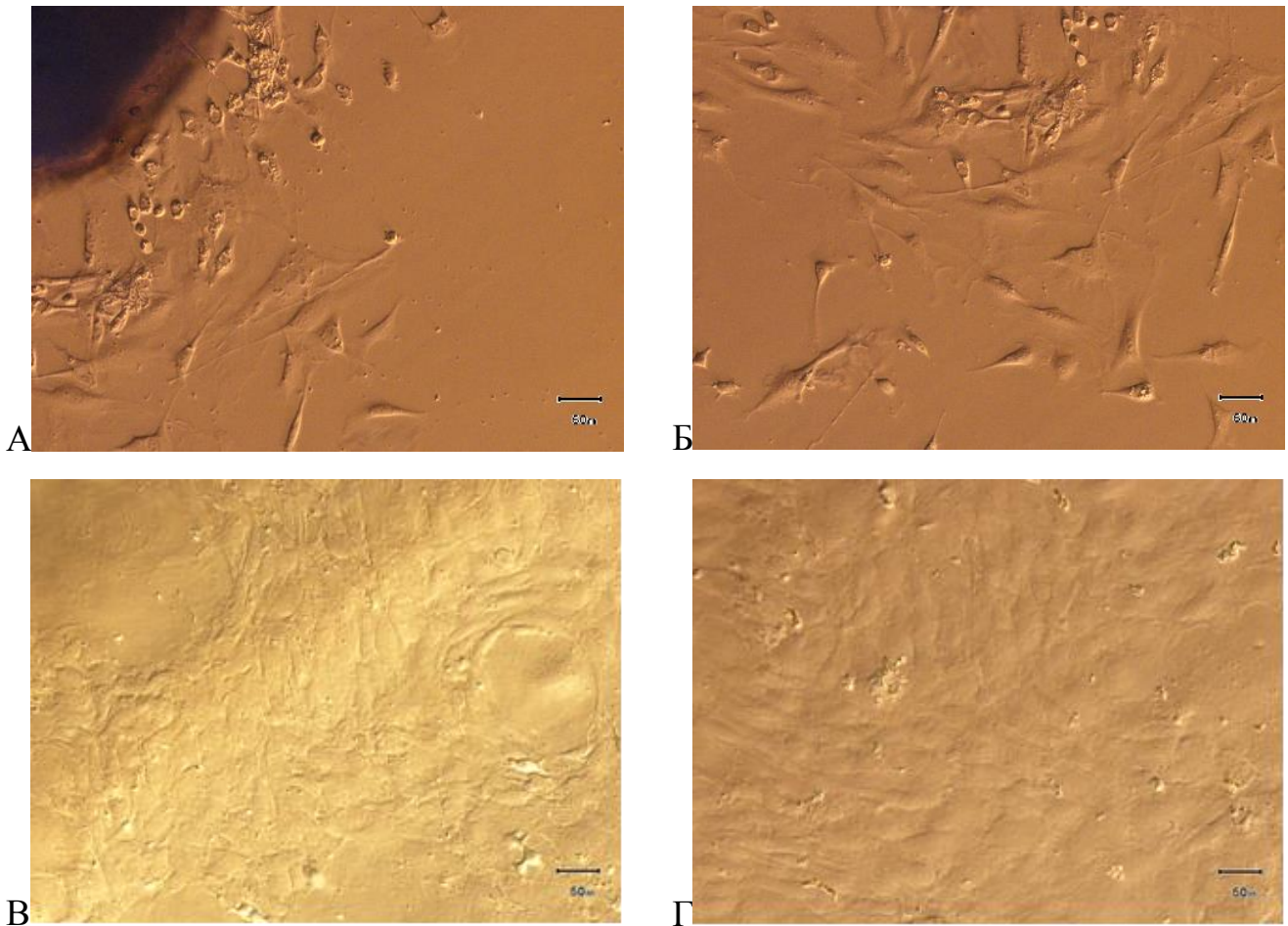


Рисунок 4.4 – Мікрофото первинної культури клітин-попередників з аорти миші. А – міграція клітин з експланту адвентиції, 10-та доба культивування; Б – 1-й пасаж культури з експлантів адвентиції, 7-ма доба культивування; В – первинна культур з внутрішньої оболонки аорти, 10-та доба культивування; Г – 1-й пасаж культури клітин з внутрішньої оболонки аорти, 7-ма доба культивування. Світлова мікроскопія, фазовий контраст.

У динаміці культивування острівці зливались між собою, утворюючи конфлюентний моношар. Цитоплазма клітин при цьому була світлою, гомогенною, без ознак вакуолізації.

Ядра та ядерця зберігали правильну округлу форму та розміщувались по центру клітин. На ранніх етапах культивування були присутні поодинокі гігантські розпластані клітини, навколо яких концентрично розміщувались клітини веретеноподібної форми.

При імунофенотипуванні первинних культур клітин з адвентиції та внутрішньої оболонки аорти було відмічено низьку експресію маркера міжклітинної адгезії CD44 та гемопоетичних маркерів CD45, CD34 і CD117 (табл. 4.1). Високий рівень експресії серед досліджуваних маркерів встановлено лише для CD90. Проте, вже після першого пасажу для культури клітин з внутрішньої оболонки аорти виявлено зростання експресії CD44 (понад 40 %) та CD90 (98 %).

Таблиця 4.1 – Рівні експресії поверхневих маркерів у первинній культурі клітин з аорти миші, пасаж 0, % (Mean \pm SEM, n = 3).

Маркер	Культура клітин з адвентиції аорти	Культура клітин з внутрішньої оболонки аорти
CD31	1,8 \pm 0,11	1,4 \pm 0,08
CD38	0 \pm 0,01	0,6 \pm 0,04*
CD44	2,4 \pm 0,14	6,2 \pm 0,4*
CD117	0,1 \pm 0,01	1,3 \pm 0,07
CD45	2,9 \pm 0,17	0,9 \pm 0,05*
CD34	1,0 \pm 0,01	3,8 \pm 0,2*
CD90	85,5 \pm 5,3	81,7 \pm 4,9

Отже, дані морфологічного аналізу вказують на те, що первинній культурі клітин з адвентиції аорти мишей на ранніх строках *in vitro* притаманний фібробластоподібний фенотип, який характерний для клітин стромального походження. При цьому культура клітин з внутрішньої оболонки має морфологічні ознаки ендотеліальних клітин. Проте, для такої культури на досліджуваних строках не виявлено експресії ендотеліальних маркерів CD31 та CD38. Це може бути пов'язано з необхідністю використання специфічних ростових факторів та субстратів для прикріплення клітин, які сприяють проліферації та дозріванню ендотеліальних прогеніторів та експресії ними відповідних маркерів.

На наступному етапі було порівняно морфологічні характеристики отриманих ендотеліальних прогеніторів з аорти миші при їх культивуванні в поживному середовищі з додаванням основного фактора росту фібробластів (bFGF) та епідермального фактора росту (EGF) на культуральній поверхні з різним субстратом: культуральний пластик підвищеної адгезії Cell+; пластик, покритий матриксом Matrigel; пластик, покритий фібронектином (рис. 4.5).

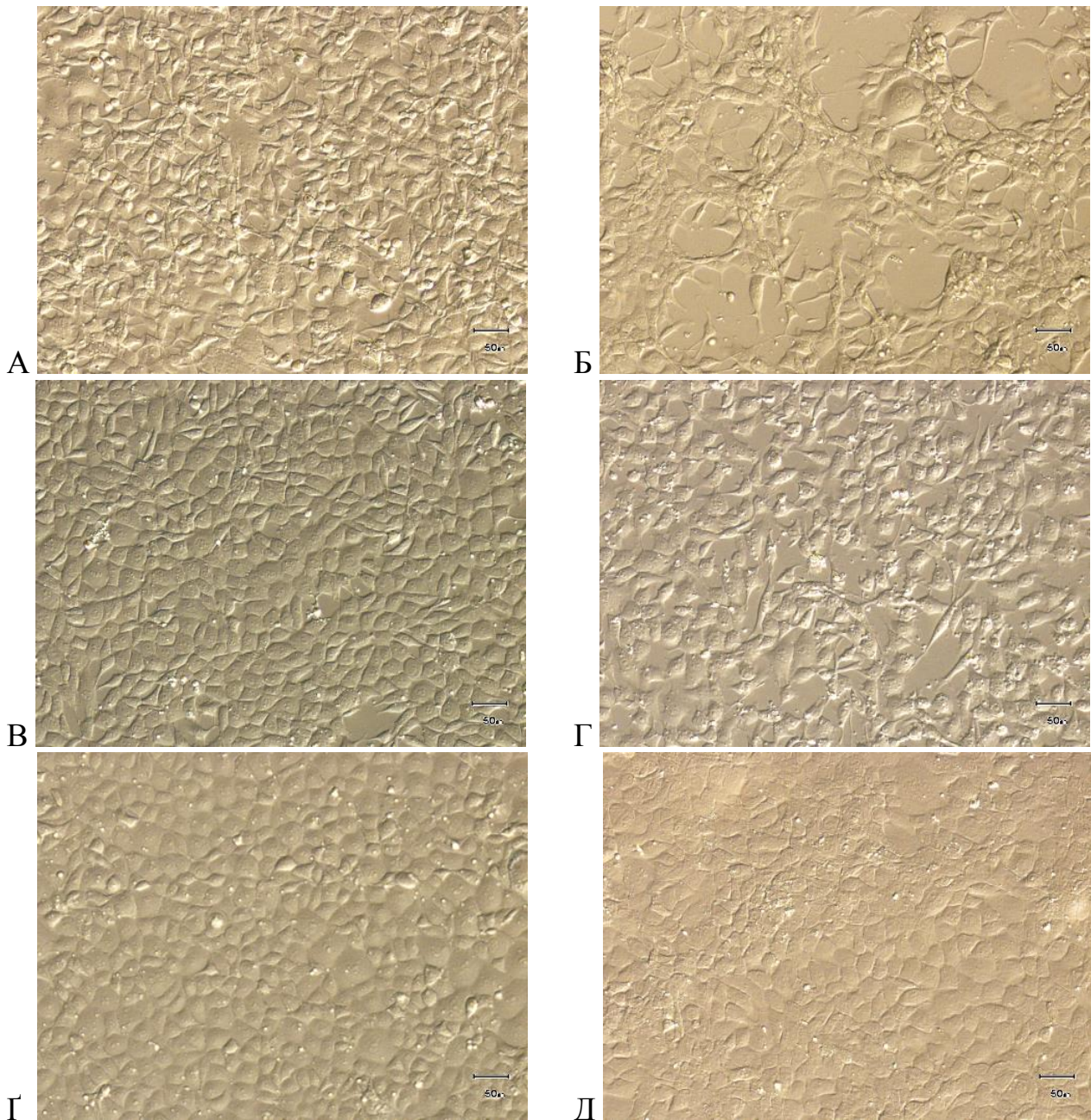


Рисунок 4.5 – Мікрофото культур кріоконсервованих ендотеліальних прогеніторних клітин з аорти миші на пасажі 0 (А, В, Г) та 1 (Б, Г, Д): А, Б – культивування у флаконах з підвищеною адгезією Cell+; В, Г – культивування на матриксі Matrigel; Г, Д – культивування на фібронектині. Світлова мікроскопія, фазовий контраст, шкала – 50 мкм.

Клітини на ранніх строках культивування після розморожування характеризувались морфологічними ознаками ендотеліальних клітин на усіх досліджуваних варіантах субстрату. Культури на матриксі Matrigel та фібронектині були більш однорідними та утворювали класичний моношар полігональних клітин, які щільно контактують між собою у вигляді "бруківки". При цьому в культурі на пластику без покриття були присутні клітини з видовженими відростками та зернистою цитоплазмою, а також великі розпластані клітини. Деякі з них набували округлої форми та відкріплялись від поверхні, що може вказувати на їх загибель.

Після першого пасажу кількість клітин з епітеліальною морфологією суттєво зменшувалась і культура становила собою стратифікований моношар з переважанням клітин неправильної форми з видовженими відростками та великих розпластаних клітин з кількома ядрами. Водночас, культури клітин на Matrigel та фібронектині зберігали типову морфологію після першого пасажу та утворювали конфлюентний моношар протягом 3-4 діб, хоча в культурі на Matrigel були присутні поодинокі веретеноподібні клітини.

При імунофенотипуванні досліджуваних культур клітин було виявлено деякі відмінності в експресії низки поверхневих маркерів. Культура клітин на фібронектині на ранніх етапах характеризувалась високим рівнем експресії маркера міжклітинних контактів CD44, що відповідає морфологічній характеристиці конфлюентного моношару.

Проте, не було виявлено експресії ендотеліальних маркерів CD31 та CD38, що поєднувалось з відсутністю і гемопоетичних маркерів CD45, CD34 та CD117. При цьому практично усі клітини експресували CD90, що також не є типовим для ендотеліальних прогеніторів. Невелику популяцію клітин (менше 10 %), що експресували маркери CD31 та CD38, виявлено лише після першого пасажу. При цьому в культурі також відзначали суттєве зниження експресії CD90 до 40 % (табл. 4.2).

Таблиця 4.2 – Рівні експресії поверхневих маркерів у культурі ендотеліальних клітин-попередників з аорти миші з різним субстратом культуральної поверхні, % (Mean \pm SD, n = 3).

Маркер	Fibronectin		Matrigel	
	P0	P1	P0	P1
CD31	0,7 \pm 0,04	5,4 \pm 0,3*	58,3 \pm 3,5	2,3 \pm 0,1*
CD 38	0 \pm 0,01	9,4 \pm 0,6*	11,9 \pm 0,7	1,6 \pm 0,1*
CD44	98,9 \pm 5,9	83,3 \pm 5,0*	98,8 \pm 5,9	93,3 \pm 5,6
CD117	0 \pm 0,01	16,9 \pm 0,01*	0,4 \pm 0,01	19,5 \pm 1,2*
CD45	0,1 \pm 0,01	5,8 \pm 0,01*	28,5 \pm 1,7	3,2 \pm 0,2*
CD 34	0,8 \pm 0,1	0,6 \pm 0,03	0,4 \pm 0,01	0,4 \pm 0,01
CD90	100 \pm 6,0	40,0 \pm 0,2*	0 \pm 0,01	40,2 \pm 2,4*

Примітка: * – $p \leq 0,05$ у порівнянні з P0.

На відміну від клітин, які вирощували на фібронектині, більше половини клітин у ранній культурі на Matrigel експресували CD31. Низький рівень середньої інтенсивності флуоресцентного сигналу може вказувати на незначну щільність цього рецептора на мембрані (рис. 4.6).

Частина з цих клітин експресували маркер активованих ендотеліоцитів CD38. Також відмічено високий рівень експресії маркера міжклітинної адгезії CD44 (більше 95 %) при відсутності CD90, що характерно для ендотеліальних прогеніторів. Для підтримання експресії CD31 при подальшому культивуванні необхідно використовувати додаткові ростові фактори, які відповідають за проліферацію та диференціювання ендотеліальних клітин, зокрема основний фактор росту фібробластів bFGF, епідермальний фактор росту EGF, а також фактор росту ендотелію судин VEGF.

При імунофенотипуванні культур МАЕС на 3-му пасажі з додаванням до поживного середовища bFGF та EGF виявлено виражену експресію молекул адгезії ендотеліоцитів PECAM-1/CD31 (82,5 \pm 3,1 %), маркера активованих ендотеліоцитів CD38 (76,8 \pm 5,6 %) а також рецептора до вазоендотеліального фактора росту CD309 (84,8 \pm 4,2 %), що є типовим для ендотеліоцитів (рис. 4.7).

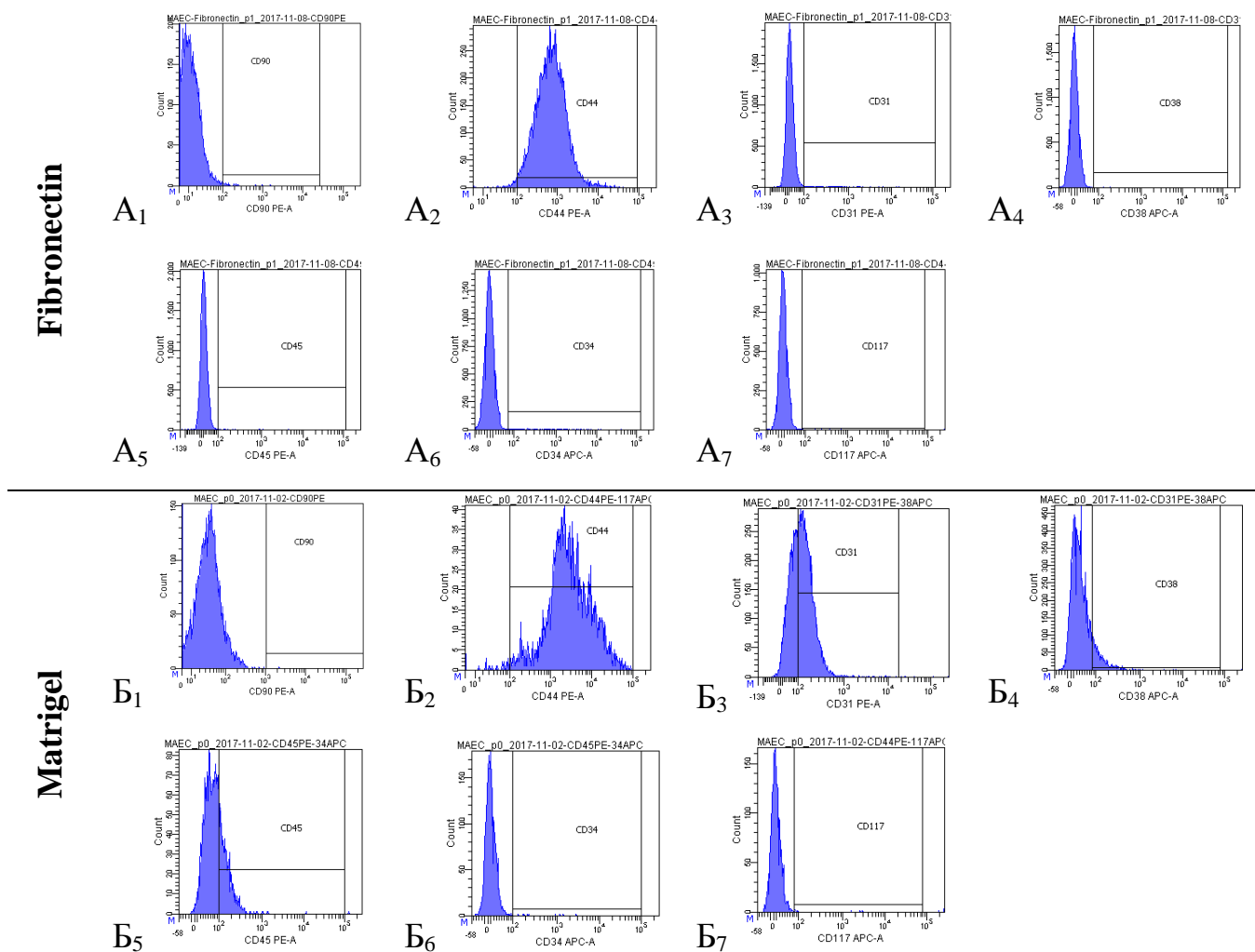


Рисунок 4.6 – Гістограми експресії маркерів CD90 (A₁, B₁), CD44 (A₂, B₂), CD31 (A₃, B₃), CD38 (A₄, B₄), CD45 (A₅, B₅), CD34 (A₆, B₆) та CD117 (A₇, B₇) у культурі ендотеліальних клітин-попередників з аорти миші за даними проточної цитометрії, пасаж 0, культивування на поверхні фібронектину (А) та Matrigel (Б).

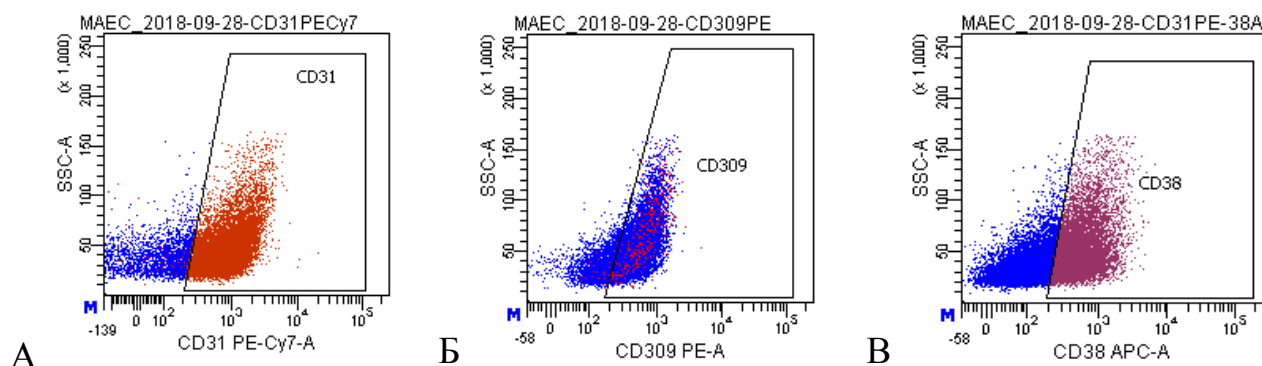


Рисунок 4.7 – Гістограми експресії маркерів CD31 (А), CD309 (Б), CD38 (В) у культурі ендотеліальних клітин-попередників з аорти миші за даними проточної цитометрії, пасаж 3. Програмне забезпечення BD FACSDiva 6.1.2.

Під час розробки протоколів мультипараметричного імунофенотипування ендотеліальних прогеніторів для визначення коректних параметрів дискримінації і гейтування цільових субпопуляцій як порівняльний контроль використовували розроблений протокол імунофенотипування і сортування гемопоетичних прогеніторів.

Зокрема, встановлено, що домінуюча популяція серед $\text{Lin}^- \text{Sca-1}^+ \text{c-kit}^+$ (LSK) клітин мала фенотип $\text{Lin}^- \text{Sca-1}^+ \text{c-kit}^+ \text{flt3}^- \text{CD150}^-$ ($57,2 \pm 6,8$ %), що характеризує короткоживучі гемопоетичні стовбурові клітини, відповідальні за мієлопоез. Популяція $\text{Lin}^- \text{Sca-1}^+ \text{c-kit}^+ \text{flt3}^+ \text{CD150}^-$ складала $27,1 \pm 3,3$ %, а довгоживучих прогеніторів $\text{Lin}^- \text{Sca-1}^+ \text{c-kit}^+ \text{flt3}^- \text{CD150}^+$ – $15,7 \pm 4,7$ %. При цьому виключення з аналізу клітин з високою інтенсивністю прямого та бічного світлорозсіювання за шириною інтенсивності сигналу дозволяє зменшити хибнопозитивні результати вимірювань [197].

Також при проведенні імунофенотипування методом проточної цитометрії з метою уникнення хибнопозитивних або хибнонегативних результатів важливо дотримуватись належних умов зберігання і доставки матеріалу для аналізу, стандартів пробопідготовки та гейтування популяцій, що буде більш детально висвітлено нижче.

Отже, було розроблено методики отримання первинної культури ендотеліальних прогеніторних клітин з внутрішньої оболонки аорти мишей та валідовано протоколи мультипараметричного імунофенотипування клітин з ендотеліальним фенотипом методом проточної цитометрії.

Додатково визначено оптимальні комбінації компонентів повного поживного середовища, ростових факторів, субстратів росту для отримання популяції клітин з належними морфологічними та імунофенотипічними характеристиками, підтвердженими за експресією специфічних поверхневих маркерів. Встановлено критерії відповідності отриманих культури клітин з аорти миші ендотеліальному фенотипу.

4.2 Регенеративний потенціал ендотеліальних прогеніторів при критичній ішемії кінцівок у мишей

На наступному етапі нами було досліджено регенеративний потенціал ендотеліальних клітин-попередників з аорти миші при ішемічному пошкодженні тканин. Для оцінки регенеративних ефектів було змодельовано ішемічне пошкодження м'язів кінцівок у мишей за допомогою перев'язки стегнової артерії.

Перед та через 2 і 4 тижні після трансплантації ендотеліальних клітин-попередників методом локальної внутрішньом'язової ін'єкції було проведено макроскопічне, гістологічне та інструментальне дослідження. При макроскопічному дослідженні у тварин контрольної групи із моделюванням критичної ішемії без трансплантації клітин виявлено виражену блідість ішемізованої кінцівки з ціанотичним відтінком у порівнянні з псевдооперованою, а також некротичні зміни нігтьових фаланг (рис. 4.8). При трансплантації МАЕС у тварин із змодельованою критичною ішемією шкіра стопи зберігала рожевий колір та відповідну температуру здорової кінцівки без ознак некрозу дистальних фаланг.

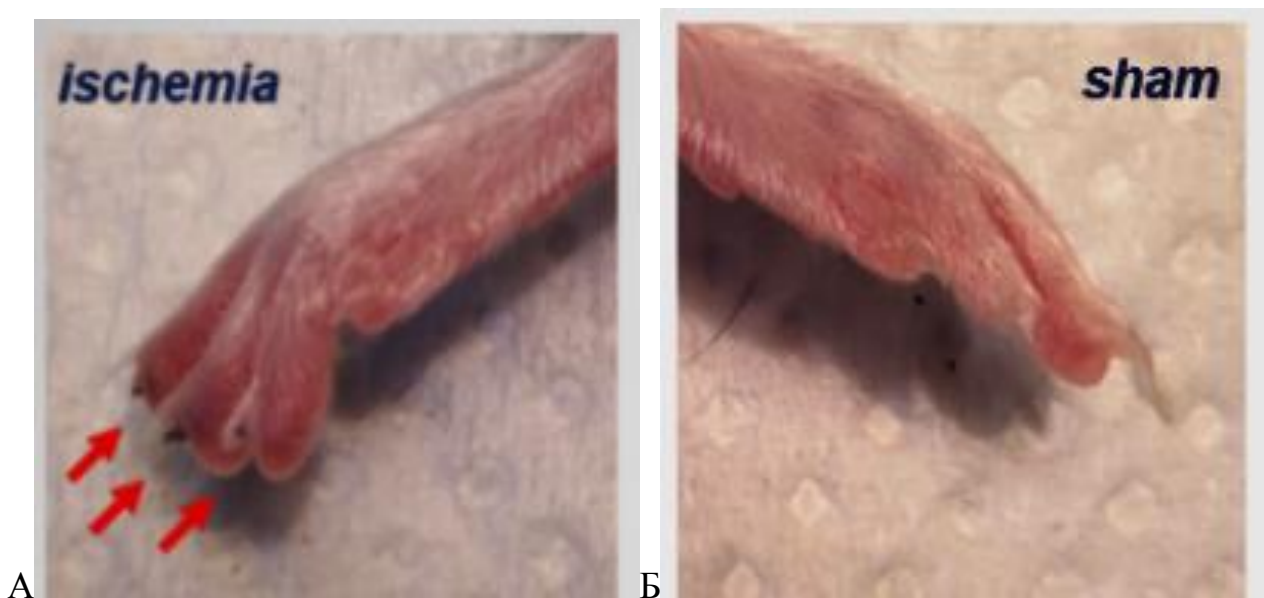


Рисунок 4.8 – Фото стоп мишей через 4 тиж. після моделювання критичної ішемії кінцівок: А – стрілками вказано некрози нігтьових фаланг пальців на кінцівці з перев'язкою стегнової артерії; Б – псевдооперована кінцівка без перев'язки стегнової артерії.

На секції у тварин в зоні трансплантації МАЕС було відмічене посилення судинного малюнка завдяки розростанню артеріол, які формували між собою анастомози (рис. 4.9).



Рисунок 4.9 – Фото ділянок стегнових артерій мишей з моделлю критичної ішемії кінцівки через 2 тиж. після трансплантації МАЕС (ліворуч) та псевдооперованої кінцівки (праворуч), стрілкою вказано зони формування мережі артеріальних анастомозів.

У тварин контрольної групи із змодельованою критичною ішемією за даними лазерної доплерівської флоуметрії на досліджуваних строках зберігалась достовірна різниця ($p \leq 0,05$) показників перфузії ішемізованої та псевдооперованої кінцівок на рівні $\Delta = 45,7 \pm 13,1$ % (рис. 4.10 А). Водночас, у тварин після трансплантації МАЕС різниця цих показників між кінцівками становила лише $\Delta = 14,0 \pm 8,2$ % і не була достовірною (рис. 4.10 Б).

При порівнянні відносних показників різниці перфузії між ішемізованими та псевдооперованими кінцівками встановлено достовірну різницю ($p < 0,01$) між контрольною групою та групою тварин з трансплантацією МАЕС (рис. 4.11).

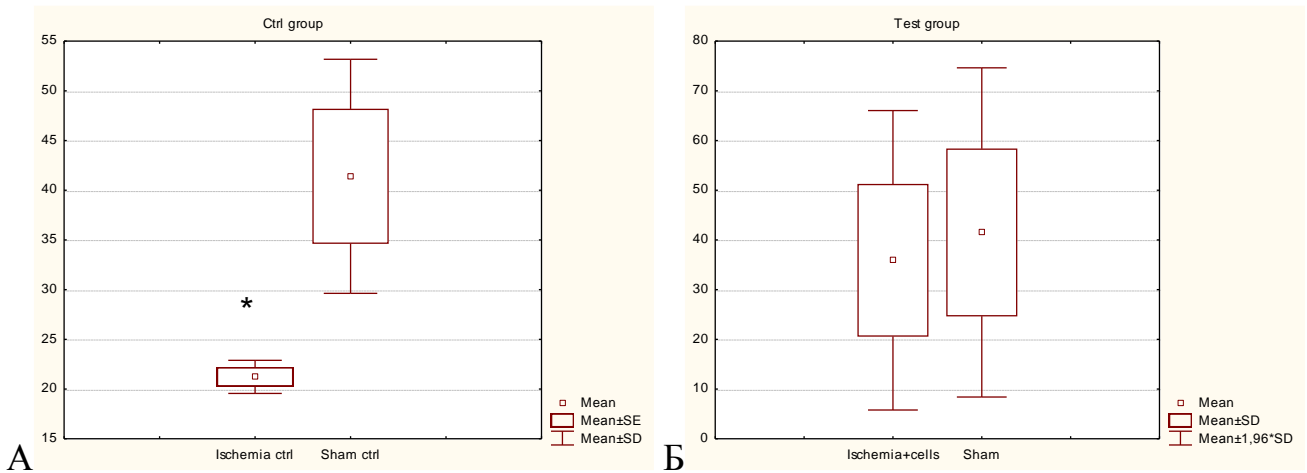


Рисунок 4.10 – Гістограми рівня перфузії м'язів гомілок за даними лазерної доплерівської флоуметрії ішемізованої (ліві блоки) та псевдооперованої (праві блоки) кінцівок: А – контрольна група без трансплантації клітин, Б – група тварин з трансплантацією МАЕС. Примітка: * – достовірні відмінності в порівнянні з псевдооперованою кінцівкою, $p < 0,05$.

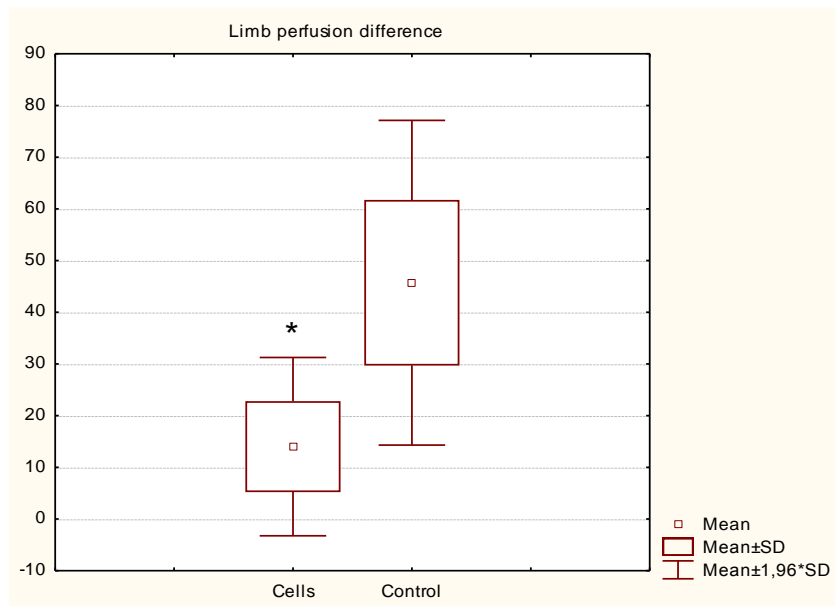


Рисунок 4.11 – Гістограми різниці перфузії м'язів гомілок за даними лазерної доплерівської флоуметрії між ішемізованою та псевдооперованою кінцівкою у тварин контрольної групи (правий блок) та групи тварин з трансплантацією МАЕС (лівий блок). Примітка: * – достовірні відмінності в порівнянні з контрольною групою, $p < 0,01$.

При гістологічному дослідженні у тварин після трансплантації МАЕС в деяких волокнах міофібрил спостерігали ознаки компенсаторних процесів, що характеризуються гіперплазією і гіпертрофією ядер міоцитів, та просвітлінням нуклеоплазми з добре вираженими ядерцями (рис. 4.12). В міофібрилах без ознак апоптозу виявлено гіперплазію і гіпертрофію ядер міоцитів, в яких добре розрізнялись ядерця. В цитоплазмі міоцитів чітко розрізнялись поперечні Z-диски, та збільшувалась кількість білка. Крім того, виявляли посилене кровонаповнення капілярів.

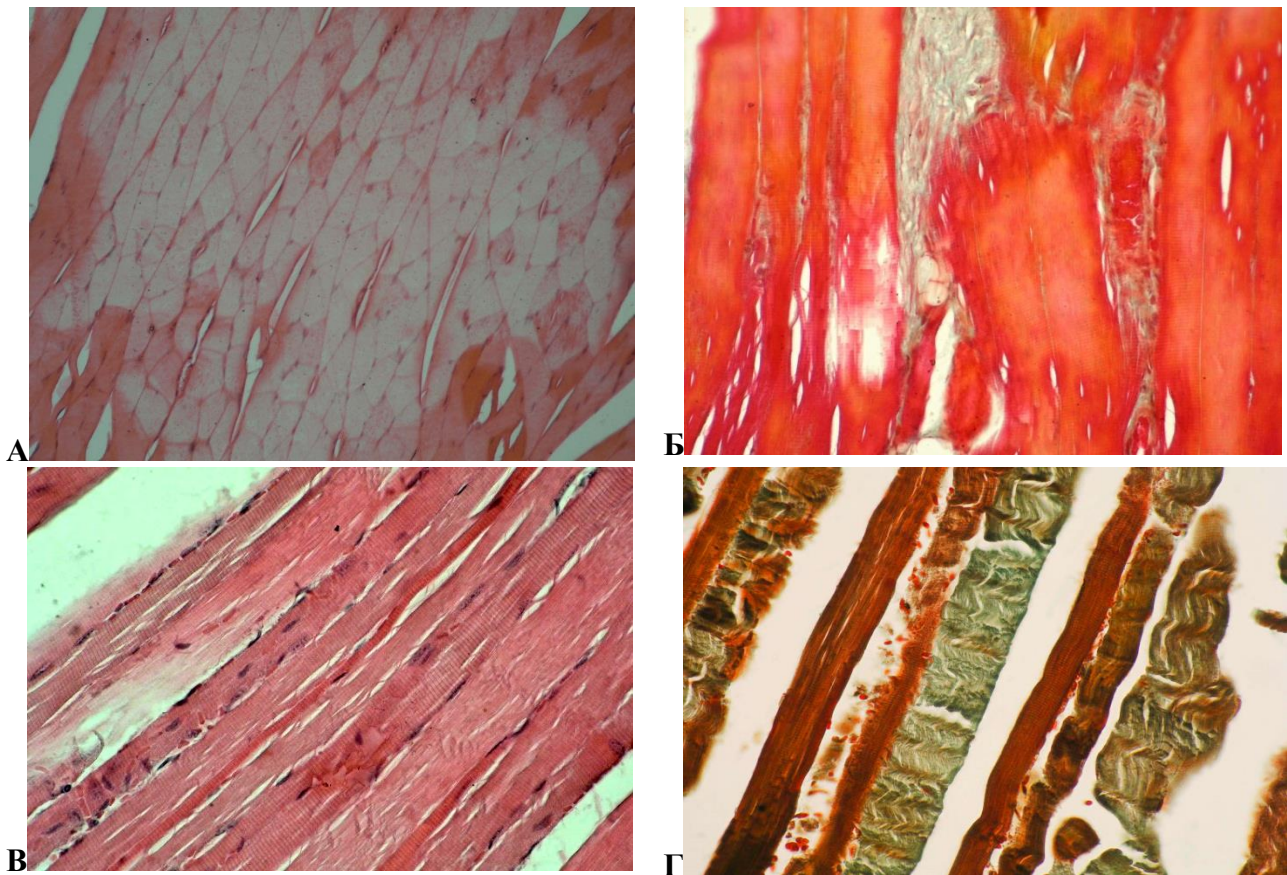


Рисунок 4.12 – Мікрофото гістологічних зрізів м'язів кінцівок миші через 4 тижні після моделювання критичної ішемії в контрольній групі (А, Б) та після трансплантації МАЕС (В, Г). Фарбування гематоксилін-еозином (А-В) і трихромом за Массоном (Г). Світлова мікроскопія, зб. $\times 400$.

У наступній серії експериментів проводили дослідження ефективності застосування гідрогелів на основі карбомеру 974Р, заселених МАЕС. У тварин через 4 тижні після трансплантації гідрогелів за допомогою лазерної

доплерівської флоуметрії продемонстровано відновлення перфузії ішемізованих кінцівок. Якщо в контрольній групі абсолютний рівень перфузії тканин кінцівки з моделюванням ішемії без трансплантації гідрогелів залишався достовірно нижчим від показників псевдооперованої кінцівки, то в групі з трансплантацією рівень перфузії ішемізованої кінцівки достовірно не відрізнявся від псевдооперованої (рис. 4.13 А, Б).

Проте, через 8 тижнів після трансплантації зазначена тенденція не зберігалась і перфузія ішемізованих кінцівок з трансплантацією гідрогелів була вже достовірно нижчою від псевдооперованих (рис. 4.13 В, Г).

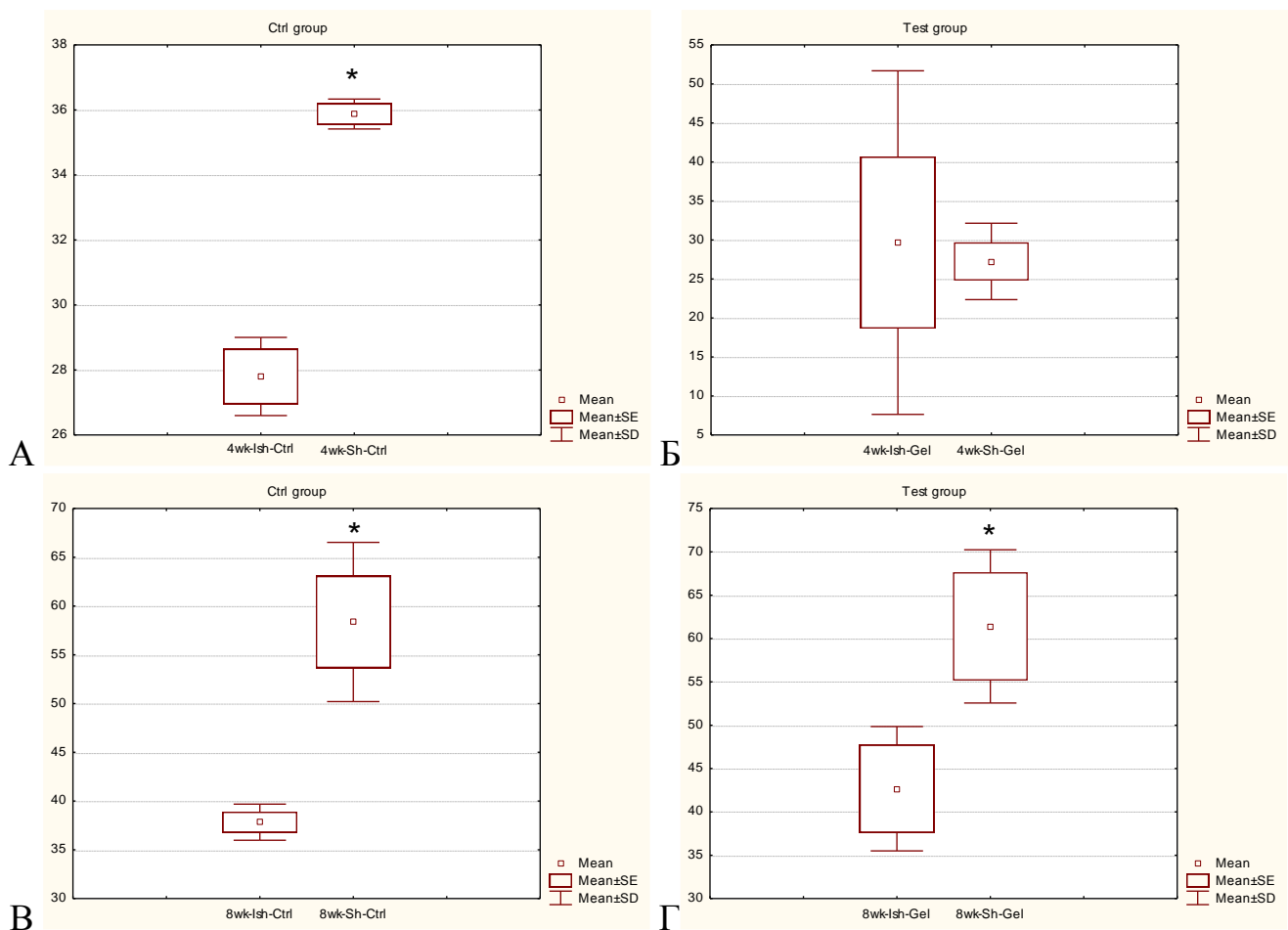


Рисунок 4.13 – Гістограми рівнів перфузії м'язів гомілок за даними лазерної доплерівської флоуметрії ішемізованої (ліві блоки) та псевдооперованої (праві блоки) кінцівок через 4 (А, Б) та 8 (В, Г) тижнів після трансплантації гідрогелів, заселених МАЕС: А, В – контрольна група без трансплантації гідрогелів з клітинами, Б, Г – група тварин з трансплантацією МАЕС в гідрогелі. Примітка: * – достовірні відмінності в порівнянні з псевдооперованою кінцівкою, $p < 0,05$.

У контрольній групі тварин з ішемічним пошкодженням тканин стегна без трансплантації гідрогелів через 4 тижні на гістологічних зрізах поперечна посмугованість м'язів була слабо виражена, в судинах відмічали стаз і саж еритроцитів (рис. 4.14 А). В окремих тяжках волокон м'язової тканини відмічено зникнення еозинofilії цитоплазми, її гомогенізацію та каріопікноз з втратою ядер, що свідчить про апоптоз (рис. 4.14 Б). Однак, були відмічені й ділянки, що містять одиничні міоцити, в ядрах яких розташовані добре візуалізовані ядерця.

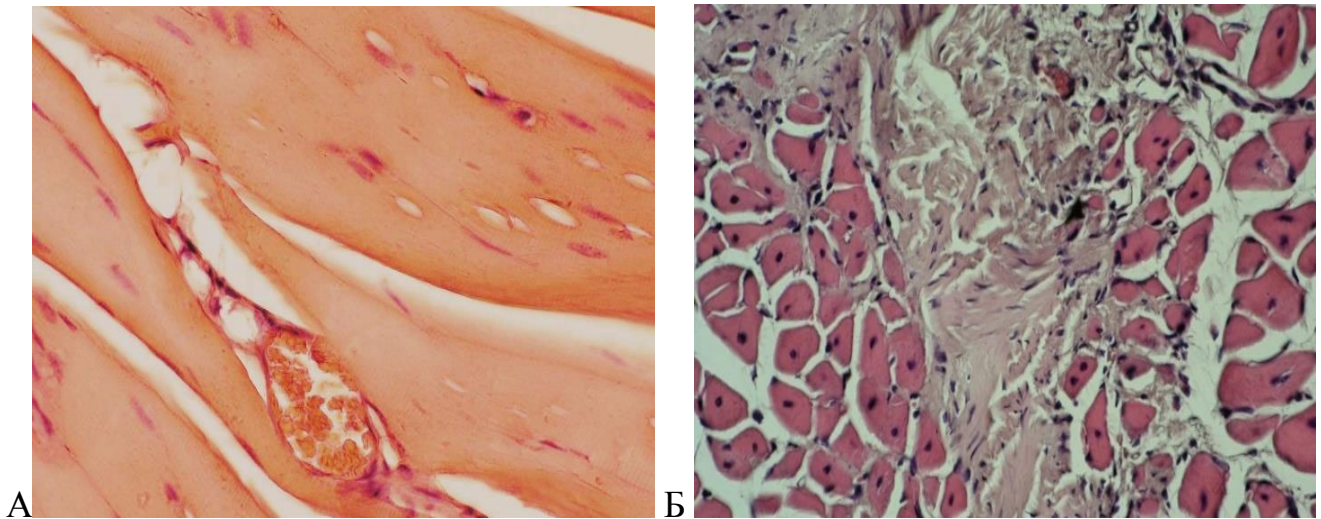


Рисунок 4.14 – Мікрофото гістологічних зрізів м'язів стегна миші через 4 тиж. після ішемічного пошкодження (опис в тексті). Забарвлення гематоксилін-еозином. Світлова мікроскопія, зб. $\times 400$ (А), $\times 200$ (Б).

Також виявлено гомогенізацію цитоплазми частини пучків м'язових волокон, набряк і порушення їхньої цілісності з гетерохроматизацією та втратою ядер. Загалом, зазначені зміни корелюють з негативною динамікою щодо зниження перфузії ішемізованої кінцівки в порівнянні з псевдооперованими тваринами в строк з 4-го до 8-го тижнів після трансплантації.

У пучках нервових волокон, що проходять через м'язову тканину, відмічені ділянки з підвищеною еозинofilією і щільністю цитоплазми та базофілією ядер клітин Шванна (рис. 4.15 А), а також з набряком епіневрію та кровонаповненням капілярів (рис. 4.15 Б).

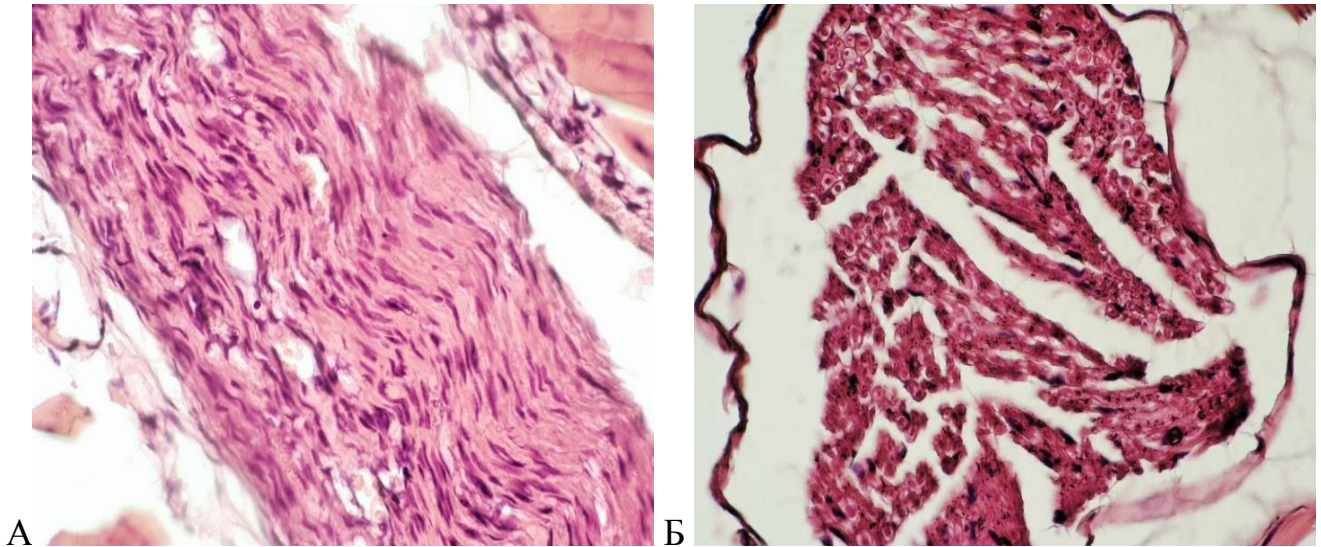


Рисунок 4.15 – Мікрофото гістологічних зрізів ділянки нервових волокон в м'язах стегна миші через 4 тиж. після ішемічного пошкодження (опис в тексті). Забарвлення гематоксилін-еозином. Світлова мікроскопія, зб. $\times 400$.

Через 8 тиж. після ішемічного пошкодження в окремих ділянках виявлено чітко виражену посмугованість м'язових волокон, ядра міоцитів з великою кількістю еухроматину, компенсаторне розростання колатералей артерій, зменшення набряку периневрію. Проте, загальна структура тканини залишалась з ознаками хронічного ішемічного пошкодження.

При гістологічному дослідженні гідрогелів, заселених МАЕС та трансплантованих тваринам з ішемічним пошкодженням кінцівки, через 4 тижні в товщі фрагментів трансплантатів виявлено значну кількість клітин з базофільними округлими ядрами, а також клітини без ознак апоптозу, в ядрах яких чітко візуалізується еухроматин і ядерця (рис. 4.16 А).

Також серед волокон трансплантованих гідрогелів виявлено проростання та формування нових кровоносних судин (рис. 4.16 Б) з добре вираженим шаром гладком'язових клітин у середній оболонці (рис. 4.16 В), у просвіті яких видно скупчення еритроцитів та відкладання білків плазми крові. В одиничних судинах відмічені некротичні зміни стінки, що характеризуються лізисом і гомогенізацією стінки судин, каріопікнозом і округлою формою ядер.

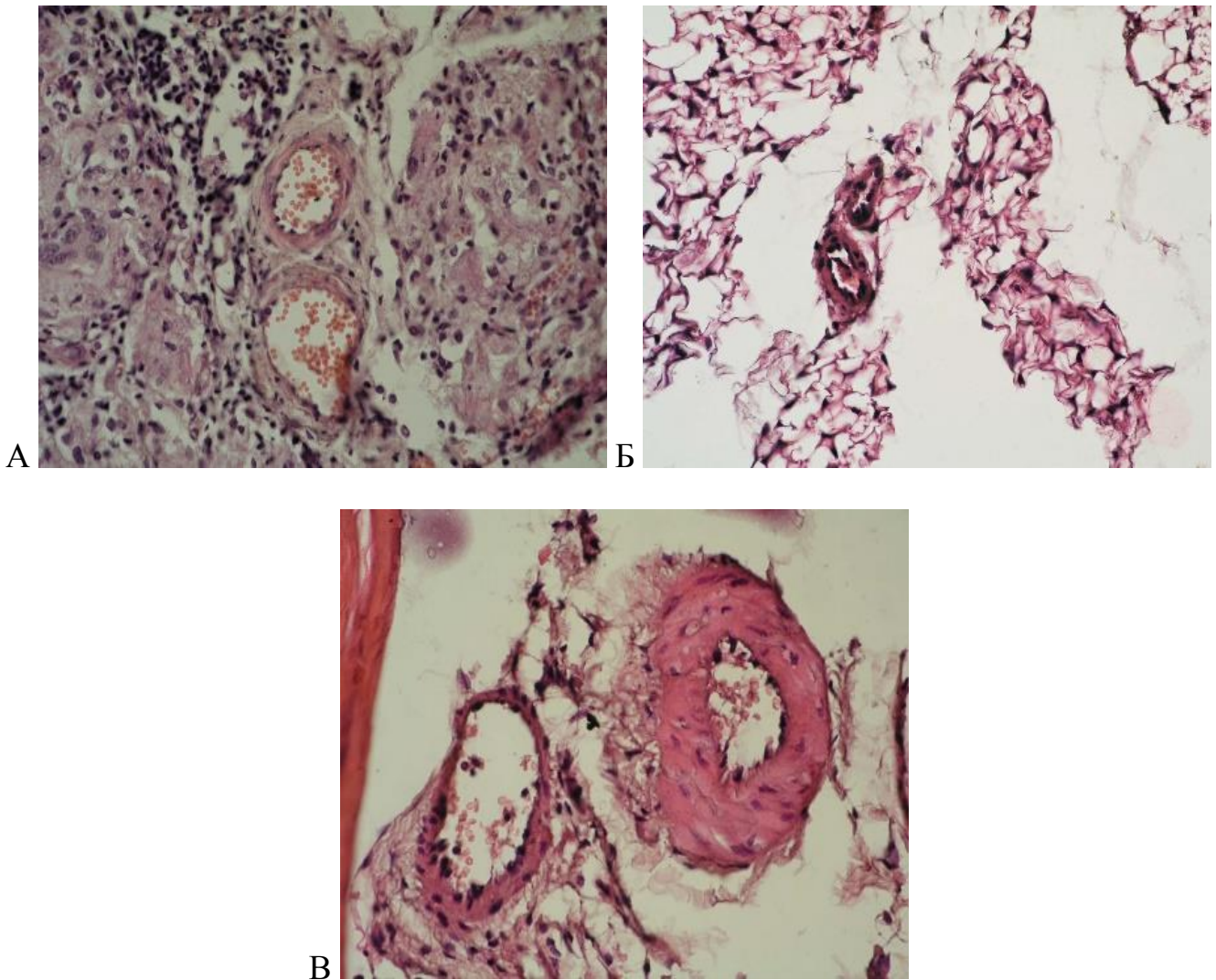


Рисунок 4.16 – Мікрофото гістологічних зрізів трансплантованих гідрогелів. Велика кількість клітин містить ядра з еухроматином і добре помітними ядерцями (А). Проростання та формування нових судин в товщі гідрогелю (Б). В стінці судин добре розвинений гладком'язовий шар (В). Забарвлення гематоксилін-еозином. Світлова мікроскопія, зб. $\times 100$ (А, Б), $\times 400$ (В).

У ділянках прилеглих нервових волокон було помітно просвітлення цитоплазми лемоцитів та еухроматизацію ядер клітин Шванна. Також добре помітні осьові циліндри (рис. 4.17 А). У більш віддалених ділянках нервові волокна містили клітини Шванна з щільною цитоплазмою і гіперхромними ядрами (рис. 4.17 Б).

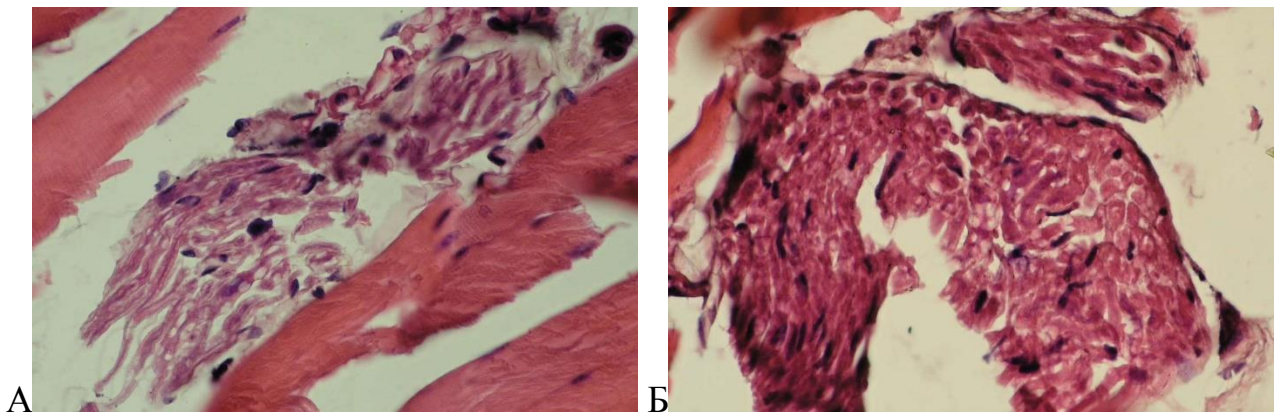


Рисунок 4.17 – Мікрофото гістологічних зрізів нервового волокна в ділянці трансплантованого гідрогелю. Просвітлення цитоплазми лемоцитів та еухроматизація ядер клітин Шванна, добре помітні осьові циліндри (А). Клітини Шванна з щільною цитоплазмою і гіперхромними ядрами (Б). Забарвлення гематоксилін-еозином. Світлова мікроскопія, зб. $\times 600$.

Отже, у біоптатах трансплантованих гідрогелів, заселених МАЕС, в ранні періоди після трансплантації (до 4 тиж.) процеси васкуляризації характеризуються активним утворенням судин, що по своїй будові нагадують артерії і вени. Також у цих препаратах присутні в гелі клітини мають ознаки високої функціональної активності, що характеризується еухроматинізацією і наявністю декількох ядерців у ядрі.

На гістологічних препаратах у тварин з моделлю ішемії кінцівки через 4 тиж. після трансплантації гідрогелів, заселених МАЕС, у більшості ядер міоцитів був добре виражений еухроматин, гетерохроматин та ядерця, проте ще спостерігався набряк між волокнами (рис. 4.18 А). В міоцитах з каріопікнозом ядер поперечна посмугованість не виражена, а навколо відмічено розростання сполучнотканинного матриксу (рис. 4.18 Б).

При порівняльному дослідженні в динаміці на препаратах через 8 тиж. в більшості ядер міоцитів наявні одне-два ядерця і відмічено збільшення кількості еухроматину з появою аномально гіпертрофованих ядер міоцитів. При цьому в ендомізії присутні поодинокі волокна сполучної тканини, що свідчить про стабілізацію фіброзу (рис. 4.18 В).

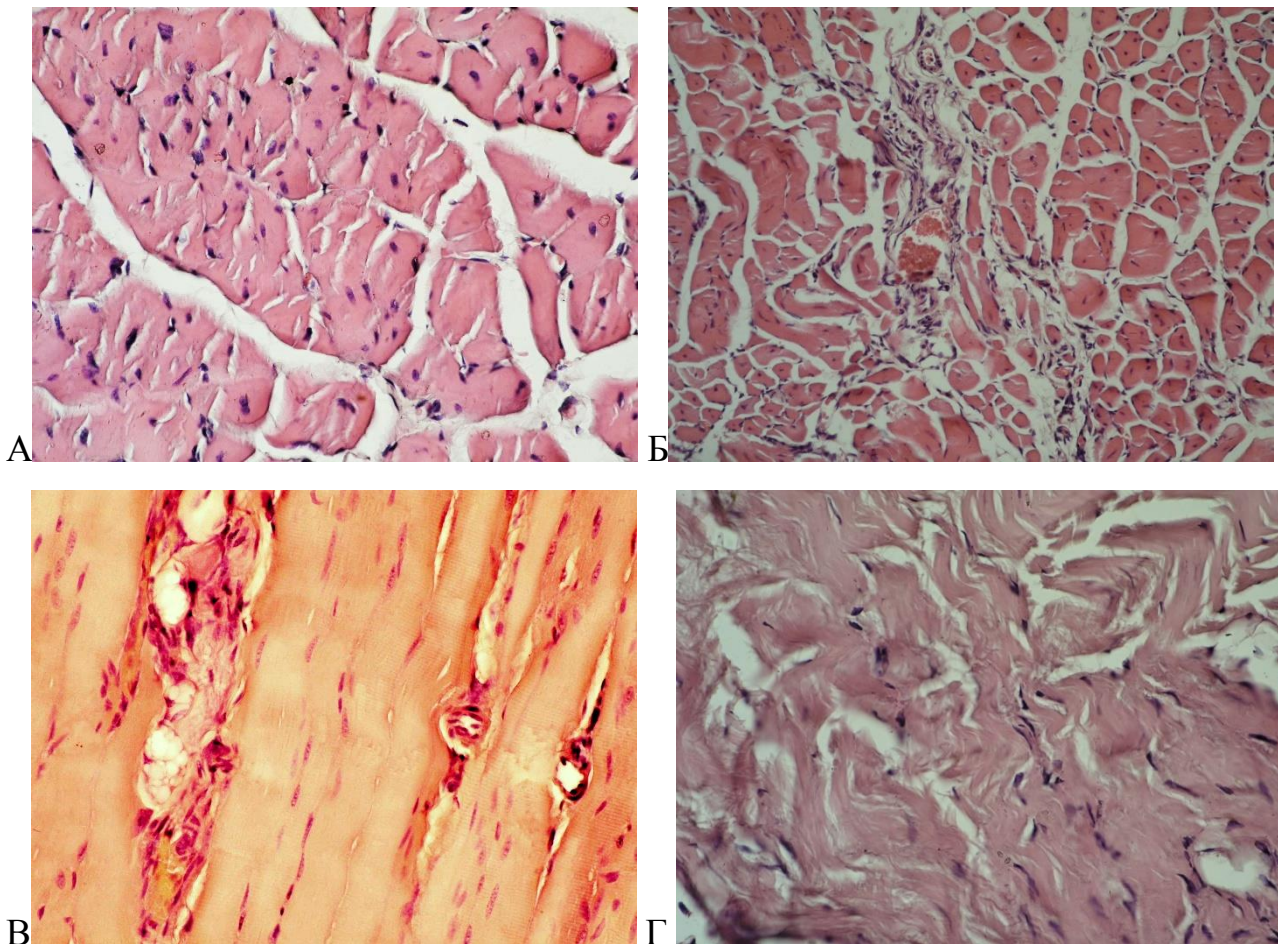


Рисунок 4.18 – Мікрофото гістологічних зрізів м'язової тканини в ділянці трансплантованого гідрогелю через 4 (А, Б) та 8 тиж. (В, Г) після трансплантації (опис в тексті). Забарвлення гематоксилін-еозином. Світлова мікроскопія, зб. $\times 400$ (А, В, Г), $\times 100$ (Б).

Отже, на моделі критичної ішемії кінцівок у мишей за морфологічними та функціональними показниками доклінічної ефективності було визначено ключові механізми реалізації регенеративного потенціалу ендотеліальних прогеніторних клітин, які відповідають належним морфологічним та імунофенотипічним критеріям якості та відповідності, а саме: пригнічення локального запалення; неоваскуляризація та відновлення перфузії в зоні ішемії; пригнічення апоптозу та фіброзоутворення.

Основні положення розділу висвітлені в публікаціях здобувача із зазначенням відповідних посилань на список цитованих джерел [2, 7, 8, 194, 197].

РОЗДІЛ 5 ХАРАКТЕРИСТИКА СТОВБУРОВИХ КЛІТИН З МІОКАРДА

5.1 Гістологічне дослідження міокарда миші та людини.

Для детальної морфологічної характеристики тканини міокарда, яку використовували для виділення прогеніторних клітин, було додатково проведено пошарове гістологічне дослідження біоптатів серця мишей у двох площинах. На гістологічних препаратах чітко візуалізуються тонкостінні вушка передсердь, які з внутрішнього боку мають складчасту будову, та шлуночки з товстими стінками (рис. 5.1 А-Б).

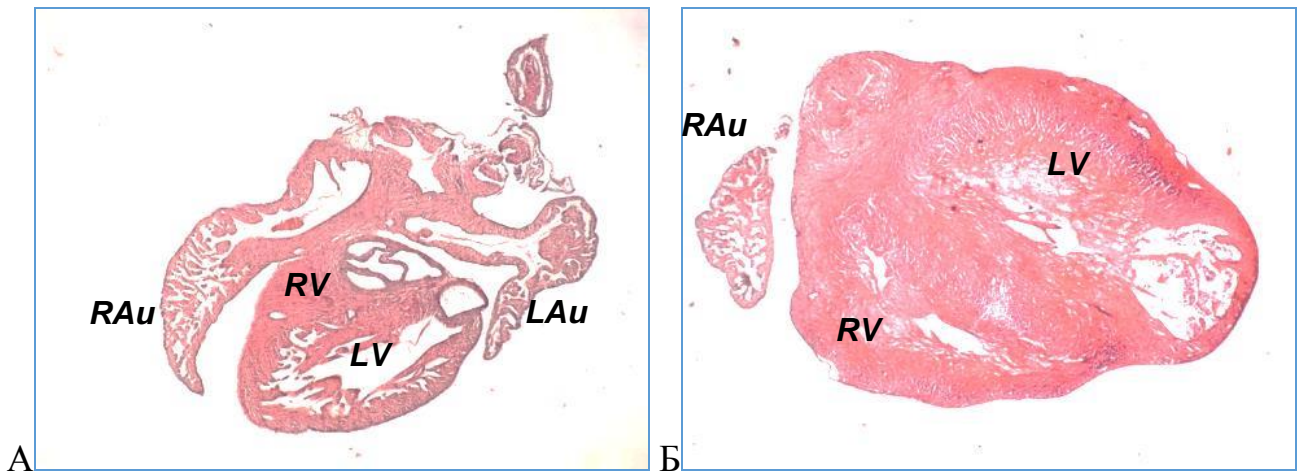


Рисунок 5.1 – Мікрофото гістологічних препаратів серця миші: А – поперечний зріз на межі між шлуночками та передсердями. Б – сагітальний зріз через лівий шлуночок. RA – вушко правого передсердя, LA – вушко лівого передсердя, RV – правий шлуночок, LV – лівий шлуночок. Забарвлення гематоксиліном, світлова мікроскопія, зб. $\times 200$.

Мускулатура передсердь переважно утворена поздовжніми волокнами, а поверхневий шар – кільцевими, які охоплюють обидва передсердя одночасно. У правому передсерді отвори обох порожнистих вен розділені невеликим потовщенням м'язових стінок. Лінія з'єднання між правим передсердям і вушком правого передсердя локалізується медіально у вигляді вертикального гребеня, відомого як *crista terminalis*. В ембріогенезі *crista terminalis* є місцем з'єднання між венозним синусом та серцем ембріона, що розвивається.

У процесі розвитку правий ріг та поперечна частина венозного синуса в кінцевому підсумку вбудовуються в праве передсердя плода та утворюють його частину, яка відома як *sinus venarum*. *Crista terminalis* забезпечує формування пектинатних м'язів. Синоатріальний вузол межує з вушком правого передсердя між місцем впадіння верхньої порожнистої вени та *crista terminalis*. На протилежній стінці правого передсердя розташована кінцева борозна (*sulcus terminalis*).

Поруч з отвором верхньої порожнистої вени в передсердя відкривається коронарний синус серця, що збирає кров з серцевих вен. На перегородці між передсердями помітно невелике овальне поглиблення – залишок отвору між передсердями в ембріогенезі. Спереду на внутрішній поверхні передсердя розвинені м'язові валики – гребінцеві м'язи. Передсердя відокремлені від шлуночків атріовентрикулярними фіброзними кільцями. Правий шлуночок у поперечному перерізі має форму півмісяця, оскільки міжшлуночковою перегородка вдається в його бік (рис. 5.1 Б). Між передсердям і шлуночком розташовується правий атріовентрикулярний (тристулковий) клапан. До кожної з його стулок прикріплюються сухожильні хорди, які починаються від трьох сосочкових м'язів. Від стінок міжшлуночкової перегородки до бічної стінки йдуть поперечні м'язи серця. З краніальної частини шлуночка виходить легенева артерія, отвір якої закривають три півмісяцевих клапани, що перешкоджають зворотному надходженню крові в шлуночок при діастолі.

Лівий шлуночок дає початок аорті, отвір якої закривається півмісяцевими клапанами, на вершинах яких розвинені так звані вузлики Аранція – невеликі потовщення, що полегшують повніше закривання аорти. Лівий атріовентрикулярний отвір закритий двостулковим клапаном, від стулок якого йдуть сухожильні хорди до двох сосочкових м'язів. Хоча стінки лівого шлуночка набагато товстіші стінок правого, поперечних м'язів у ньому є лише два. У м'язах шлуночків додатково розвинений поверхневий шар поздовжніх волокон, який є загальним для обох шлуночків, у той час як середній кільцевий шар самостійний для кожного шлуночка.

Для додаткового обґрунтування актуальності дослідження та подальшого застосування тканинспецифічних прогеніторних клітин міокарда було проведено гістологічне дослідження біоптатів серця пацієнтів з ішемічною кардіоміопатією. На гістологічних препаратах виявлено значний фіброз і склероз міокарда через заміщення функціональних кардіоміоцитів сполучною тканиною (рис. 5.2). У пошкоджених кардіоміоцитах відмічали набряк ядер і цитоплазми. Також встановлено набряк периваскулярного простору і середньої оболонки (*tunica media*) артеріол.

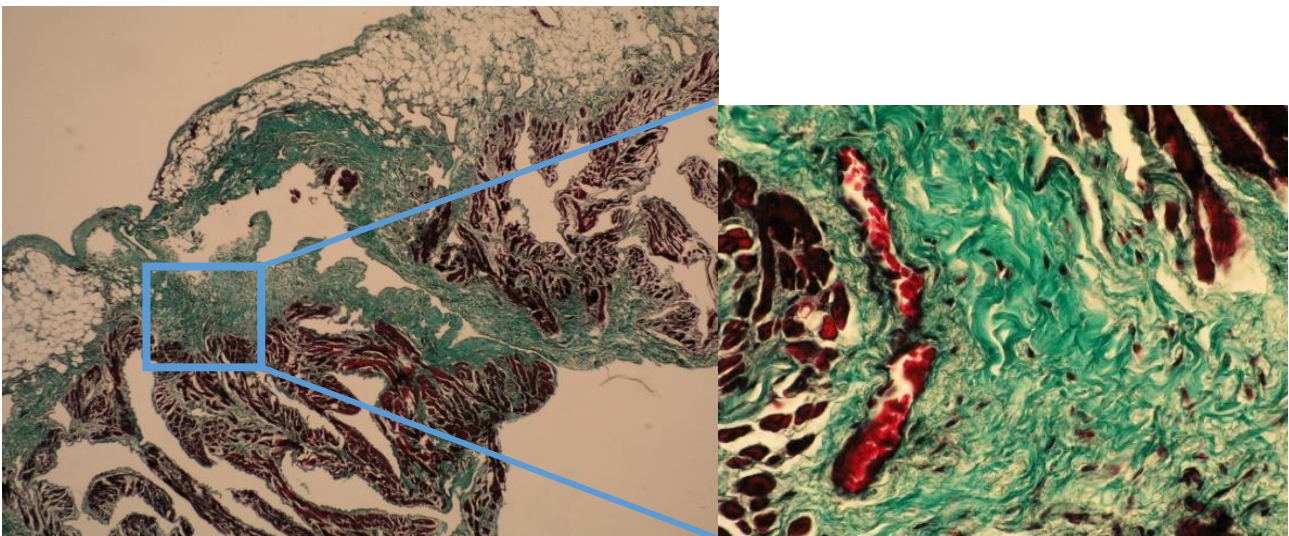


Рисунок 5.2 – Мікрофото гістологічних препаратів вушка передсердя серця пацієнта П., 65 р., з ішемічною кардіоміопатією. Забарвлення трихромом за Массоном, світлова мікроскопія, зб. $\times 400$.

Отже, гістологічне дослідження міокарда в пацієнтів з ішемічною кардіоміопатією, що супроводжується важкою серцевою недостатністю, підтверджує виражені морфологічні ознаки дисфункції серця, яка визначає прогресування клінічного перебігу захворювання. Заміщення нормальної структури міокарда сполучною тканиною є ознакою його патологічного ремоделювання та причиною зниження належної скоротливої здатності серця, а також супутнього порушення функцій збудливості та провідності.

5.2 Морфологічні характеристики первинних культур клітин-попередників з міокарда мишей

На 3-5 добу культивування з прикріплених до поверхні культурального флакону з фібрoneктином експлантів міокарда миші починали мігрувати фібробластоподібні клітини, а також клітини округлої форми (рис. 5.3).

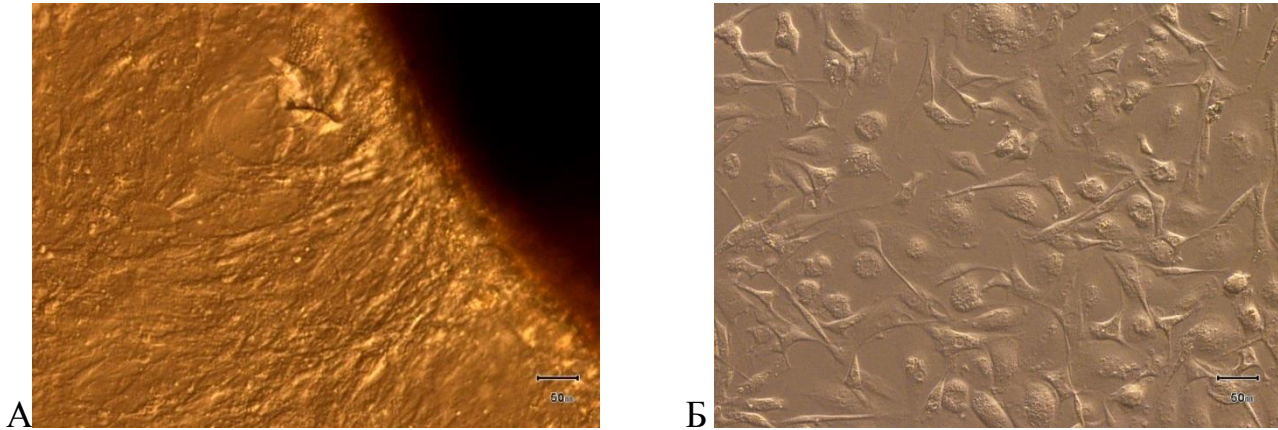


Рисунок 5.3 – Мікрофото первинної культури клітин-попередників з міокарда миші: А – міграція клітин з експланту, 10-а доба культивування; Б – 1-й пасаж культури з експлантів, 17-а доба культивування. Світлова мікроскопія, фазовий контраст, шкала – 50 мкм.

Тканинні експланти видаляли з первинної культури через 2 тиж. На 4-5-й тиж. клітини набували однорідної морфології, росли з помірною швидкістю і після досягнення 90 % конфлюентності їх субкультивували. Отримані культури клітин подальших пасажів характеризувалися гетерогенною морфологією. У культурі були присутні клітини з фібробластоподібною будовою, а також популяція полігональних елементів, припіднятих над поверхнею флакона ("cobblestone"), що за морфологією відповідають ендотеліальним клітинам. Після утворення моношару фібробластоподібних та полігональних ендотеліальних клітин з експлантів тканини серця, спостерігали утворення популяції малих округлих фазово-контрастних клітин, флотуючих у поживному середовищі (рис. 5.4 А).

При субкультивуванні клітин з експлантів міокарда у флаконах з Poly-D-Lysine в середовищі з індукторами диференціювання в напрямі кардіоміоцитів у підібраних оптимальних умовах *in vitro* клітини активно

проліферували, деякі з них відкріплялися та утворювали вільно плаваючі агрегати – кардіосфери. Упродовж 24-72 годин після утворення кардіосфери збільшувались у розмірах та мали діаметр від 20 до 150 мкм (рис. 5.4 Б).

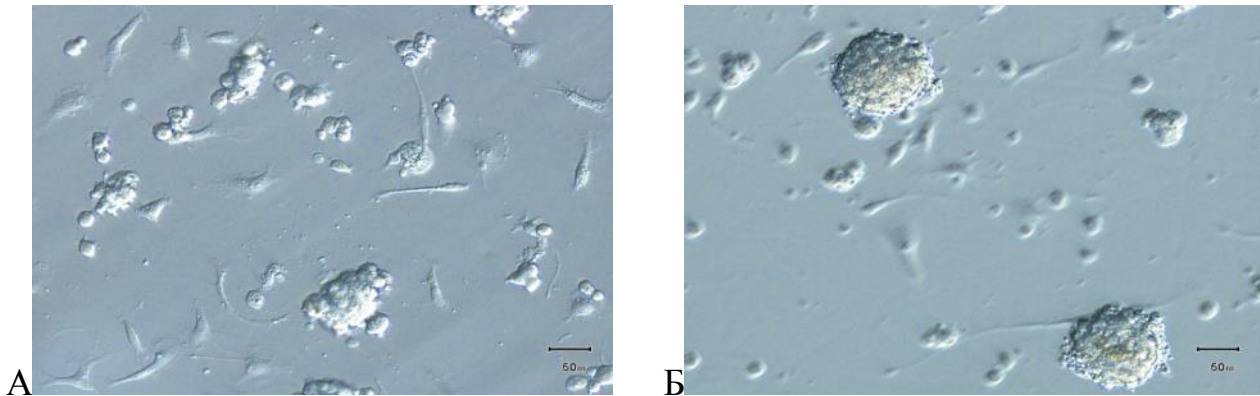


Рисунок 5.4 – Мікрофото культур клітин-попередників з міокарда миші на поверхні флакону з полі-D-лізином у середовищі для вирощування кардіосфер; пасаж 1. А – 1-а доба культивування; Б – 3-а доба культивування. Світлова мікроскопія, фазовий контраст, шкала – 50 мкм.

Кардіосфера є тривимірною просторовою структурою, центр якої утворюють недиференційовані проліферуючі $c\text{-kit}^+$ клітини, а периферійні шари складаються з прогеніторних клітин різних типів, що можуть експресувати маркери як гемопоетичних (CD34, $c\text{-kit}$), ендотеліальних (KDR/Flk-1, CD31), так і мезенхімальних клітин (CD105, CD90). При цьому вони не мають експресувати пан-лейкоцитарний маркер CD45, що було перевірено при їх подальшому мультипараметричному імунофенотипуванні методом проточної цитометрії.

На 2-у добу після утворення кардіосфер у них було зафіксовано спонтанну скоротливу активність, яка підтримувалась до 2-го пасажу. На 7-му добу кардіосфери виділяли та вносили у флакони з покриттям фібронектином у повне поживне середовище IMDM. Кардіосфери прикріплювались до поверхні, розпластувались і з них на субстрат активно мігрували клітини, досягаючи приблизно 70 % конфлюентності культури через три доби (рис. 5.5). При цьому культура клітин, виділених від новонароджених мишей, досягала конфлюентного стану суттєво швидше та мала стабільну скоротливу активність, у порівнянні з культурою прогеніторів від дорослих мишей.

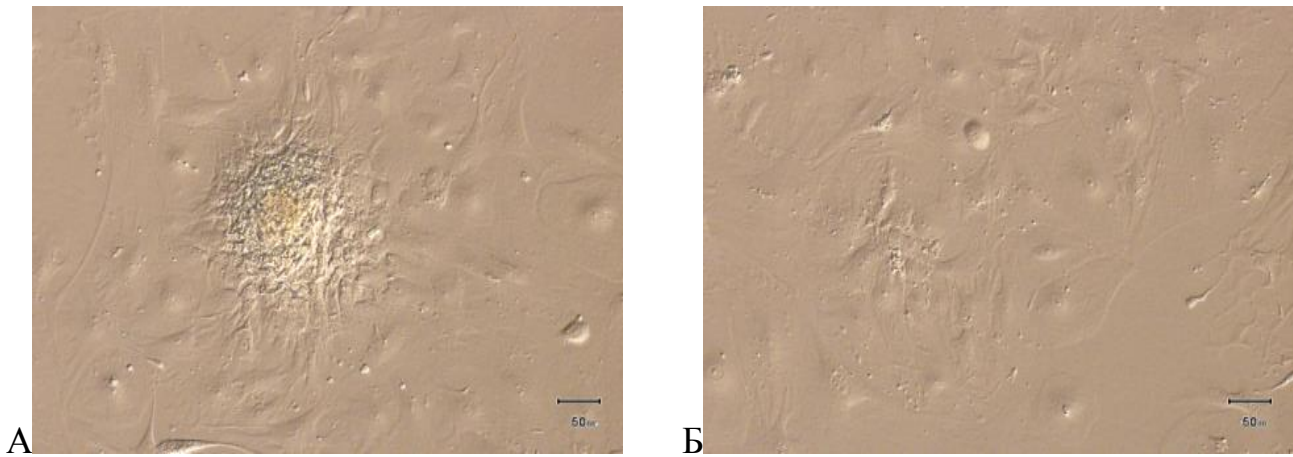


Рисунок 5.5 – Мікрофото культур клітин-попередників з міокарда миші на поверхні флакону з фібронектином у середовищі для вирощування кардіосфер; пасаж 1. А – 1-а доба після субкультивування кардіосфер; Б – 3-а доба культивування кардіосфер. Світлова мікроскопія, фазовий контраст, шкала – 50 мкм.

Визначення кінетики росту клітин *in vitro* показало, що культура, отримана з шлуночків, проліферує втричі повільніше в порівнянні з культурами клітин, отриманих із вушок передсердь ($p < 0,0001$) (рис. 5.6).

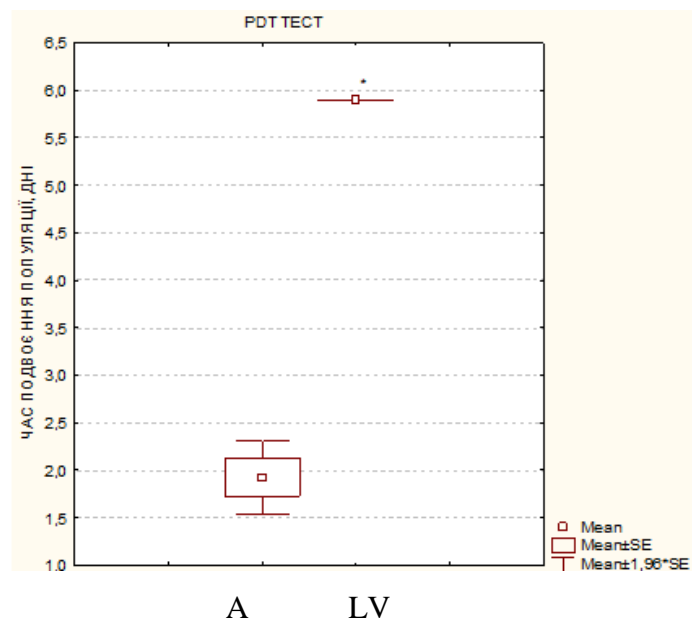


Рисунок 5.6 – Час подвоєння популяції в культурі прогеніторних клітин, виділених зі шлуночків (LV) та передсердь (A) міокарда миші ($M \pm m$).

Примітка: * – $p < 0,0001$ у порівнянні з групою клітин з передсердь.

Додатково було розроблено протокол виділення клітин з синоатріального вузла миші, який передбачає мікропрепарування синоатріального вузла завдяки доступу через вушко правого передсердя (рис. 5.7).

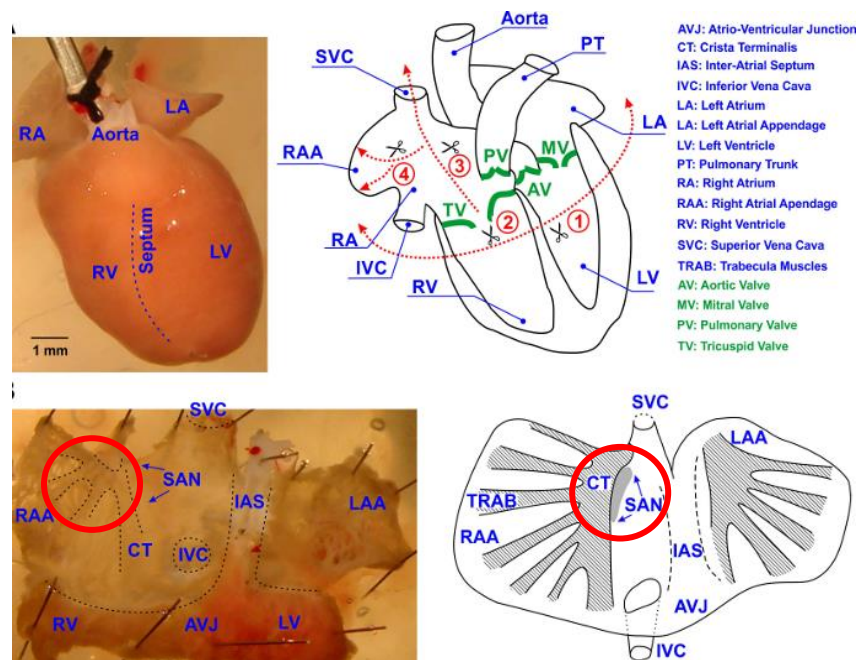


Рисунок 5.7 – Схематичне зображення етапів препарування та виділення синоатріального вузла серця миші (модиф. за Lang D. та Sharpe E. [200, 313]).

Після прикріплення експлантів тканини синоатріального вузла серця мишей до культуральної поверхні флакону приблизно на 3-ю добу навколо фрагментів з'являлася незначна кількість полігональних клітин. Вони поступово формували скупчення, яке наростало в період з 7-ї до 14-ї доби культивування (рис. 5.8). На 14-у добу експланти видаляли, а субконфлюентного стану, достатнього для подальшого субкультивування культура набувала ще через два тижні.

Після субкультивування первинна культура з експлантів синоатріального вузла серця миші складалась з різних за морфологією та розмірами клітин, що, ймовірно, пов'язано з різноманітністю вихідної популяції (рис. 5.9 А). У процесі культивування відбувалось очищення культур від слабоадгезивних клітин, а помірне збільшення загальної кількості клітин спостерігали на 5-7-у добу. За морфологічними характеристиками клітини первинної культури мали спочатку округлу, пізніше – переважно подовжену або полігональну форму, деколи з кількома відростками та з чітко візуалізованими ядрами (рис. 5.9 Б).

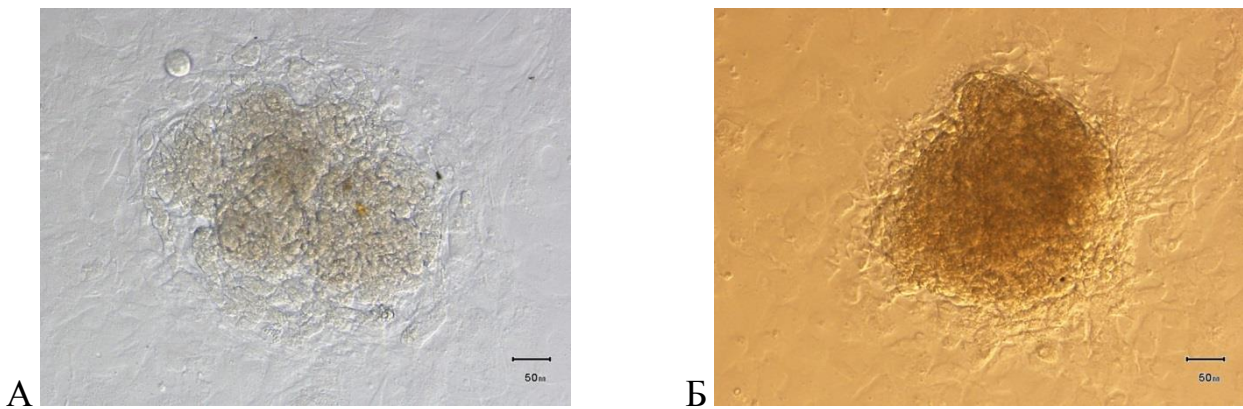


Рисунок 5.8 – Мікрофото первинної культури клітин-попередників з синоатріального вузла миші: А – 7-а доба культивування; Б – 14-а доба культивування. Світлова мікроскопія, фазовий контраст, шкала – 50 мкм.

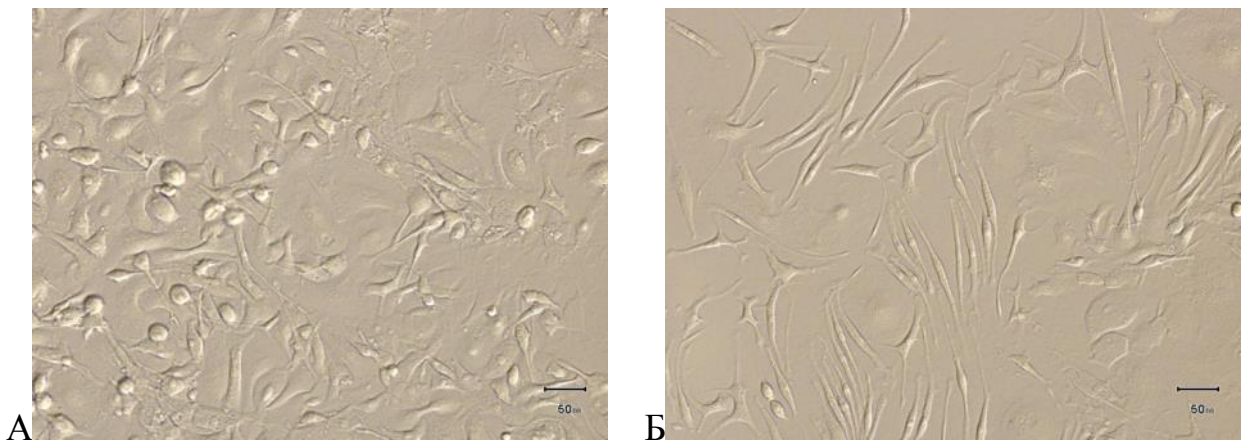


Рисунок 5.9 – Мікрофото культур клітин-попередників з синоатріального вузла серця міокарда миші; пасаж 1. А – 1-а доба; Б – 3-а доба. Світлова мікроскопія, фазовий контраст, шкала – 50 мкм.

Після першого субкультивування клітини досягали субконфлюентного стану в середньому на 3-ю добу. Однак, після другого субкультивування проліферація клітин значно сповільнилася і культура зупиняла ріст, що унеможливило подальше пасажування. Подібний результат можна пояснити деякими технологічними обмеженнями, зокрема, досить малим розміром синоатріального вузла в мишей і, відповідно, малою кількістю тканинного матеріалу. Тому актуальним завданням залишається оптимізація протоколу первинної дисоціації біоптатів синоатріального вузла та підбір оптимальних параметрів їх культивування.

5.3 Морфологічні характеристики клітин-попередників з міокарда людини

Враховуючи технологічні особливості протоколу, розробленого на культурах клітин з міокарда миші, отримання клітин-попередників з тканини вушка передсердя людини відбувалося в три етапи:

1) нарощування популяції клітин з експлантів біоптату в середовищі IMDM у культуральних флаконах з фібронектином;

2) отримання кардіосфер, для формування яких необхідне специфічне середовище з індукторами диференціювання в напрямі кардіоміоцитів та культуральні флакони з Poly-D-Lysine;

3) отримання популяції кардіальних стовбурових/прогеніторних клітин з кардіосфер у стандартному поживному середовищі DMEM-F12 у культуральних флаконах з фібронектином.

Первинну міграцію клітин з експлантів біоптатів тканини вушка передсердя серця людини спостерігали на 15-ту добу культивування (рис. 5.10).

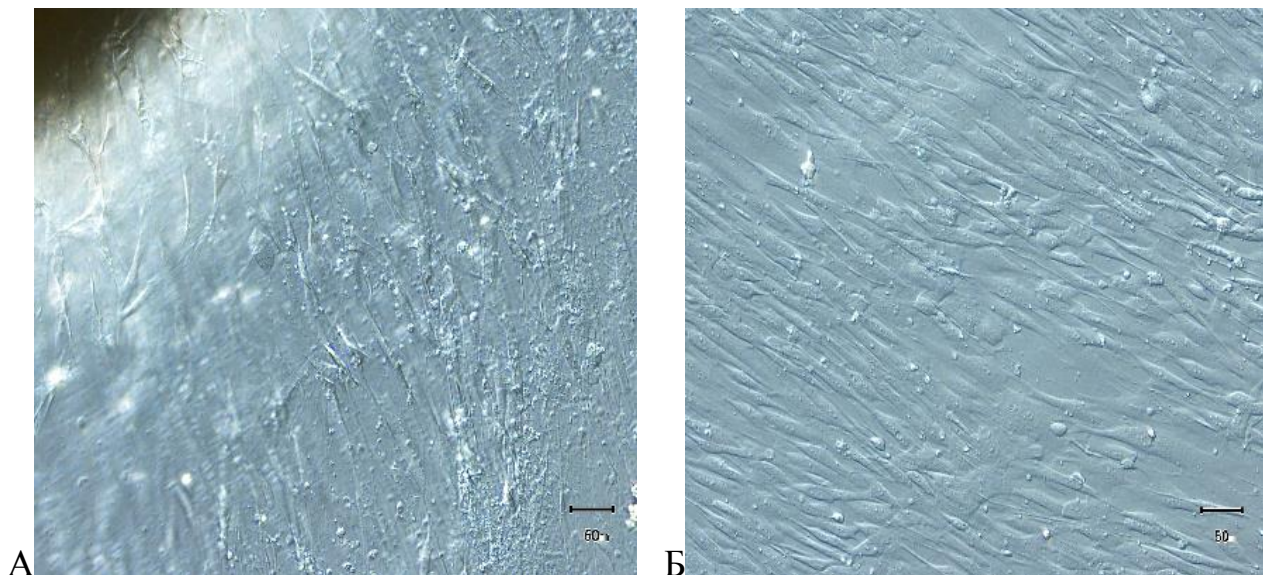


Рисунок 5.10 – Мікрофото культур експлантів фрагментів тканини вушка передсердя хворого з ішемічною хворобою серця, 21-а доба культивування в культуральних флаконах покритих фібронектином. Світлова мікроскопія, фазовий контраст, шкала – 50 мкм.

Популяція клітин, виділена з первинних експлантів тканини вушка передсердя людини, як і для матеріалу від мишей, здатна формувати в культурі сфероїдні агрегати – кардіосфери, які можуть бути як прикріпленими до поверхні культурального флакона, так і вільно плаваючими (флотуючими) в ньому (рис. 5.11-5.12).

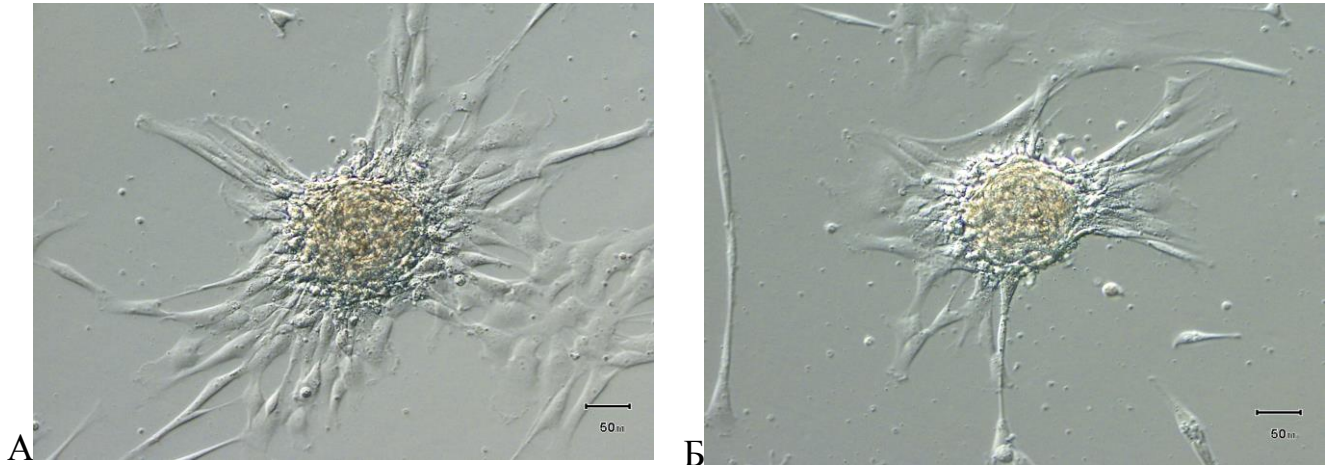


Рисунок 5.11 – Мікрофото цитопрепаратів культур кардіосфер, сформованих з клітин, що мігрували з експлантів у флаконі покритому Poly-D-Lysine в кардіогенному середовищі, 3-а доба культивування. Світлова мікроскопія, фазовий контраст, шкала – 50 мкм.

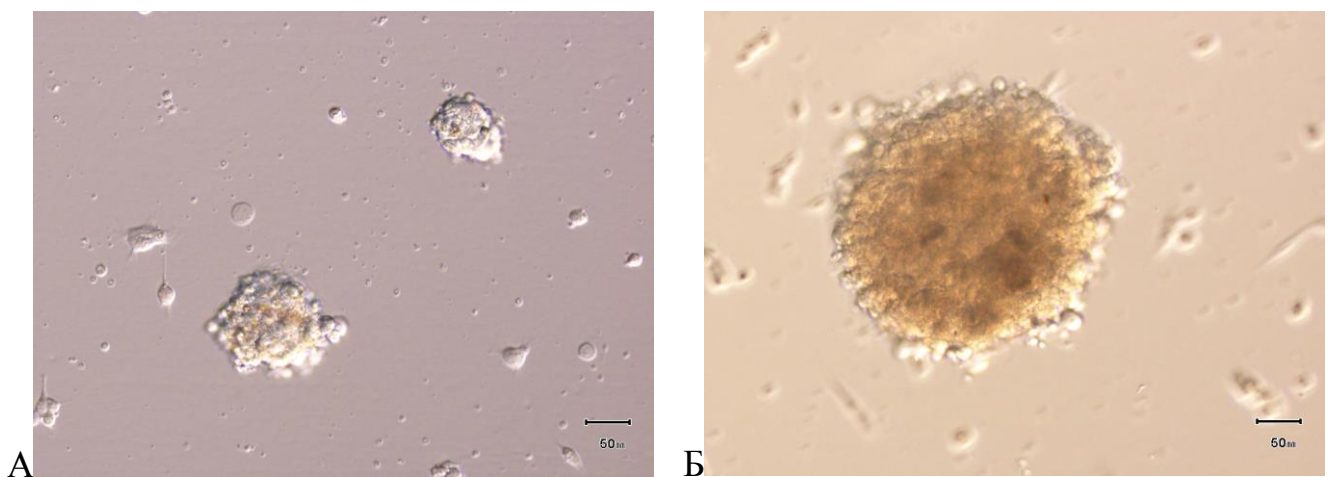


Рисунок 5.12 – Мікрофото цитопрепаратів культур флотуючих кардіосфер, утворених клітинами, які мігрували з експлантів тканини міокарда людини. Культивування у флаконах з Poly-D-Lysine в кардіогенному середовищі, 3-а доба культивування. Світлова мікроскопія, фазовий контраст, шкала – 50 мкм (А), 10 мкм (Б).

По досягненню розміру приблизно 100 мкм, кардіосфери збирали та переносили в культуральний флакон, покритий фібронектином зі стандартним середовищем DMEM-F12, що містило 10 % FBS. Кардіосфери, прикріпившись до поверхні культурального флакону, розпластувались та утворювали моношар кардіальних прогеніторних клітин. Далі отриману культуру субкультивували в нових флаконах, покритих фібронектином, до досягнення конфлюентного моношару (рис. 5.13).

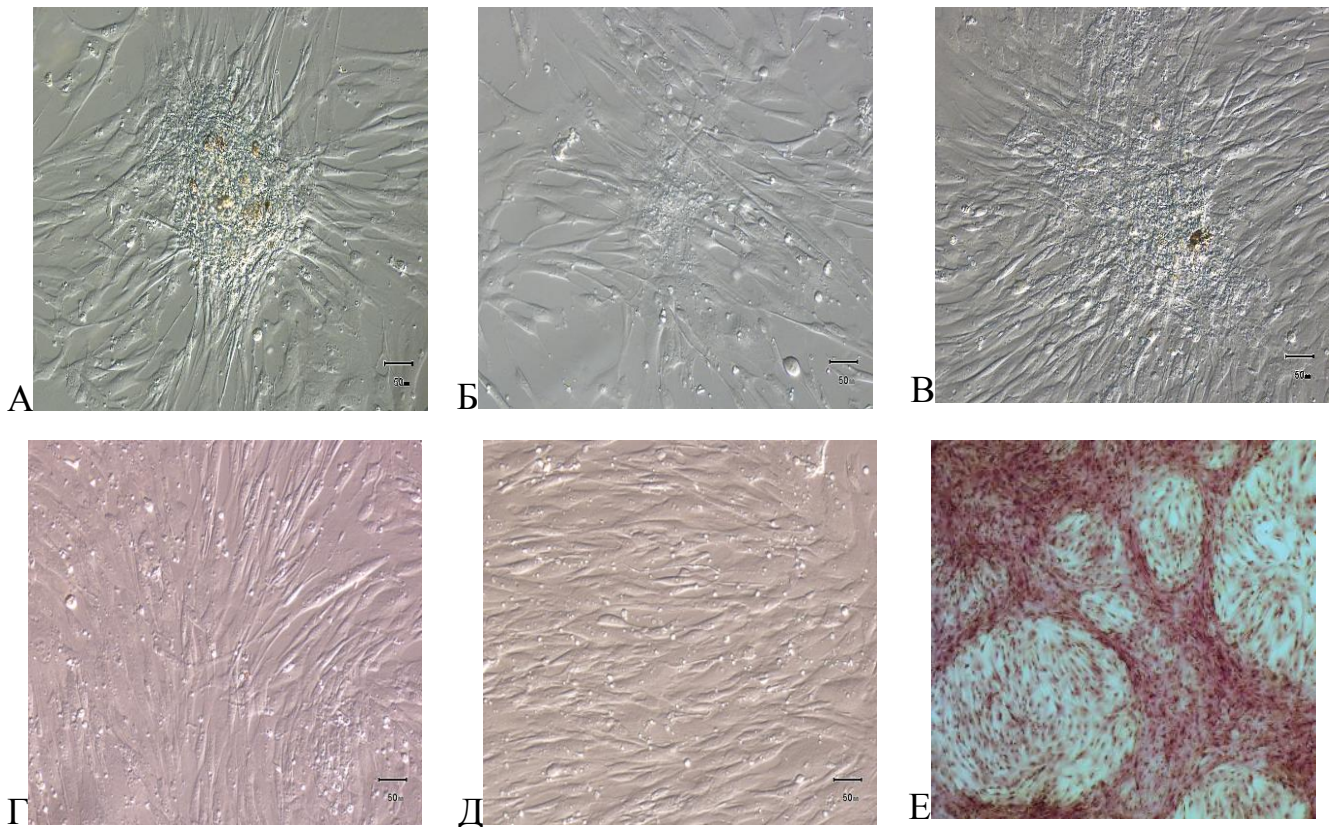


Рисунок 5.13 – Мікрофото культур кардіосфер з міокарда людини, що розпластуються у флаконі з фібронектином у повному поживному середовищі з індукторами диференціювання в напрямі кардіоміоцитів (А-В); моношар, утворений кардіальними клітинами з кардіосфер (Г-Д); Е – забарвлення за Романовським-Гімза. Світлова мікроскопія, фазовий контраст, шкала – 50 мкм.

Отже, було визначено оптимальний склад поживних середовищ, факторів індукції та субстратів росту для культивування тканинспецифічних стовбурових клітин з міокарда мишей і людини та охарактеризовано морфофункціональні критерії якості їх культур.

5.4 Імунофенотип клітин-попередників з тканини міокарда

Після аналізу літературних джерел було розроблено панелі моноклональних антитіл для мультипараметричного імунофенотипування прогеніторних клітин з міокарда людини та миші (табл. 5.1).

Таблиця. 5.1. Панель моноклональних антитіл для імунофенотипування культур клітин з міокарда миші та людини.

Моноклональне антитіло	Виробник	Каталожний номер
<i>anti-mouse</i>		
PE rat anti-mouse CD45	Thermo Scientific	MA1-10233
APC rat anti-mouse CD105	BD Pharmingen	17-1051-82
PE rat anti-mouse CD90.1	BD Pharmingen	551401
APC-Cy7 rat anti-mouse CD90.2	BD Pharmingen	561641
PE rat anti-mouse CD73	BD Pharmingen	550741
PE rat anti-mouse CD44	BD Pharmingen	553134
APC rat anti-mouse CD117	BD Pharmingen	561074
PE rat anti-mouse CD31	BD Pharmingen	553373
AlexaFluor 647 rat anti-mouse CD34	BD Pharmingen	560230
<i>anti-human</i>		
PE mouse anti-human CD44	eBioscience	12-0441-82
PE mouse anti-human CD117	Invitrogen	12-1179-42
PE mouse anti-human CD309	Invitrogen	12-5821-82
PE mouse anti-human CD73	BD Pharmingen	550257
PE mouse anti-human CD31	BD Pharmingen	555446
FITC mouse anti-human CD90	BD Pharmingen	555595
PerCP-Cy5.5 mouse anti-human CD105	BD Pharmingen	560819
APC-Cy7 mouse anti-human CD45	BD Pharmingen	557833
APC mouse anti-human CD34	BD Pharmingen	555824
AlexaFluor 647 anti-human//mouse Troponin I	BD Pharmingen	564409

При імунофенотипуванні свіжовиділених клітин з нативного міокарда новонароджених мишей було встановлено достовірно вищі ($p \leq 0,05$) рівні експресії маркерів CD90, CD73 та CD105 у суспензії з вушок передсердь у порівнянні з клітинами із шлуночків (рис. 5.14-5.15). При цьому рівень експресії CD34 був вдвічі, а CD309 втричі вищим у суспензії клітин зі шлуночків, ніж із передсердь.

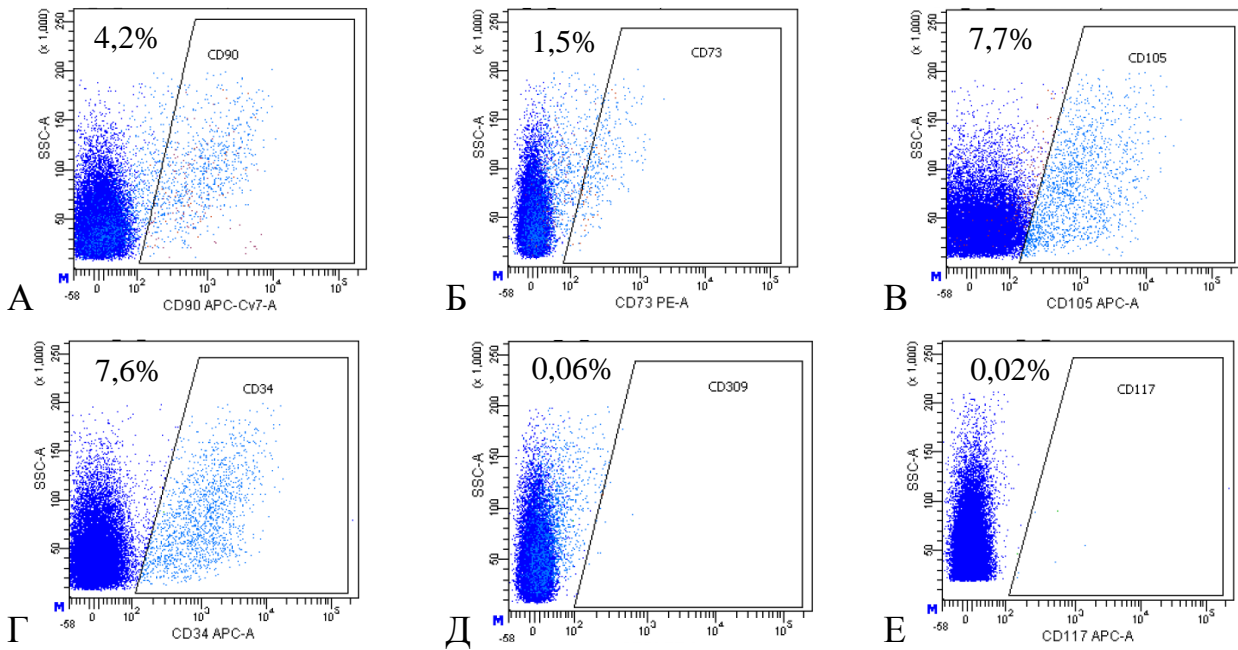


Рисунок 5.14 – Гістограми експресії маркерів CD90 (А), CD73 (Б), CD105 (В), CD34 (Г), CD309 (Д), CD117 (Е) в суспензії клітин зі стінок шлуночків нативного міокарда новонароджених мишей (n = 8) за даними мультипараметричного імунофенотипування методом проточної цитометрії.

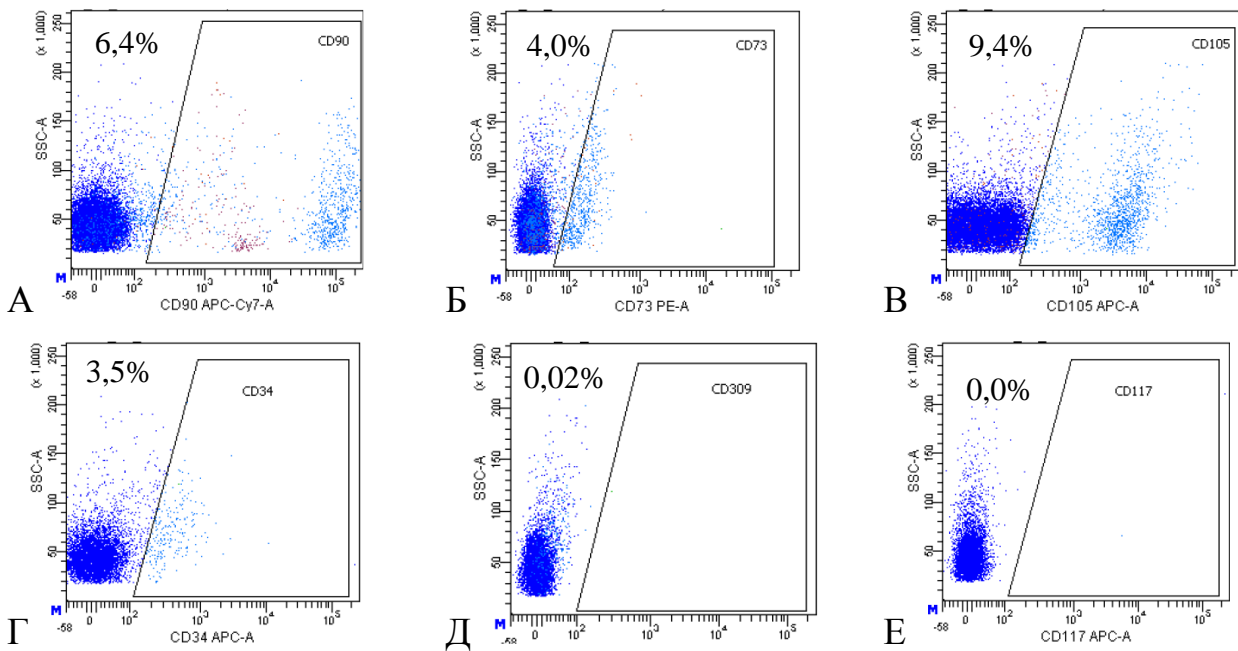


Рисунок 5.15 – Гістограми експресії маркерів CD90 (А), CD73 (Б), CD105 (В), CD34 (Г), CD309 (Д), CD117 (Е) в суспензії клітин з вушок передсердь нативного міокарда новонароджених мишей (n = 8) за даними мультипараметричного імунофенотипування методом проточної цитометрії.

При імунофенотипуванні суспензії клітин з нативного міокарда дорослих мишей віком 5 міс показники експресії маркерів CD90, CD73, CD105 та CD34 були суттєво нижчими як у матеріалі зі шлуночків, так і з передсердь, у порівнянні з новонародженими тваринами (рис. 5.16-5.17). При цьому не було виявлено достовірної різниці по цих показниках щодо матеріалу з різних анатомічних ділянок. Водночас, рівень експресії рецептора фактора росту ендотелію CD309 був вищий в обох суспензіях у порівнянні з клітинами від новонароджених тварин. Рівень експресії CD117 достовірно не відрізнявся між відповідними групами порівняння дорослих і новонароджених мишей.

Загалом, мультипараметричне імунофенотипування методом проточної цитометрії дозволяє встановити особливості експресії специфічних маркерів в суспензії клітин з біоптатів міокарда, що може бути додатковим діагностичним та прогностичним критерієм при виборі оптимального джерела тканиноспецифічних кардіальних стовбурових клітин для подальших досліджень.

При культивуванні виділеної суспензії клітин з міокарда новонароджених мишей до 3-го пасажу отримували однорідну за морфологією популяцію, яка на високому рівні експресувала маркери CD90 і CD105 при низькому рівні експресії CD73, що є типовим саме для прогеніторів з міокарда, у порівнянні з мультипотентними мезенхімальними стромальними клітинами (рис. 5.18-5.19).

Також відмічено наявність популяції клітин з відносно високими рівнями експресії маркерів CD34 та CD309, причому в культурі прогеніторів зі шлуночків експресія рецептора судинного фактора росту була суттєво вищою ($12,9 \pm 1,1$ %), ніж у культурі з передсердь ($4,9 \pm 0,6$ %). Експресія маркера CD117 залишалась на досить низькому рівні ($0,4 \pm 0,1$ %) в обох групах порівняння (рис. 5.18-5.19).

Окрім того, було відмічено присутність мінорної популяції клітин ($3,7 \pm 1,3$ % на першому пасажі), які за фенотипом CD44⁺CD117⁺ можуть належати до кардіальних клітин-попередників (рис. 5.20). При цьому встановлено досить високу експресію в культурі маркера CD34 (до 47,6 %), хоча популяція клітин з фенотипом ендотеліальних попередників CD34⁺CD31⁺ на першому пасажі залишалась низькою (до 2,4 %).

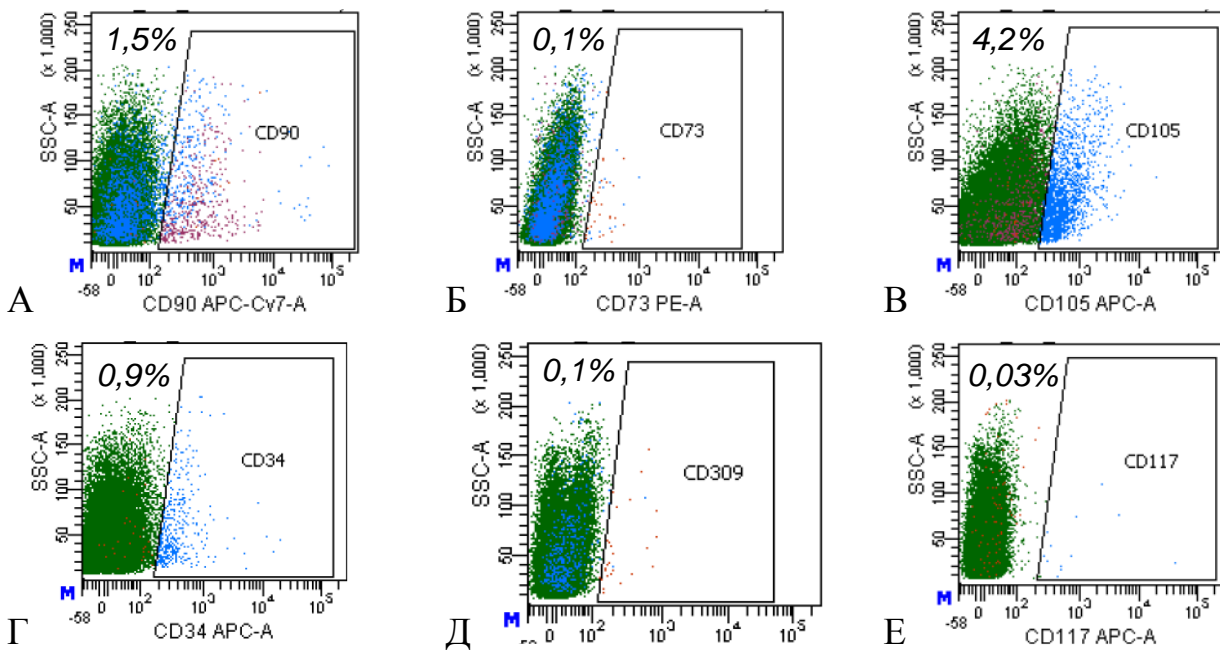


Рисунок 5.16 – Гістограми експресії маркерів CD90 (А), CD73 (Б), CD105 (В), CD34 (Г), CD309 (Д), CD117 (Е) в суспензії клітин зі стінок шлуночків нативного міокарда мишей віком 5 міс (n = 6) за даними мультипараметричного імунофенотипування методом проточної цитометрії.

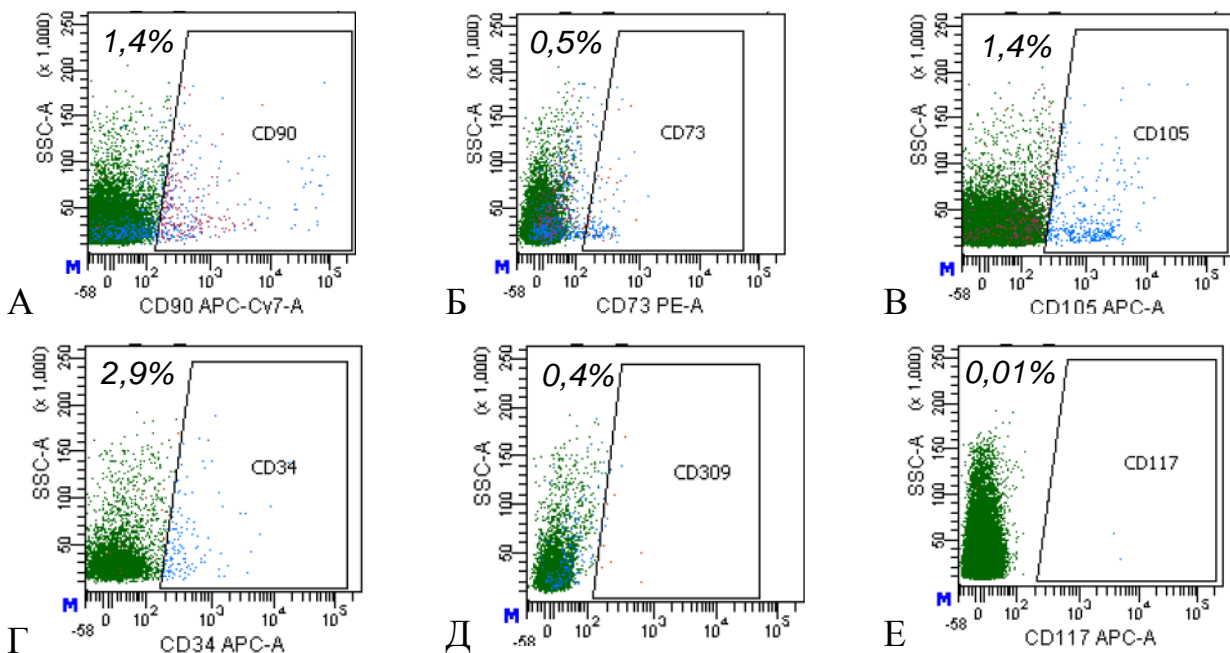


Рисунок 5.17 – Гістограми експресії маркерів CD90 (А), CD73 (Б), CD105 (В), CD34 (Г), CD309 (Д), CD117 (Е) в суспензії клітин з вушок передсердь нативного міокарда мишей віком 5 міс (n = 6) за даними мультипараметричного імунофенотипування методом проточної цитометрії.

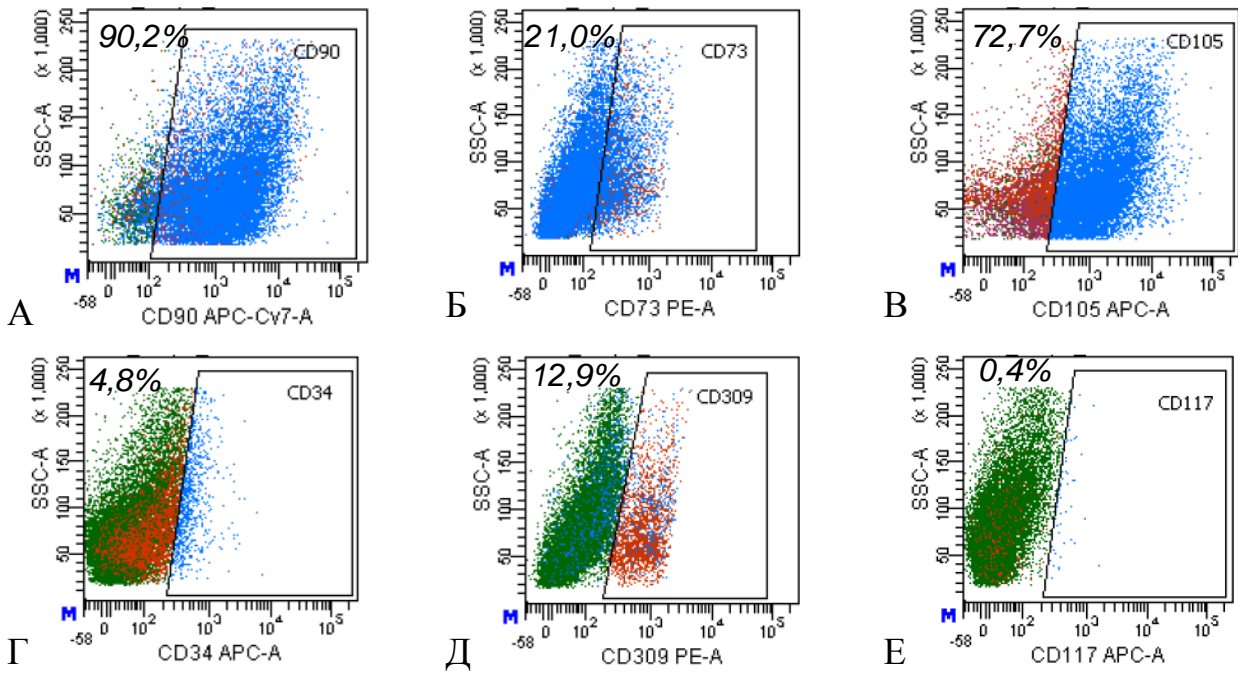


Рисунок 5.18 – Гістограми експресії маркерів CD90 (А), CD73 (Б), CD105 (В), CD34 (Г), CD309 (Д), CD117 (Е) в культурі прогеніторних клітин із стінок шлуночків серця новонароджених мишей (пасаж 3) за даними мультипараметричного імунофенотипування методом проточної цитометрії.

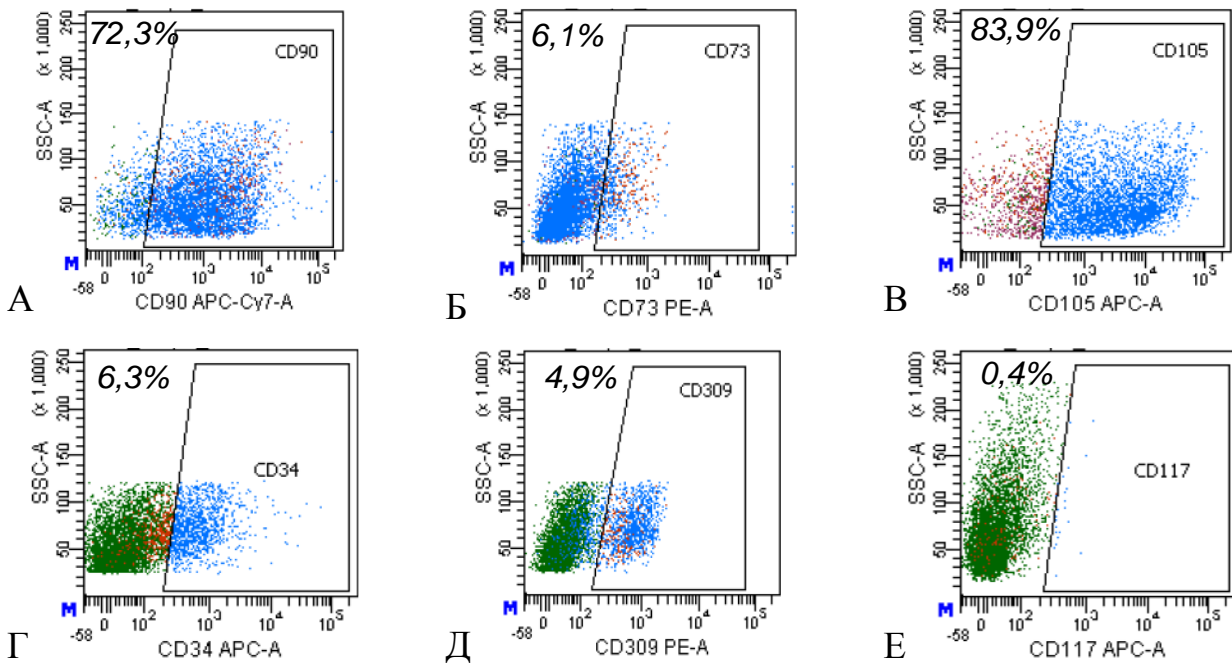


Рисунок 5.19 – Гістограми експресії маркерів CD90 (А), CD73 (Б), CD105 (В), CD34 (Г), CD309 (Д), CD117 (Е) в культурі прогеніторних клітин із вушок передсердь серця новонароджених мишей (пасаж 3) за даними мультипараметричного імунофенотипування методом проточної цитометрії.

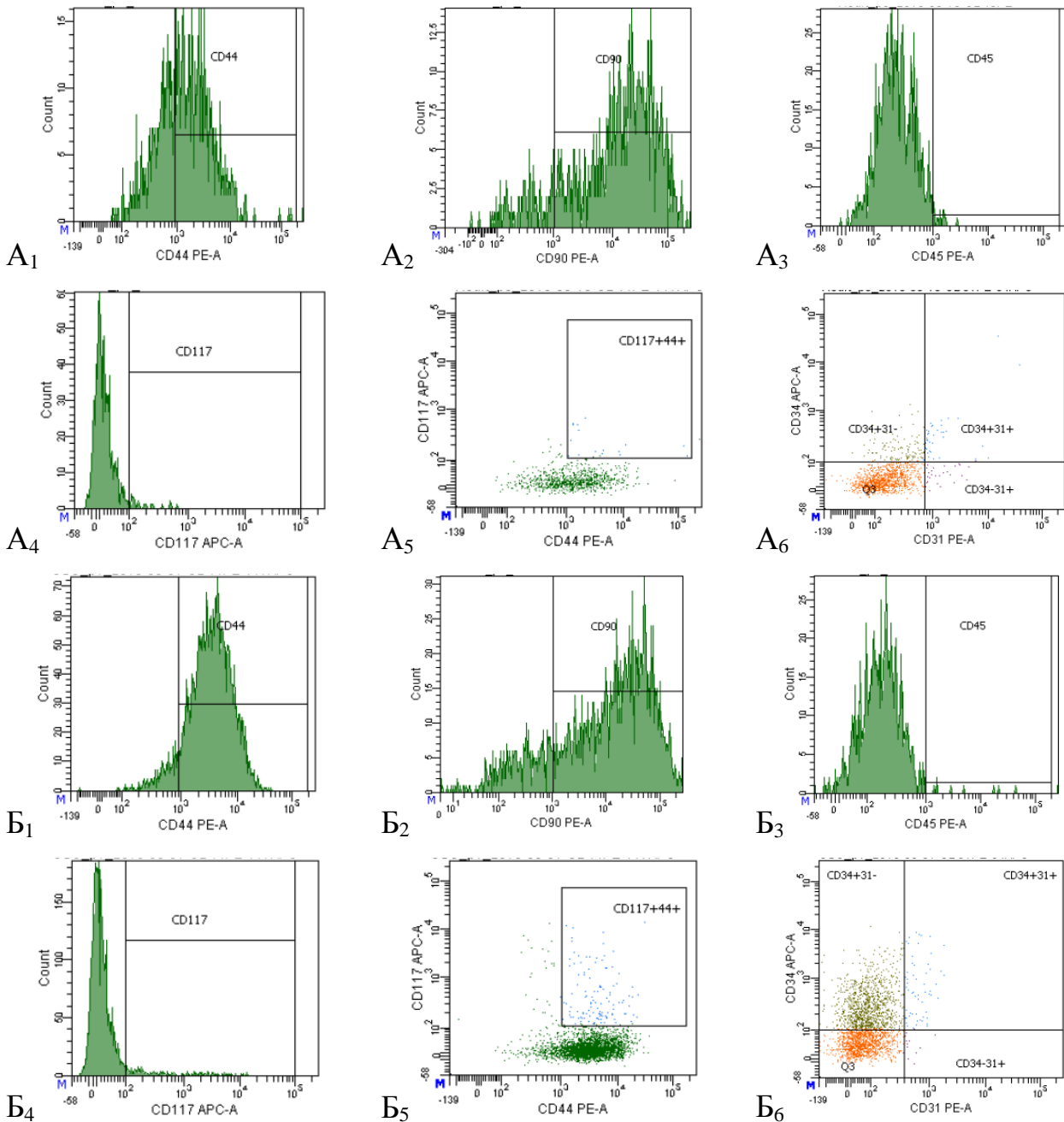


Рисунок 5.20 – Гістограми експресії маркерів CD44 (A₁, B₁), CD90 (A₂, B₂), CD45 (A₃, B₃), CD117 (A₄, B₄), субпопуляцій за комбінацією маркерів CD44/CD117 (A₅, B₅) і CD34/CD31 (A₆, B₆) в культурі клітин з експлантів міокарда мишей за даними проточної цитометрії, пасаж 0 (A₁-A₆) та 1 (B₁-B₆).

При подальшому культивуванні отримували однорідну популяцію, яка на високому рівні експресувала маркер CD105, а також CD90 і CD73 за відсутності гемопоетичного маркера CD45, що могло б нагадувати фенотип мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин. Проте, для отриманих культур була характерною присутність популяції CD34-позитивних клітин, що не є типовим

для ММСК, а при термінальному диференціюванні встановлено високу експресію маркера кардіоміоцитів тропонін I (рис. 5.21). При цьому було відмічено відмінності в експресії тропоніну I: у культурі термінально диференційованих клітин зі шлуночків цей показник становив $27,1 \pm 3,1 \%$, у той час як у культурі з передсердь – $69,8 \pm 5,2 \%$ (рис. 5.22).

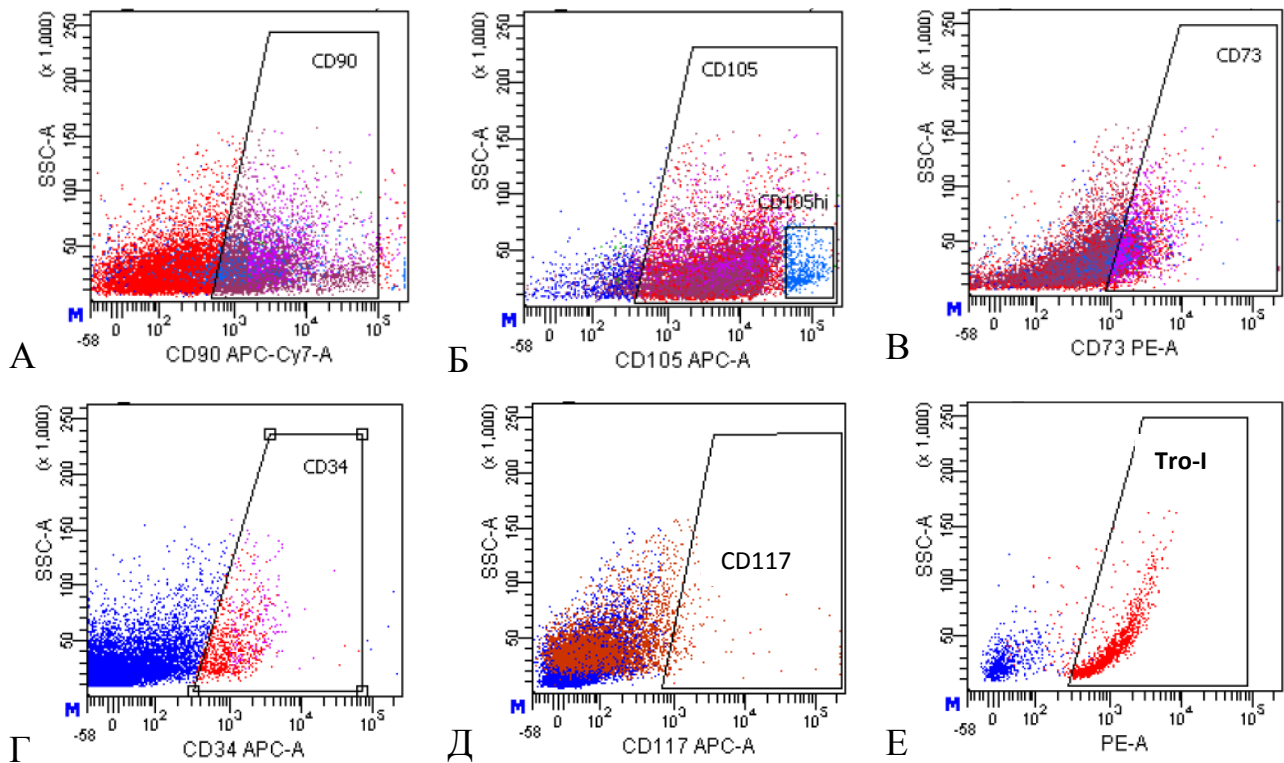


Рисунок 5.21 – Гістограми експресії маркерів CD90 (А), CD105 (Б), CD73 (В), CD34 (Г), CD117 (Д), тропонін I (Е) в культурі CSCs мишей з вухка передсердя за даними проточної цитометрії.

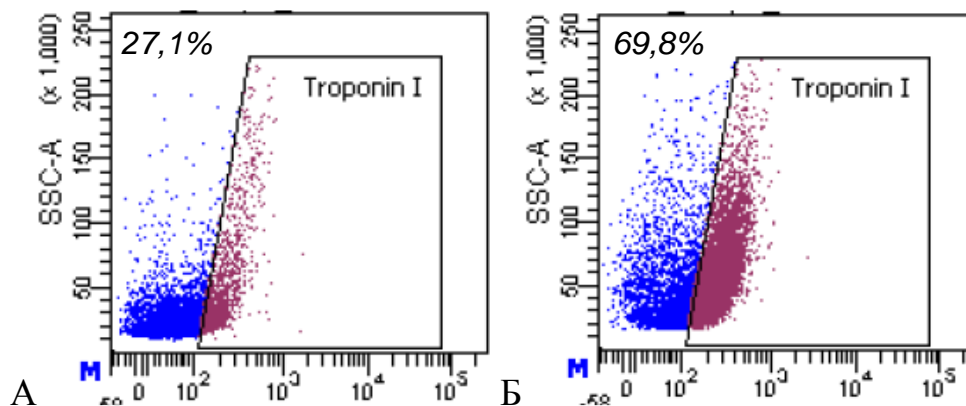


Рисунок 5.22 – Гістограми експресії тропоніну I у культурі прогеніторних клітин із стінок шлуночків (А) та вухок передсердь (Б) серця новонароджених мишей (пасаж 3) за даними імунофенотипування методом проточної цитометрії.

При імунофенотипуванні культури клітин з синоатріального вузла миші рівень експресії маркерів CD90 і CD105 також був досить високим (понад 70 %) при низькому рівні експресії CD73 (рис. 5.23). При цьому досить високими були рівні експресії CD34 і CD309. Особливо відрізнялась експресія маркера кардіальних стовбурових клітин CD117, яка становила 4,4 %, що суттєво більше в порівнянні з культурами клітин з інших анатомічних ділянок. Проте, через зупинку проліферації культури після 2-го пасажу, подальших досліджень імунофенотипу в динаміці культивування проведено не було.

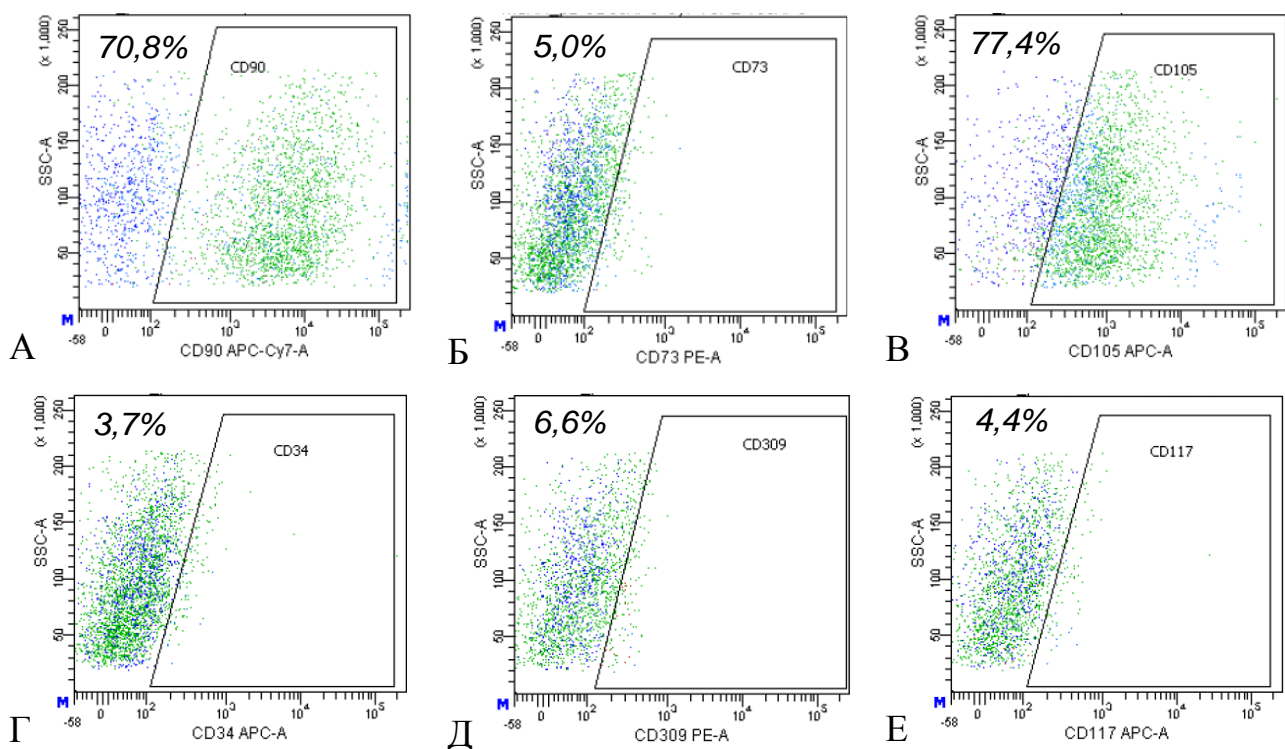


Рисунок 5.23 – Гістограми експресії маркерів CD90 (А), CD73 (Б), CD105 (В), CD34 (Г), CD309 (Д), CD117 (Е) в культурі прогеніторних клітин із синоатріального вузла серця мишей (пасаж 2) за даними мультипараметричного імунофенотипування методом проточної цитометрії.

Тобто, було встановлено, що культури клітин з синоатріального вузла серця миші суттєво відрізняються за експресією маркерів CD73, CD34 та CD309 від культур прогеніторів з кардіосфер, отриманих з тканини передсердь або шлуночків, а також вони не експресують тропонін І.

При мультипараметричному імунофенотипуванні методом проточної цитометрії культур CSCs людини, які культивували у флаконах, покритих фібронектином, встановлено високу експресію (понад 90 %) ключових маркерів CD90 та CD105, а також CD73, при відсутності експресії гемопоетичного маркера CD45 (рис. 5.24). Як і для клітин з міокарда мишей, виявлено присутність популяції CD34-позитивних клітин ($10,6 \pm 2,8$ %). При цьому відмічали наявність $16,6 \pm 6,2$ % клітин з експресією маркера кардіальних стовбурових клітин CD117 (c-kit), частина з яких одночасно ко-експресували маркер CD34 ($12,1 \pm 1,6$ % від CD117-позитивних клітин або $1,9 \pm 0,3$ % – від загальної популяції).

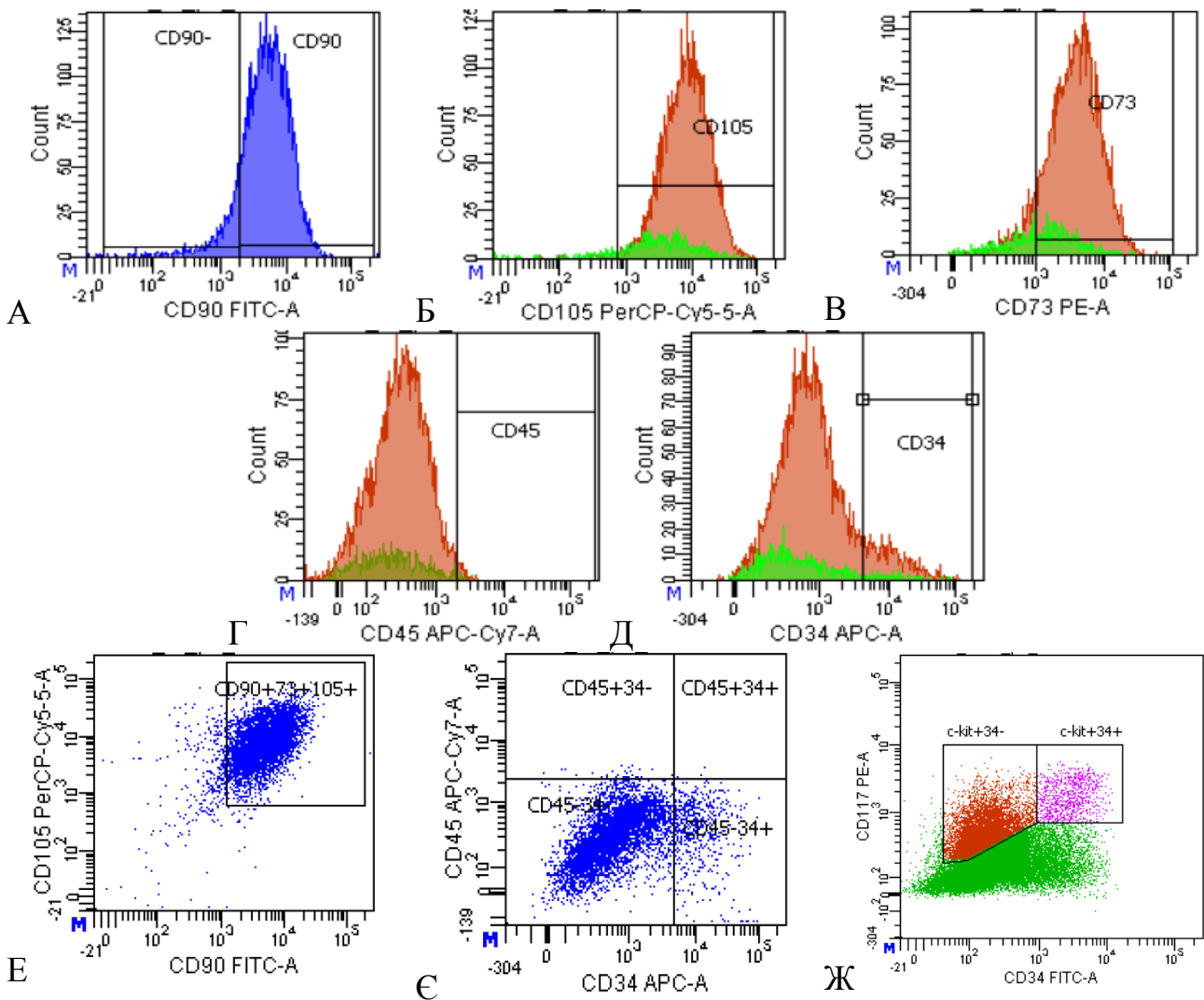


Рисунок 5.24 – Стовпчикові гістограми експресії маркерів CD90 (А), CD105 (Б), CD73 (В), CD45 (Г), CD34 (Д); dot-plot гістограми субпопуляцій за комбінацією маркерів CD90/CD105/CD73 (Е), CD34/CD45 (Є) та CD34/CD117 (Ж) у культурі клітин з кардіосфер людини за даними проточної цитометрії.

За результатами імуноцитохімічного дослідження в отриманих культурах термінально диференційованих кардіальних стовбурових клітин з вушка передсердя, стінки лівого шлуночка та трабекулярної зони серця людини встановлено присутність експресії ключового маркера кардіоміоцитів – тропоніну I (рис. 5.25).

Окрім того, у культурі кардіальних прогеніторів з вушка передсердя за допомогою імуноцитохімічного дослідження встановлено високий рівень експресії ендотеліального маркера CD31 (рис. 5.26).

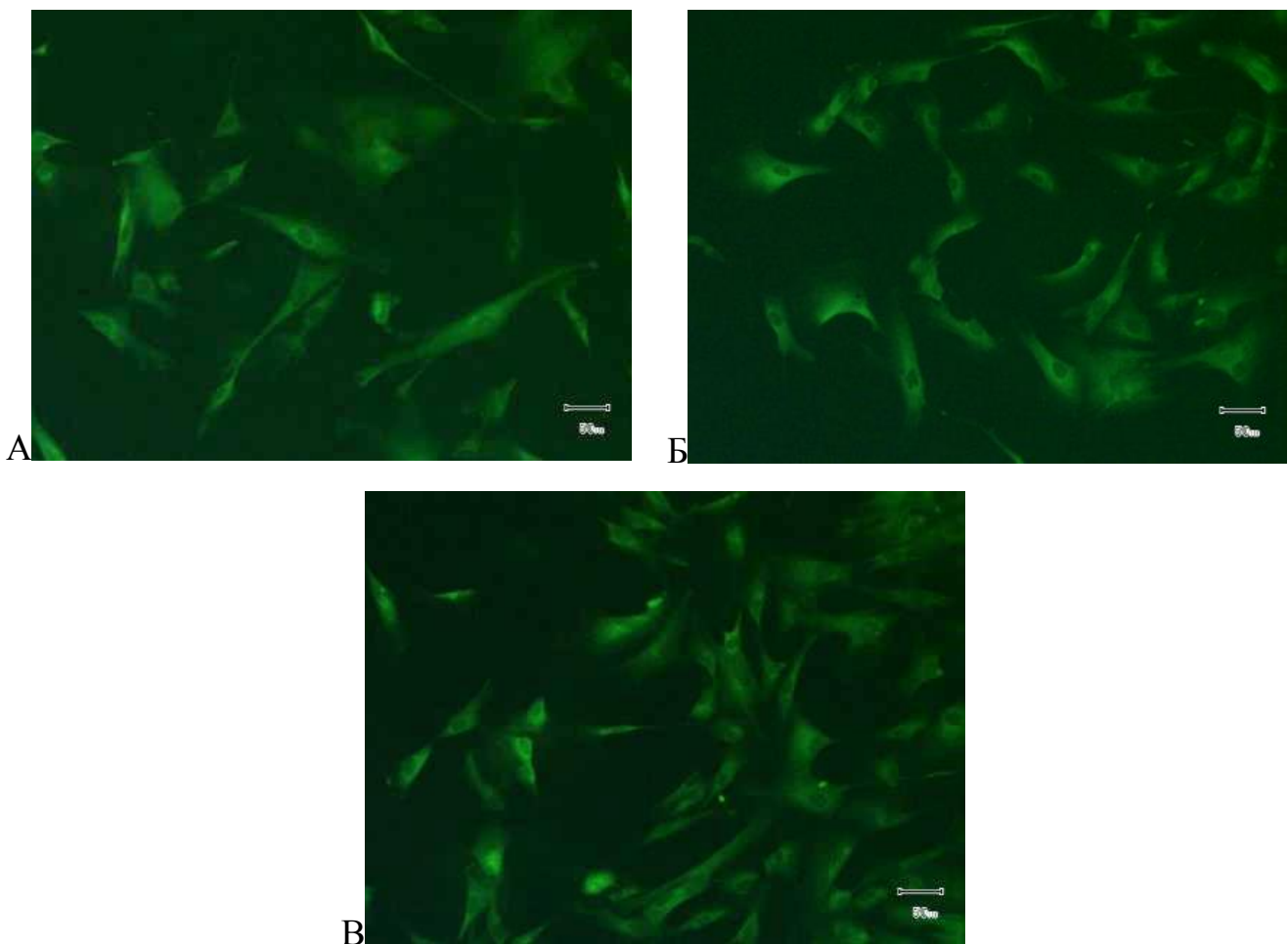


Рисунок 5.25 – Мікрофото цитопрепаратів культур кардіальних прогеніторів, виділених з вушка пересердя (А), стінки лівого шлуночка (Б) та трабекулярної зони (В) серця людини. Імуноцитохімічне забарвлення на тропонін I (зелений колір). Флуоресцентна мікроскопія, шкала – 50 мкм.

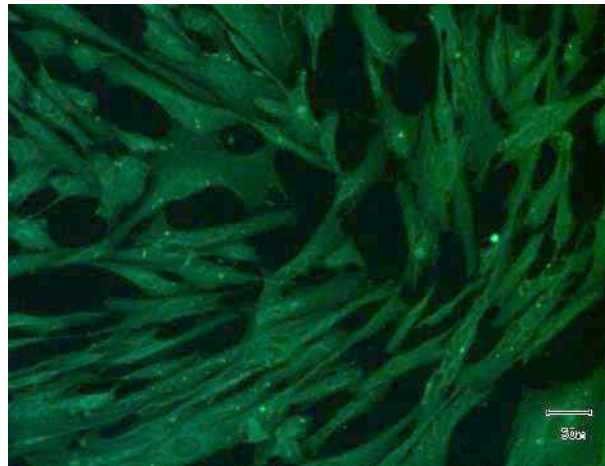


Рисунок 5.26 – Мікрофото цитопрепарату культури кардіальних прогеніторів, виділених з вушка пересердя серця людини. Імуноцитохімічне забарвлення на CD31 (зелений колір). Флуоресцентна мікроскопія, шкала – 50 мкм.

Отже, були підібрані панелі моноклональних антитіл для встановлення імунофенотипічних критеріїв відповідності культур прогеніторних клітин з міокарда мишей та людини. За допомогою проточної цитометрії та імуноцитохімії було визначено експресію низки маркерів кардіальних прогеніторних клітин з різних анатомічних ділянок міокарда. Встановлено, що кардіальні прогеніторні клітини на високому рівні експресують маркери CD90, CD73, CD105 на ранніх пасажах, у той час як експресія маркерів CD34, CD31, CD117 та CD309 наростає поступово в динаміці. Ключовим маркером, що характеризує термінально диференційовані прогеніторні клітини з міокарда є тропонін I.

Можна припустити, що культура прогеніторних клітин з вушок передсердь швидше досягає термінального фенотипу, типового для кардіоміоцитів, що корелює з даними проліферативного потенціалу та скоротливої активності при морфологічному дослідженні.

Основні положення розділу висвітлені в публікаціях здобувача із зазначенням відповідних посилань на список цитованих джерел [2, 3, 10, 195, 196].

РОЗДІЛ 6 ХАРАКТЕРИСТИКИ ТА РЕГЕНЕРАТИВНИЙ ПОТЕНЦІАЛ ММСК ПЛАЦЕНТИ

6.1 Характеристика ММСК плаценти мишей

На 1-му та 2-му пасажі в первинній культурі клітин з плаценти миші переважали фібробластоподібні клітини з високою адгезивністю. Отримана популяція клітин характеризувалася високим проліферативним потенціалом у культурі *in vitro*, досягаючи конфлюентного стану протягом 5-6 діб (рис. 6.1).

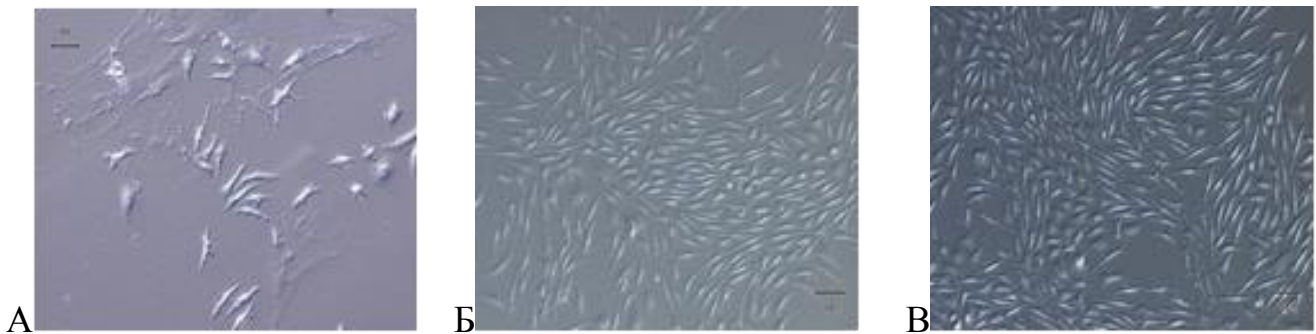


Рисунок 6.1 – Мікрофотографії культури клітин плаценти плодів мишей (E18-E19). А – пасаж 0; Б – 1-й пасаж; В – 2-й пасаж.

При мультипараметричному імунофенотипуванні методом проточної цитометрії на другому пасажі було встановлено високий рівень експресії мезенхімальних маркерів CD90 та CD44 при низькій експресії гемопоетичного маркера CD45 (рис. 6.2). Цікавим виявився факт експресії в частини клітин маркера CD31, що вказує на присутність у первинній культурі ендотеліальних прогеніторів, які можуть походити з судин ворсинок хоріона. Окрім того, було виявлено мінорну популяцію клітин, що експресували рецептор тирозинкінази CD117, який залучений до реалізації сигнальних шляхів стовбуровості багатьох типів тканиноспецифічних стовбурових клітин.

Життєздатність клітин після переведення адгезивної культури в суспензію становила 92,4 %, що підтверджує достатню стійкість клітин до агресивних умов субкультивування та можливість їх подальшого застосування для трансплантації в доклінічних дослідженнях.

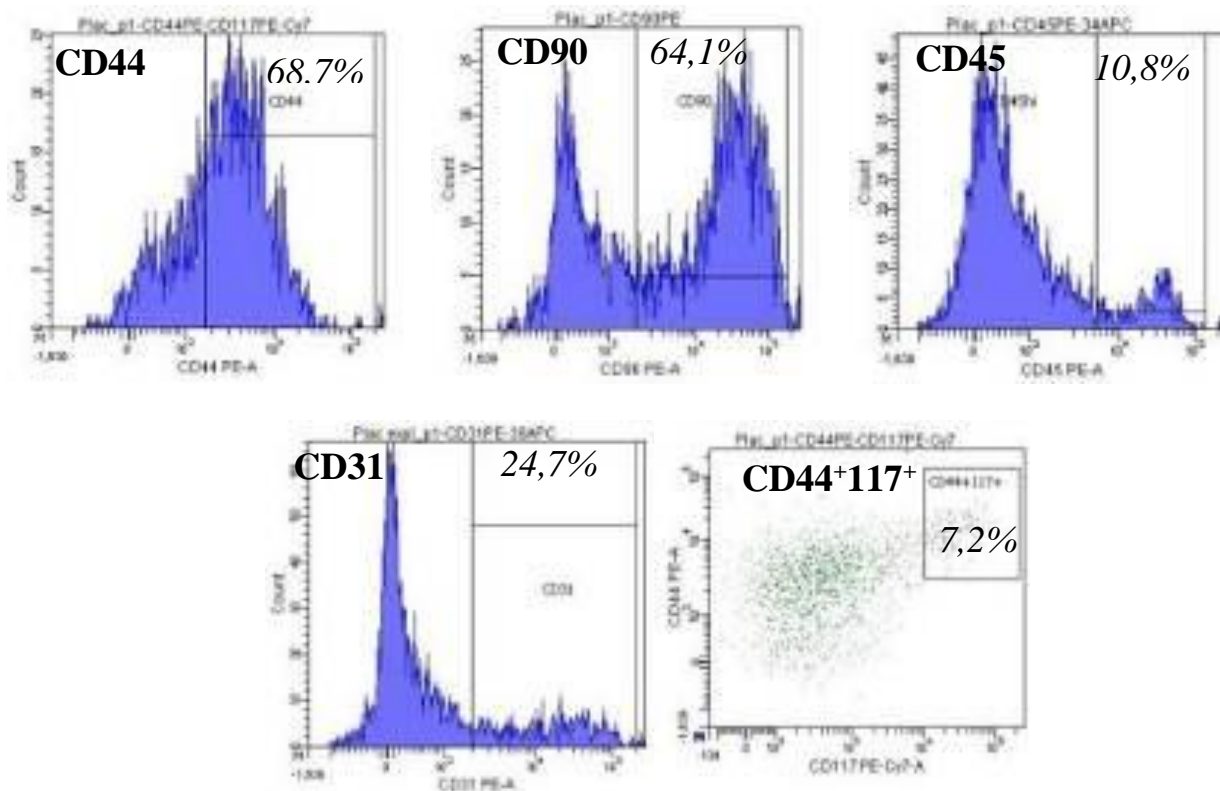


Рисунок 6.2 – Гістограми експресії маркерів CD44, CD90, CD45, CD31 та комбінації CD44/CD117 у культурі клітин з експлантів плаценти плодів миші, пасаж 2, за даними проточної цитометрії. Програмне забезпечення BD FACSDiva 6.1.2.

При спрямованому остеогенному та адипогенному диференціюванні культур ММСК плаценти миші *in vitro* виявлено відкладання солей кальцію в екстрацелюлярному матриксі або формування ліпідних вакуоль у цитоплазмі клітин, що підтверджено специфічним забарвленням цитопрепаратів барвниками Alizarin Red S або Oil Red O, відповідно.

Отже, було розроблено протокол виділення ММСК з плаценти мишей та за допомогою імунофенотипування і спрямованого диференціювання підтверджено, що отримані за цією методикою культури клітин відповідають мінімальним критеріям ММСК згідно з вимогами Міжнародного товариства з клітинної терапії.

6.2 Характеристика ММСК плаценти людини

З фрагментів нативної та кріоконсервованої плаценти людини були отримані первинні культури адгезивних фібробластоподібних та розпластаних епітеліальних клітин, що активно проліферували (рис. 6.3).

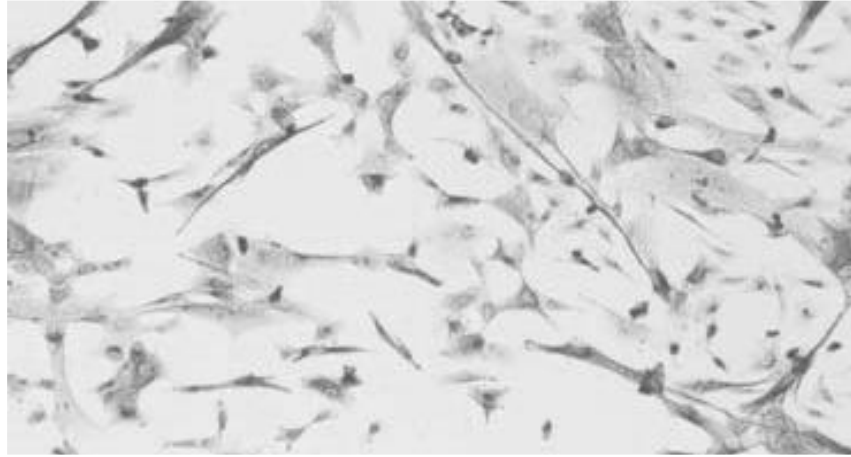


Рисунок 6.3 – Мікрофото первинної культури клітин з плаценти людини, пасаж 3. Світлова мікроскопія, зб. $\times 100$.

При імунофенотипуванні методом проточної цитометрії первинної суспензії клітин, отриманих з ферментованих фрагментів плаценти людини, було показано, що тканина плаценти *in situ* містить як мінорну популяцію ММСК-подібних клітин з фенотипом $CD90^+CD73^+CD45^-CD34^-CD14^-$ ($0,22 \pm 0,14$ %, $n = 4$), так і $CD90^-CD73^+CD45^-CD34^-CD14^-$ ($3,61 \pm 2,45$ %, $n = 4$) (рис. 6.4) [312].

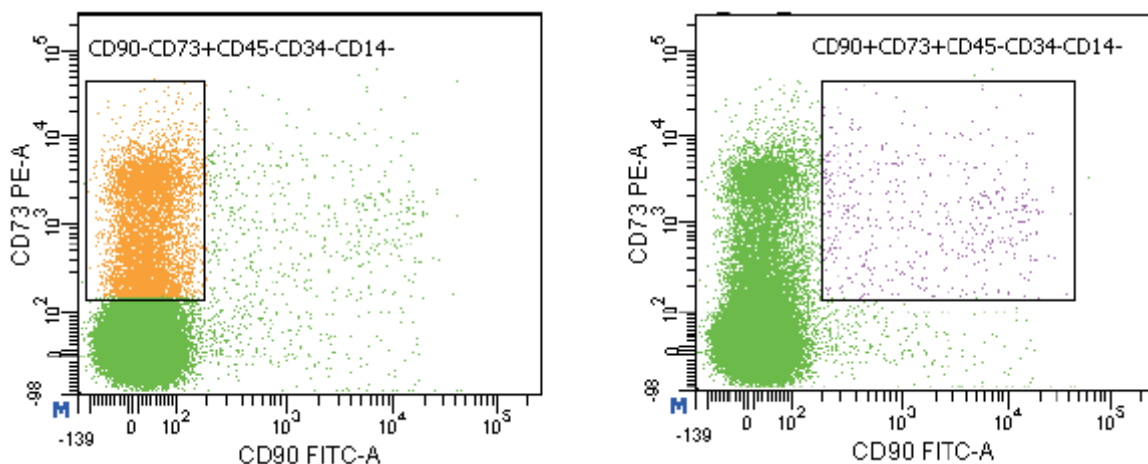


Рисунок 6.4 – Dot-plot гістограми імунофенотипування методом проточної цитометрії клітин, виділених за допомогою ферментування тканини плаценти людини. Програмне забезпечення BD FACSDiva 6.1.2.

При культивуванні з першого по 6-й пасаж отримані культури клітин плаценти були позитивними на CD90, CD73, CD105, HLA-ABC і, водночас, негативними на CD34, CD45, CD133, CD14 (рис. 6.5 А). Однак, рівень експресії CD90 перебував у межах від 73.8 % до 98.3 % (n = 10). Деякі культури плацентарних ММСК мали двомодальний характер експресії CD90 і містили як CD90⁺, так і CD90⁻ популяції клітин. Рівень експресії CD73 та CD105 на поверхні субпопуляцій CD90⁻ і CD90⁺ клітин практично не відрізнявся [310].

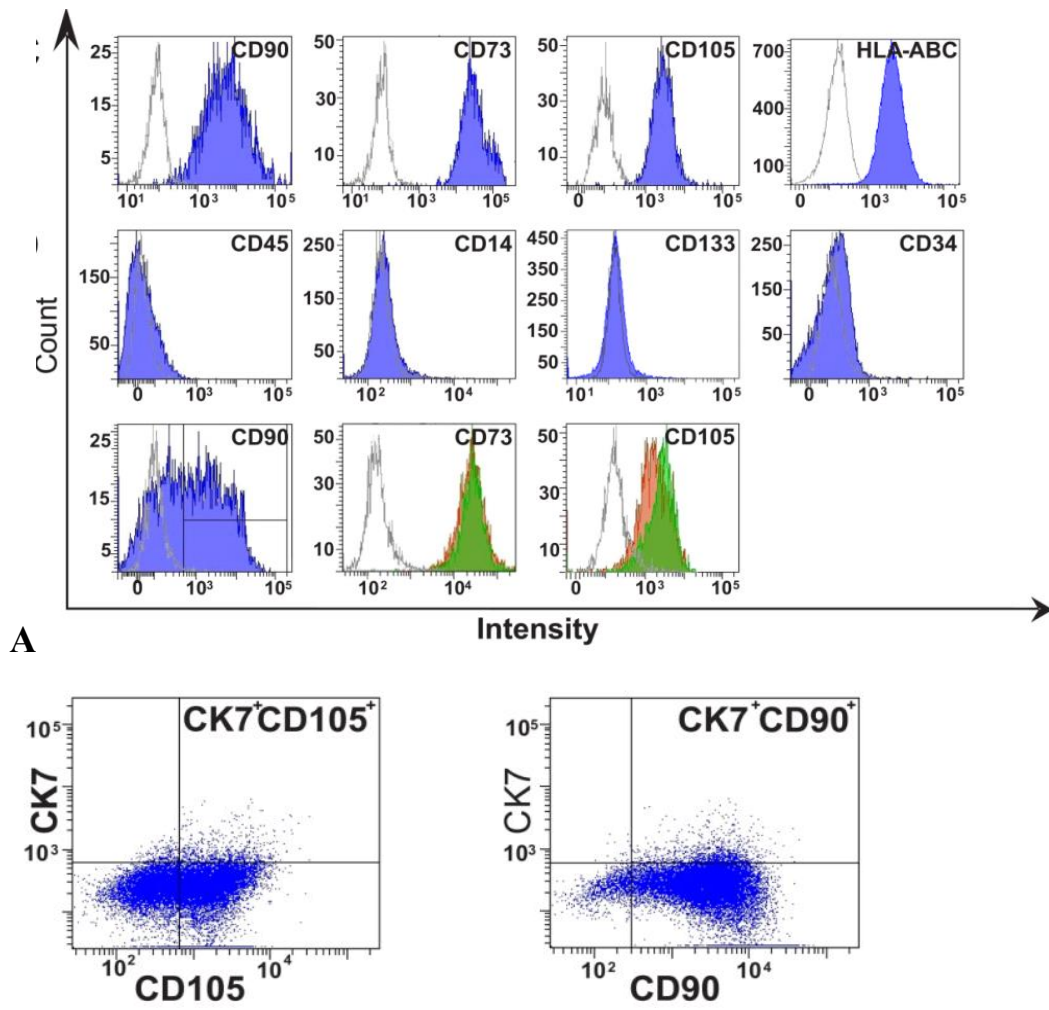


Рисунок 6.5 – Гістограми імунофенотипування ММСК плаценти людини в культурі *in vitro* за даними проточної цитометрії, пасаж 3. А – стовпчикові гістограми експресії маркерів CD90, CD73, CD105, HLA-ABC, CD34, CD14, CD45, CD133 (синій колір) та бімодальний характер експресії субпопуляцій CD90⁺ (червоний колір) та CD90⁻ (зелений колір) серед клітин, позитивних на CD73 та CD105. Б – dot-plot гістограми одночасної експресії маркерів CD90 або CD105 та цитокератину 7 (СК7). Програмне забезпечення BD FACSDiva 6.1.2.

Продемонстровано, що культури ММСК плаценти людини слабо експресують цитокератин 7 (СК7). Незважаючи на те, що СК7⁺ цитотрофобласт не експресує CD90, більшість СК7⁺ ММСК (n = 4) були позитивними на CD90. Також встановлено, що обидва маркери CD90 та CD105 присутні на поверхні СК7⁺ клітин (рис. 6.5 Б).

Вже з ранніх пасажів у динаміці культивування ММСК плаценти людини, на досить високому рівні експресували не лише CD90, а й глікопротеїн клітинної адгезії CD44 і помірно – інтегрин β 1 (CD29), за стабільної відсутності експресії панлейкоцитарного маркера CD45 (рис. 6.6).

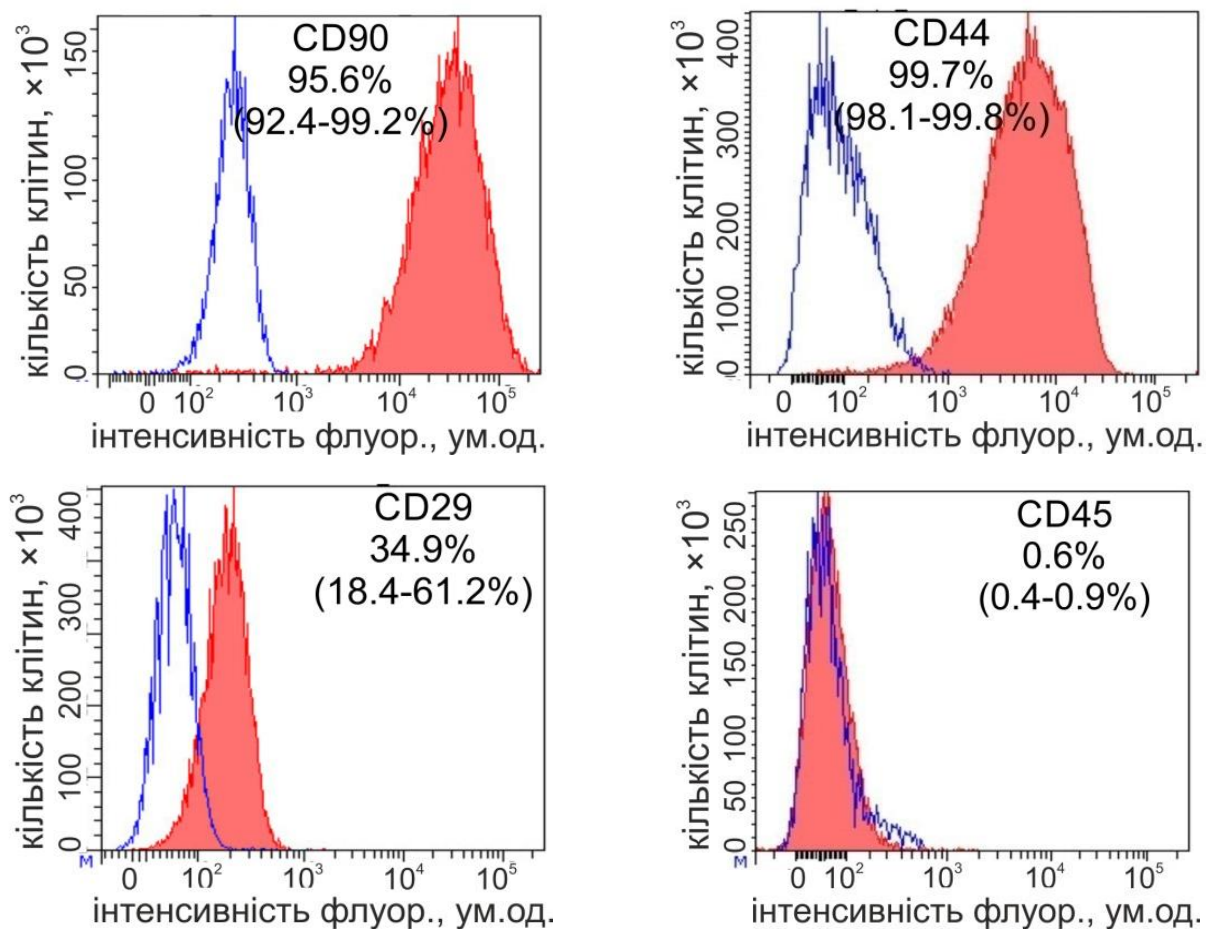


Рисунок 6.6 – Гістограми експресії поверхневих маркерів на ММСК плаценти людини за даними проточної цитометрії: суцільна заливка – інтенсивність флуоресценції після інкубації з відповідними антитілами, синій контур – фоновий рівень флуоресценції; n = 4. Програмне забезпечення BD FACSDiva 6.1.2.

Важливо зазначити, що такі фактори як умови транспортування, час зберігання та обробки первинного матеріалу, методика виділення клітин, включно з активністю і концентрацією ферментів та часом інкубації тканин, температура повітря та робочих розчинів, концентрація CO₂ та вологість у камері інкубатора, склад кріосередовища, питома швидкість заморожування для кріосховища, температура та час відтаювання на водяній бані при розморожуванні, температура, прискорення та тривалість центрифугування при відмиванні і навіть інтенсивність піпетування суспензії клітин можуть суттєво впливати на клітини, зменшуючи їхню життєздатність. Порушення проникності мембрани спричинює зміну форми клітини, руйнування та фрагментацію ядра, перерозподіл органел у цитоплазмі, що впливає на параметри прямого і бокового світлорозсіювання при імунофенотипуванні методом проточної цитометрії (рис. 6.7). Оскільки менш стійкі до зовнішніх умов популяції клітин гинуть раніше (наприклад, гранулоцити крові), це потребує додаткової корекції протоколу первинного гейтування клітин за розмірами та морфологією.

Аналогічні зауваження стосуються і зразків ММСК, як відразу після зняття з культуральної поверхні, так і розморожених після кріоконсервування. Пошкоджені клітини формують додаткову популяцію за параметрами прямого і бокового світлорозсіювання, яка відрізняється від нормальних за розмірами та морфологією, що може вводити оператора в оману щодо якісного складу досліджуваного зразка. При додаванні вітального барвника 7-AAD саме ці клітини будуть позитивними за його сигналом і можуть давати неспецифічні хибнопозитивні результати на інші маркери (рис. 6.8).

Окрім того, пошкодження структури мембран клітин негативно впливає на зв'язування моноклональних антитіл з рецепторами на її поверхні. Ці фактори в комплексі можуть стати причиною хибнопозитивних або хибнонегативних результатів подальшого імунофенотипування клітин (рис. 6.9). Саме тому при проточній цитометрії необхідним є попереднє визначення нежиттєздатних клітин та виключення їх з подальшого аналізу на маркери.

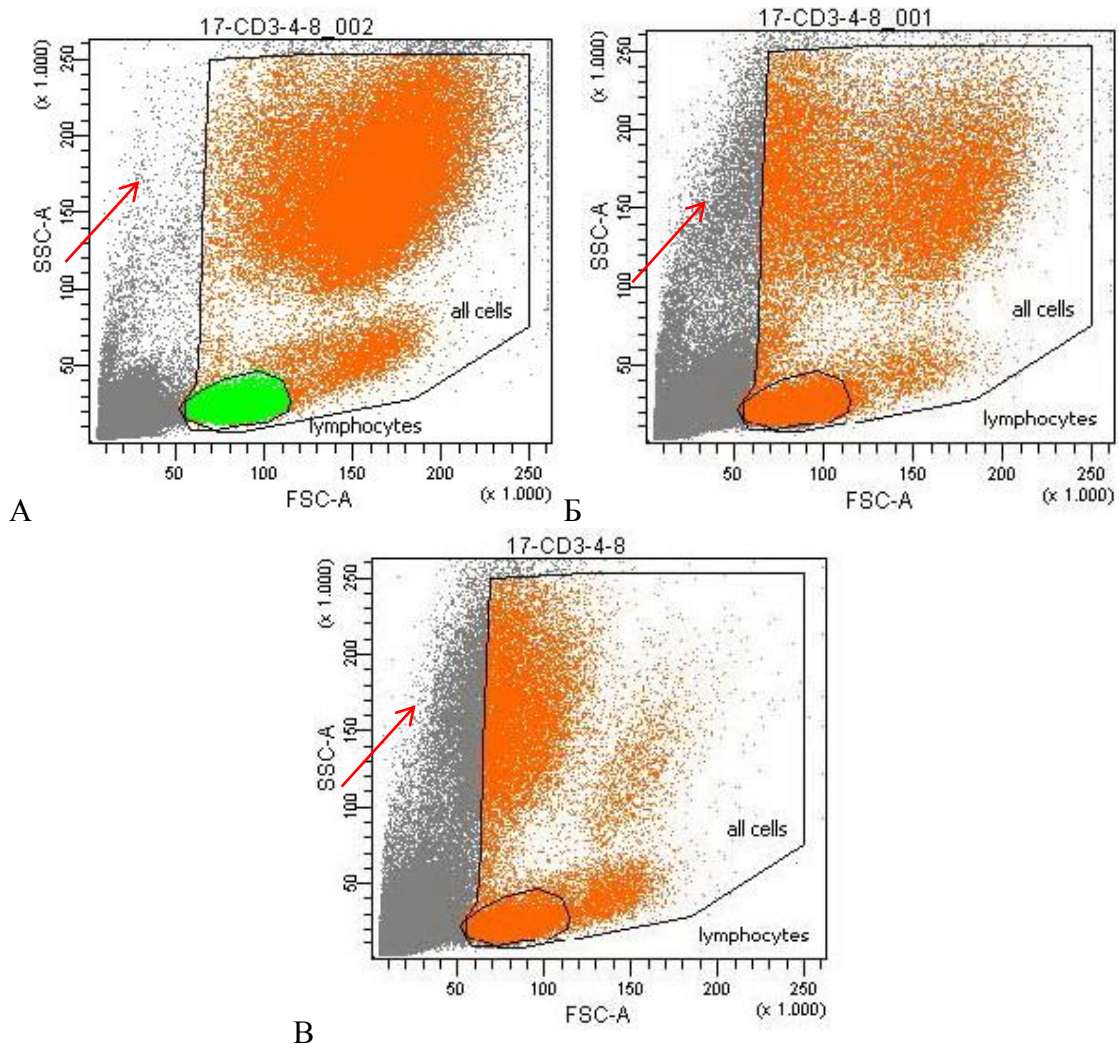


Рисунок 6.7 – Dot-plot гістограми фенотипування клітин крові методом проточної цитометрії за параметрами прямого (FSC) і бокового (SSC) світлорозсіювання з гейтуванням популяції лейкоцитів (all cells). А – нативний зразок; Б – через 24 год.; В – через 36 год. Стрілками вказано пошкоджені гранулоцити.

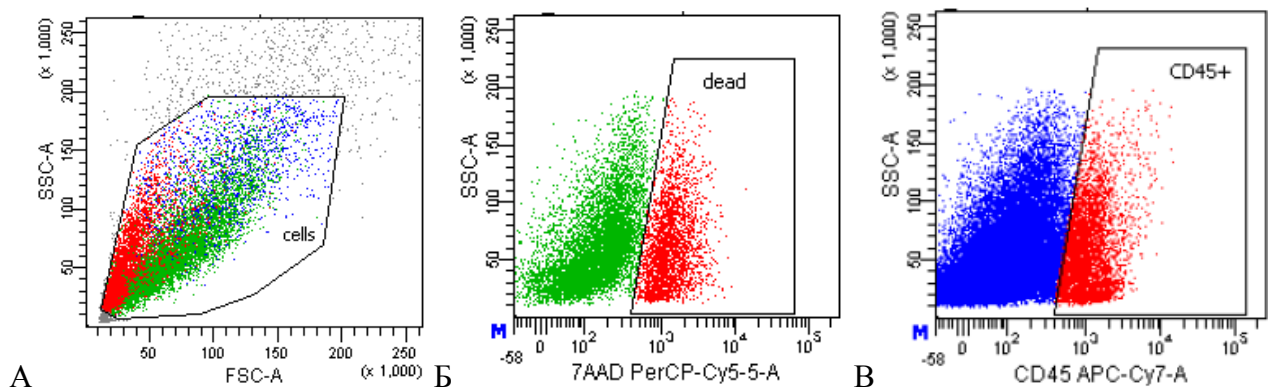


Рисунок 6.8 – Dot-plot гістограми фенотипування ММСК плаценти за параметрами прямого (FSC) і бокового (SSC) світлорозсіювання (А) та гейтування популяції нежиттєздатних клітин (dead cells, червоний колір) за 7-ААД (Б), яка дає хибнопозитивний сигнал на каналі маркера CD45 (D).

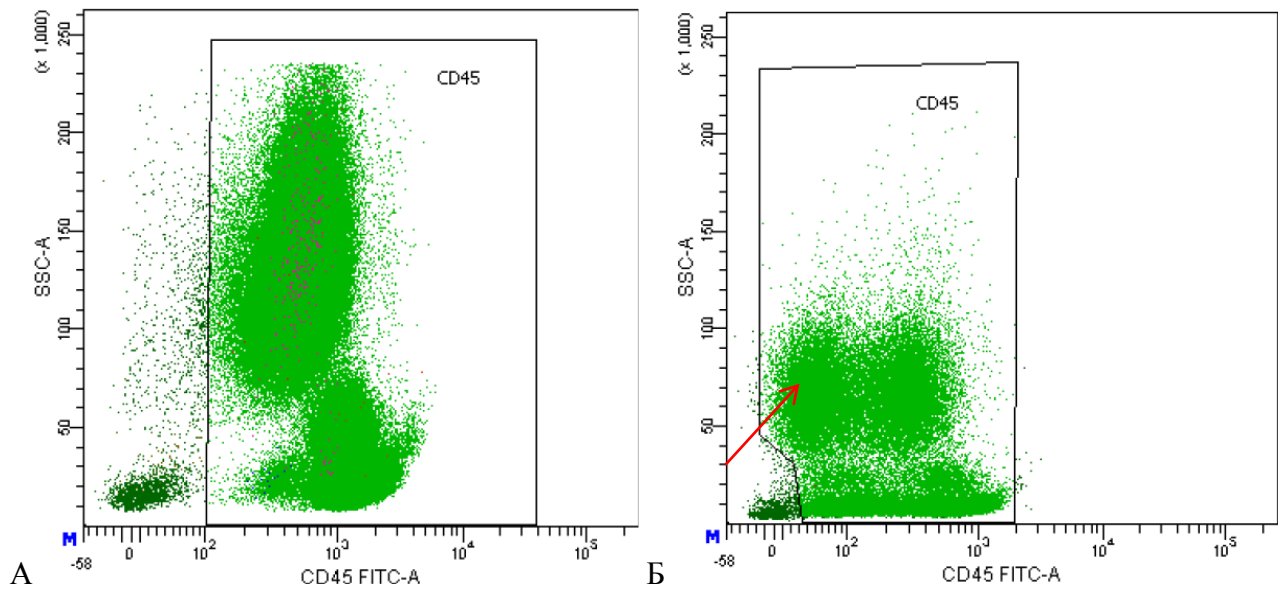


Рисунок 6.9 – Dot-plot гістограми фенотипування клітин крові на маркер CD45. А – нативний зразок в нормі; Б – через 36 год. Стрілкою вказано додаткову популяцію пошкоджених клітин з фенотипом CD45^{low}.

За допомогою імуноцитохімічного дослідження та конфокальної флуоресцентної мікроскопії встановлено, що ММСК плаценти людини протягом 6 пасажів експресували одночасно панцитокератин та віментин (рис. 6.10 А). Культури були гетерогенними за експресією мезенхімального гладком'язового α -актину α SMA (65 %) та епітеліальних цитокератинів СК18 (38 %) і СК19 (31 %) (рис. 6.10 Б). Частка клітин, одночасно позитивних на СК7 та віментин, достовірно зменшувалась з 37,6 % (26,6-49,4 %, $n = 6$) на першому до 13,4 % (2,5-31,1 %, $n = 6$) на третьому пасажі ($p < 0,05$) [308].

Продемонстровано, що ММСК плаценти людини протягом 6-ти пасажів були позитивними на хоріонічний гонадотропін, який ко-локалізувався з віментином, а також експресували транскрипційні фактори EOMES та CDX2, які залучені до розвитку трофобласту та мезодерми (рис. 6.10 А). Обидва транскрипційні фактори переважно локалізувалися в ядрах клітин, хоча спостерігали також слабкий сигнал в цитоплазмі окремих клітин. Водночас, було виявлено, що понад 80 % ММСК плаценти ($n = 5$) на 3-му пасажі експресували в ядрах ETS-споріднений білок ERG [310].

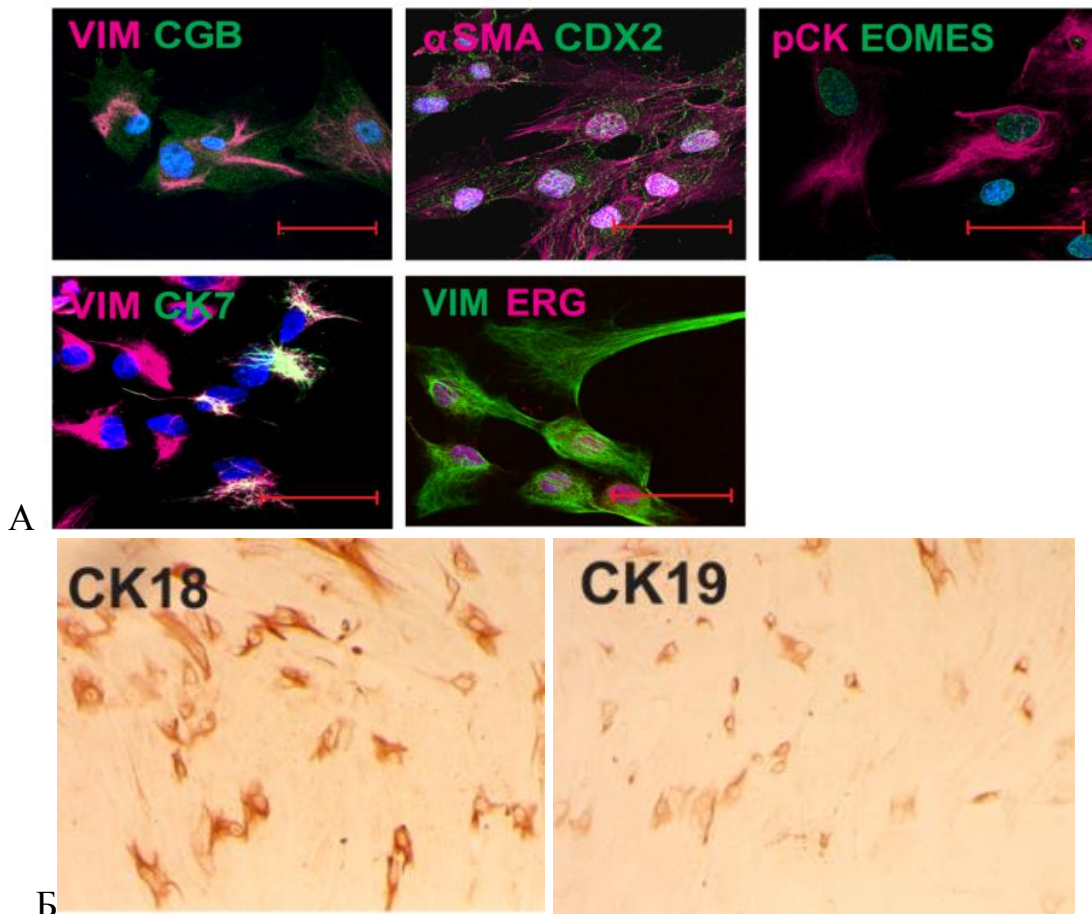


Рисунок 6.10 – Мікрофото цитопрепаратів ММСК плаценти людини в культурі *in vitro*, пасаж 3. Конфокальна флуоресцентна мікроскопія (А) та світлова мікроскопія (Б); шкала – 50 мкм. Імуноцитохімічне забарвлення на хоріонічний гонадотропін β (СGB, зелений колір), цитокератин 7 (СК7, зелений колір), панцитокератин (рСК, рожевий колір), віментин (VIM, рожевий колір), гладком'язовий актин альфа (α SMA, рожевий колір), транскрипційний фактор Caudal type homeobox 2 (CDX2, зелений колір), еомезодермін (EOMES, зелений колір), ETS-споріднений білок (ERG, рожевий колір), цитокератин 18 (СК18, коричневий колір) і цитокератин 19 (СК19, коричневий колір) [310].

При спрямованому адипогенному або остеогенному диференціюванні культур ММСК плаценти людини *in vitro* виявлено значну кількість ліпід-вмісних вакуоль у цитоплазмі клітин або поодинокі острівці кальцій-вмісного позаклітинного матриксу, відповідно, що було підтверджено специфічним забарвленням цитопрепаратів барвниками Oil Red O або Alizarin Red S (рис. 6.11 А). Додатково встановлено підвищення експресії специфічного гена

рецептора, що активується проліфераторами пероксисом гамма 2 (PPARG2), при адипогенному диференціюванні та помірне зниження експресії гена секретованого фосфопротеїну 1 (SPP1) – при остеогенному (рис. 6.11 Б) [310].

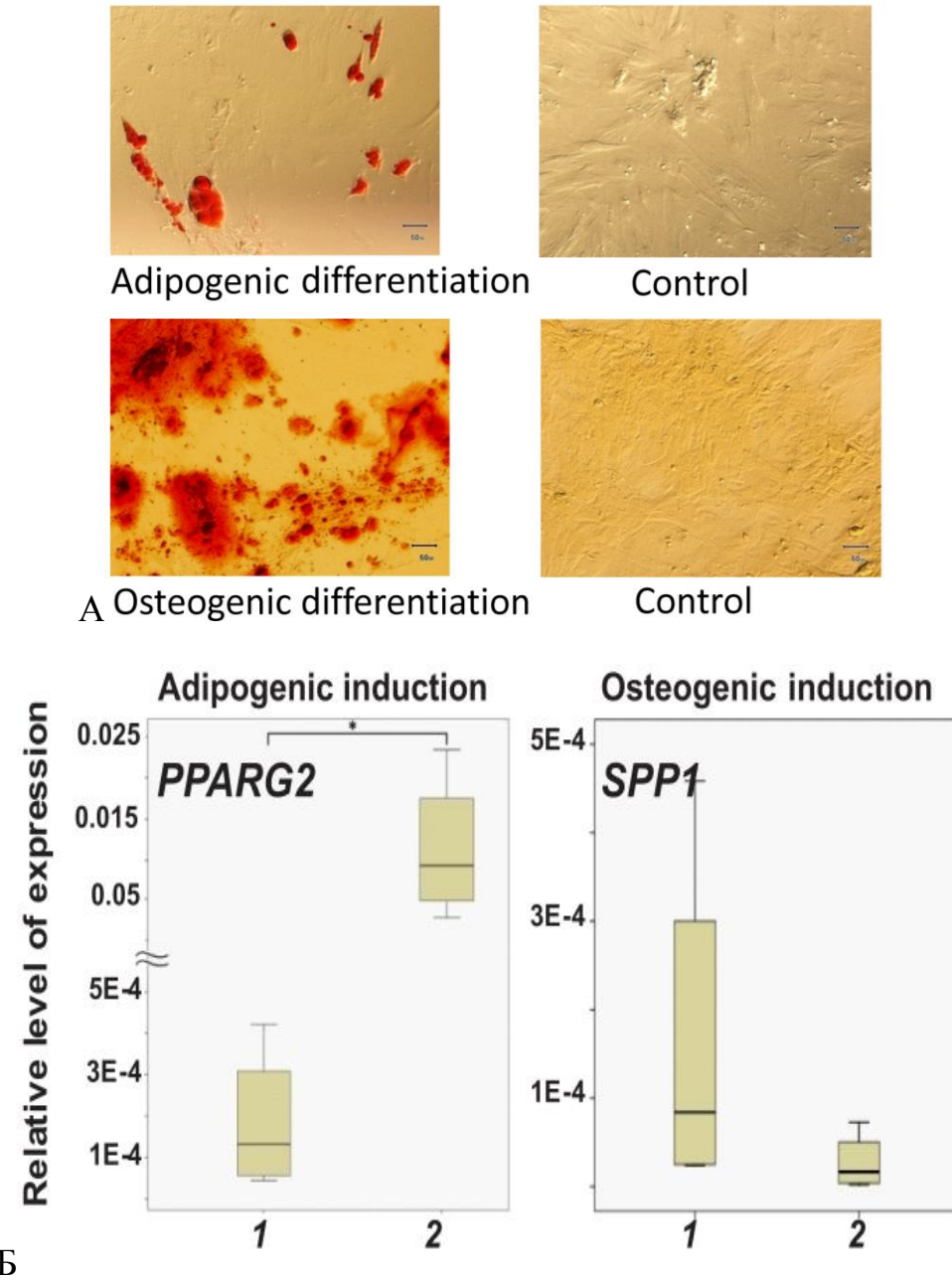


Рисунок 6.11 – Результати спрямованого диференціювання ММСК плаценти людини в адипогенному та остеогенному напрямі. А – мікрофото цитопрепаратів, забарвлених Oil Red O при адипогенному диференціюванні або Alizarin Red S при остеогенному, світлова мікроскопія, зб. $\times 50$. Б – блокові гістограми експресії генів PPARG2 та SPP1 за даними real-time PCR: 1 – контроль, 2 – спрямоване диференціювання; * – $p < 0,05$ ($n = 4$).

Загалом, на основі проведених спільних експериментальних досліджень було розроблено протоколи отримання культур ММСК плаценти мишей та людини, валідовано стандартні операційні процедури, що регламентують технологічні етапи виробництва клітинних препаратів ММСК плаценти людини для клінічного використання, зокрема: критерії первинного скринінгу донорів тканин фетоплацентарного походження, з урахуванням результатів їх лабораторного дослідження; ферментативна обробка фрагментів тканин й отримання первинної культури клітин з подальшим субкультивуванням та кріоконсервуванням. Під час аналізу даних встановлено як у культурі клітин, так і *in situ*, маркери високопроліферативної популяції ММСК з плаценти людини, описано їхній молекулярний профіль та підтверджено, що деякі фенотипові властивості цих клітин набуто під час культивування. Зокрема, експресія епітеліальних цитокератинів (pCK, CK18, CK19 та CK7), є унікальною для плацентарних ММСК і ця властивість набувається саме за умов культивування *in vitro*. Показано, що колонії ММСК плаценти можуть бути позитивними або негативними на цитокератин 7 (CK7), але лише CK7^{low} клони з низьким рівнем його експресії були високопроліферативними [310].

Присутність CK7⁺ та CD90⁺ клітин, виділених з нативної та кріоконсервованої тканини плаценти, вказує на можливе виникнення цієї популяції внаслідок епітеліально-мезенхімальної трансформації клітин трофобласту. Водночас, за допомогою цитогенетичного аналізу встановлено, що плацентарні ММСК плодового походження зберігали нормальний каріотип, що свідчить про стабільність їхнього геному в умовах активної проліферації в культурі *in vitro*.

Для проведення подальших клінічних досліджень було розроблено критерії контролю якості клітинних препаратів з урахуванням міжнародних рекомендацій, стандартів та директив Європейської комісії на основі оцінки їх життєздатності, проліферативного потенціалу та мультипараметричного імунофенотипування методом проточної цитометрії.

6.3 Доклінічна оцінка регенеративних ефектів ММСК плаценти на моделі ішемічного пошкодження міокарда в мишей

На початковому етапі нами було розроблено та валідовано модель ізопротеренол-індукованої кардіоміопатії в мишей. Ізопротеренол, як неселективний β -адреноміметик, проявляє низку виражених ефектів на серце завдяки активації β_1 -адренорецепторів. Зокрема, позитивний хронотропний ефект проявлявся в достовірному зростанні частоти серцевих скорочень за даними ЕКГ через 3 тиж. після початку введення препарату (табл. 6.1). Проте, вже через 7 тиж. дещо підвищені значення цього показника були не достовірними, що можна пояснити виснаженням компенсаторних резервів міокарда, спрямованих на підтримання кровотоку на належному рівні завдяки більш частим скороченням серця.

Таблиця 6.1 – Частота серцевих скорочень та тривалість комплексу QRS у мишей на початку експерименту та після моделювання кардіоміопатії ($M \pm \sigma$).

	На початку експерименту	Через 3 тиж. після моделювання	Через 7 тиж. після моделювання
Частота серцевих скорочень, уд./хв	402 \pm 18	464 \pm 21*	429 \pm 27
Тривалість комплексу QRS, сек	0,035 \pm 0,007	0,055 \pm 0,007*	0,053 \pm 0,016*

Примітка: * – $p < 0,05$ у порівнянні з показниками на початку експерименту.

У тварин контрольної групи у всі строки спостереження та у тварин дослідної групи до введення ізопротеренолу на електрокардіограмах відмічали правильний синусовий ритм з нормальними комплексами QRS та локалізацією сегментів ST на ізолінії (рис. 6.12). Проте, при аналізі електрокардіограм у тварин із моделюванням кардіоміопатії було виявлено низку ознак, що свідчили про порушення провідності збудження на різних рівнях провідної системи серця, а також про ішемію міокарда (табл. 6.2).

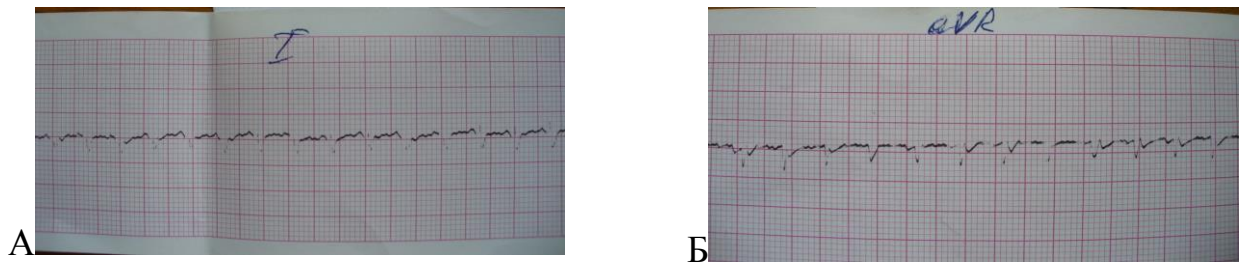


Рисунок 6.12 – Електрокардіограма миші до моделювання кардіоміопатії. Відведення I (А) та aVR (Б). Ритм синусовий, правильний, нормальні комплекси QRS, ЧСС=375 уд/хв.

Таблиця 6.2 – Порівняльна характеристика вираженості електрокардіографічних ознак у піддослідних мишей.

ЕКГ ознака	Контрольна група	Ізопротеренол-індукована модель
Ритм синусовий	+	+
Тахікардія	–	+
Розширення комплексу QRS	–	+
Зазубреність зубця R	±	±
Розщеплення комплексу QRS	–	+
Внутрішньошлуночкова блокада	–	+
Електрична альтернація комплексу QRS	–	+
Пізній зубець R	–	+
Шлуночкові екстрасистоли	–	+
Вольтаж зубців занижений	–	±
Елевація сегмента ST	–	+
Депресія сегмента ST	–	+
Негативний зубець T	–	+

Через 3 та 7 тиж. після введення ізопротеренолу в піддослідних тварин відмічено достовірне розширення комплексів QRS та їх електричну альтернацію (рис. 6.13). Це свідчить про порушення проведення збудження в шлуночках, що при зростанні загальної частоти серцевих скорочень негативно позначається на насосній функції серця та забезпеченні усіх органів кров'ю. Саме такі патофізіологічні зміни визначають клінічну картину перебігу гіпертрофічної та ішемічної кардіоміопатії в людей. Від дефіциту кисню страждає також і сам серцевий м'яз, що було підтверджено такими ознаками, як депресія сегменту ST –

один з ключових маркерів перевантаження міокарда та його ішемії. При цьому незначна елевация ST у деяких тварин може бути наслідком тахікардії, спричиненої ізопротеренолом. Зміщення електричної осі серця мишей вліво особливо чітко простежувалось через 7 тижнів після моделювання кардіоміопатії, що вказує на компенсаторну гіпертрофію лівих відділів серця внаслідок позитивного хронотропного ефекту ізопротеренолу.

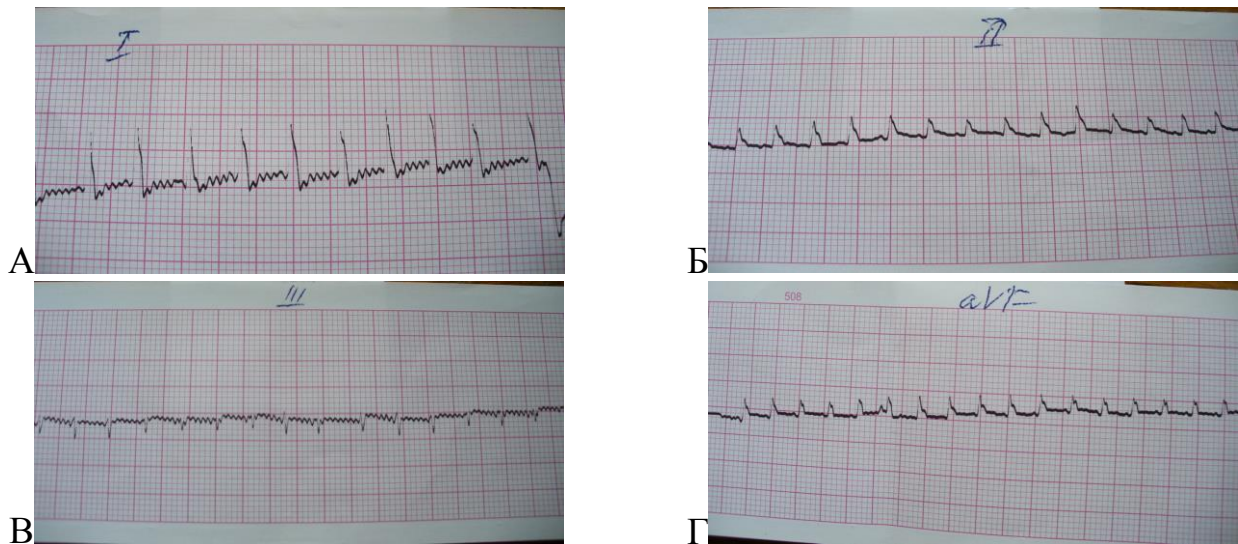


Рисунок 6.13 – Електрокардіограми мишей через 7 тиж. після моделювання кардіоміопатії. А) відведення I: розширення і деформація комплексів QRS, електрична альтернація комплексів QRS, депресія ST, шлуночкова екстрасистола. Б) відведення II: розширення і деформація комплексів QRS, електрична альтернація комплексів QRS, формування кривої ST. В) відведення III: шлуночкова екстрасистола, електрична альтернація комплексів QRS, ЧСС = 430 уд/хв. Г) відведення aVF: передсердна екстрасистола, розширення і деформація комплексів QRS, ЧСС = 500 уд/хв.

Ще одним проявом порушення генерації та проведення збудження в міокарді мишей при моделюванні кардіоміопатії були екстрасистоли з різним рівнем ектопічних вогнищ – як на рівні передсердь, так і шлуночків. Шлуночкові екстрасистоли з розширенням і деформацією комплексу QRS супроводжувались типовою повною компенсаторною паузою (рис. 6.30 В). Електрична альтернація шлуночкових комплексів проявлялась у чергуванні комплексів QRS різної тривалості зі зміною амплітуди зубця R.

Отже, за допомогою інструментального дослідження було підтверджено низку електрокардіографічних ознак, характерних для стійкого хронічного пошкодження міокарда з гіпертрофією та ішемією його окремих відділів, подібних до тих, що мають місце при гіпертрофічній та ішемічній кардіоміопатії в людей. У ранні строки після введення ізопротеренолу домінували ефекти, обумовлені тахікардією, у віддалені строки – прояви ішемії міокарда.

При проведенні функціонального тесту визначення толерантності до фізичного навантаження в мишей з моделлю кардіоміопатії було встановлено достовірне зменшення як тривалості первинного активного плавання до першої зупинки тварин, так і часу загального форсованого плавання в порівнянні з тваринами контрольної групи та тваринами перед введенням ізопротеренолу (рис. 6.14).

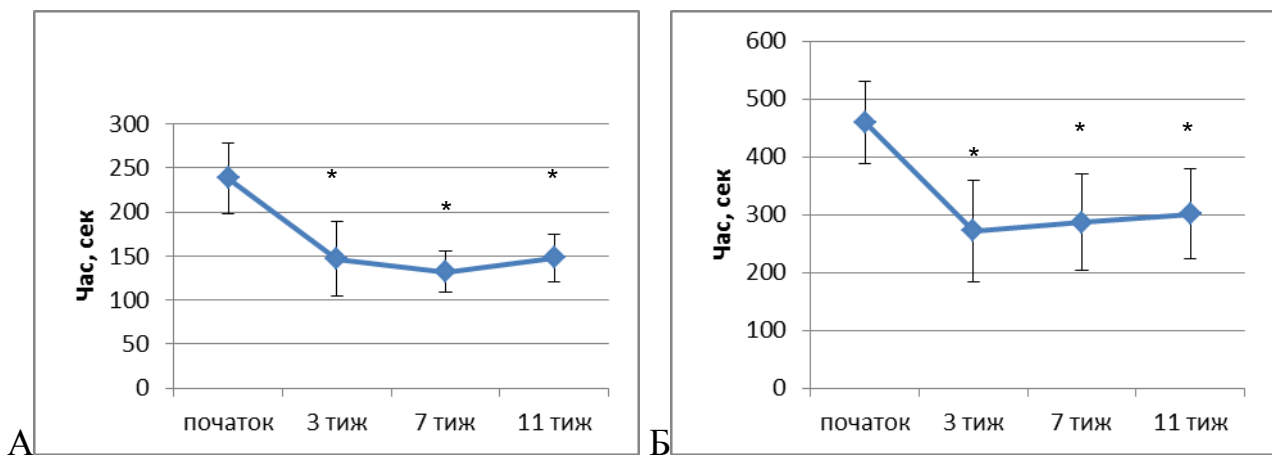


Рисунок 6.14 – Гістограми зміни тривалості первинного активного плавання (А) та загального часу примусового плавання (Б) у мишей з моделлю кардіоміопатії в динаміці (n = 12), М ± σ.

Примітка: * – $p < 0,05$ у порівнянні з показниками на початку експерименту.

Нижчі показники часу першої зупинки тварин для відпочинку вказують на більш раннє настання в них втоми при виконанні фізичного навантаження, що підтверджується і зменшенням загального часу примусового плавання, як маркера зниження толерантності до тривалого навантаження. Зазначені зміни були зафіксовані вже на 3-му тижні після моделювання кардіоміопатії та стійко зберігались на 7-му та 11-му тижнях, що співвідноситься з результатами електрокардіографії в ранні та віддалені строки після введення ізопротеренолу.

При гістологічному дослідженні міокарда тварин контрольної групи ($n = 4$) встановлено типову морфологічну картину нормальної тканини серця: чітко виражені волокна без набряку інтерстицію, ядра кардіоміоцитів містять еухроматин і невелике ядерце, у цитоплазмі видимі міофібрили. Водночас, у тварин із моделюванням кардіоміопатії на гістопрепаратах як у ранні (3-й тиж.), так і у віддалені строки (7-й тиж.) після введення ізопротеренолу відмічали чіткі ознаки пошкодження міокарда, які прогресували в динаміці.

Хоча в ядрах кардіоміоцитів чітко візуалізували ядерця і гетерохроматин, проте відмічали значний набряк цитоплазми, периваскулярний набряк, інфільтрацію інтерстицію фібробластами і макрофагами, геморагії та кровонаповнення капілярів, що вказує на супутні при ішемічному пошкодженні запальні зміни (рис. 6.15).

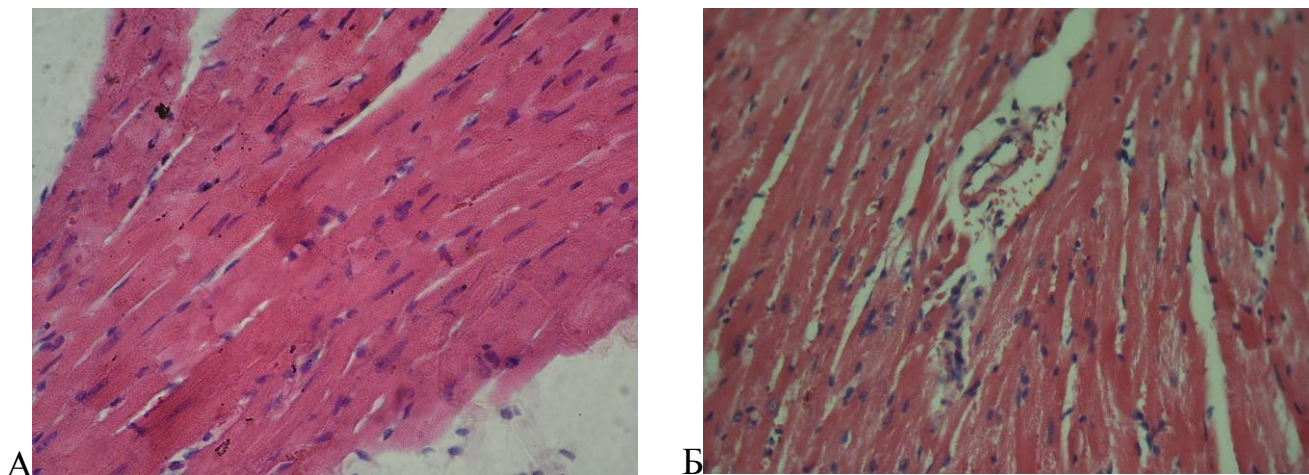


Рисунок 6.15 – Мікрофотографії гістопрепаратів міокарда миші, забарвлення гематоксилін-еозином: А – нормальні тварини; Б – через 7 тиж. після моделювання кардіоміопатії (опис у тексті). Світлова мікроскопія, зб. $\times 100$.

Додатково досліджено вікові особливості моделювання кардіоміопатії в мишей. Зокрема, продемонстровано, що при введенні ізопротеренолу через 4 тиж. після останньої ін'єкції відбувалося суттєве збільшення співвідношення маси серця до маси тіла. У молодих тварин цей показник збільшувався на 33 % ($p < 0,05$), порівнюючи з контрольними, а в старих – на 11 %. Збільшення маси серця під впливом ізопротеренолу, більш виражене в молодих мишей,

порівнюючи зі старими, пов'язано з розростанням сполучної тканини на місці некротизованих кардіоміоцитів та гіпертрофією клітин, які залишилися, що підтверджено гістологічними дослідженнями.

При моделюванні кардіоміопатії реакція сполучної тканини виявилася більш демонстративною в молодих тварин, ніж у старих. У молодих вона проявлялася у вигляді формування великих вогнищ новоутвореної грануляційної тканини, у старих – волокнистої сполучної тканини з розвитком фіброзу. Застосування ізопротеренолу викликало структурні зміни в міокарді, цілком відповідні кардіоміопатії. Воно призводило до розвитку гіпертрофії кардіоміоцитів та їхніх ядер, а також міоцитів стінок артеріол, більш вираженої в молодих тварин. Також відбувалося формування вогнищ ушкодження, переважно в стінці лівого шлуночка, що мало більш виражений характер у старих мишей.

При моделюванні кардіоміопатії у вогнищах ушкодження серця спостерігалось порушення архітекtonіки міокарда та розвиток деструктивних та дистрофічних процесів (контрактура, вакуолізація, набряк), аж до некробіозу та некрозу клітин, з наслідком в петрифікацію та організацію. У старих тварин ступінь ушкодження виявився більшим, значно частіше формувалися осередки деструкції та кальцифікації.

На ультраструктурному рівні пошкоджуючий ефект ізопротеренолу проявлявся дистрофічними та деструктивними порушеннями кардіоміоцитів: внутрішньоклітинним набряком, контрактурними ушкодженнями міофібрил, накопиченням ліпофусцину в цитоплазмі. У старих тварин ці процеси були виражені більшою мірою, ніж у молодих, і призводили до більш глибоких ушкоджень міокарда [5].

Отже, було отримано ефективну та стійку модель пошкодження міокарда в мишей, що супроводжується гіпертрофією та ішемією міокарда за даними електрокардіографічного та гістологічного досліджень, а також зниженням толерантності до фізичного навантаження в піддослідних тварин. Ця модель може бути використана при оцінці терапевтичних ефектів фармакологічних засобів або новітніх біотехнологічних методів лікування патології серцево-судинної системи.

Додатково для порівняння розроблено модель локального термічного пошкодження міокарда, яке було змодельовано самцям мишей лінії FVB віком 4 міс. (пат. України № 66164). Через 1 годину на гістологічних препаратах верхівки серця виявлено набряк і фрагментацію міофібрил. В саркоплазмі кардіоміоцитів вздовж міофібрил та в цитоплазмі ендотеліоцитів судин виявлено еозинофільні включення, які на світлооптичному рівні мають темно-коричневе забарвлення. Поява цих гранул може свідчити про коагуляцію протеїнів саркотубулярного ретикулуму. Виявлено вакуолізацію ядер кардіоміоцитів та лімфоцитарну інфільтрацію тканини. В ділянці основи серця вказані ознаки відсутні.

Через 14 діб після пошкодження зменшується кількість мікроевезикул, але зберігається фрагментація міофібрил та їх гіпертрофія. Виявлено макрофагально-лімфоцитарну інфільтрацію тканин та адгезію еритроцитів, спостерігаються ділянки еозинофілії кардіоміоцитів. На електронограмах в більшості ядер кардіоміоцитів виявлено набряк каріоплазми і конденсацію хроматину. Спостерігалась гомогенізація хроматину і каріорексис. Перинуклеарний простір розширений, саркотубулярна сітка утворювала вакуолі різного діаметру. У деяких мітохондрій кристи гомогенізовані, у інших – відмічалось дихотомічне розгалуження крист. Виявлено мієліноподібні тільця, що свідчить про повну деструкцію мітохондрій. Контакти між кардіоміоцитами зруйновані, утворені порожнини заповненні білковими конгломератами. У просвіті капілярів і в перикапілярному просторі також спостерігали білкові конгломерати. Ендотеліоцити і перицити з набряклою, іноді вакуолізованою цитоплазмою. Плазматична мембрана ендотеліоцитів утворює екструзії.

Через 28 діб після моделювання пошкодження на гістологічних препаратах міокарда тварин зберігалась фрагментація міофібрил. Виявлено еозинофільні кардіоміоцити та мікроевезикули в них. Вказані ознаки свідчать про збереження локальних проявів кардіоміопатії. Отже, розроблений спосіб зручний та надійний у проведенні, забезпечує створення локального пошкодження міокарда однакового розміру та глибини, не викликає значного некрозу кардіоміоцитів та не потребує складних хірургічних маніпуляцій і обладнання для вентиляції легень.

У нашому експериментальному спільному дослідженні з Квітницькою-Рижовою Т. Ю. та ін. було продемонстровано, що трансплантовані мишам з ізопротеренол-індукованою кардіоміопатією мононуклеари кісткового мозку чинять нормалізуючий вплив на структуру кардіоміоцитів та капілярів, який більшою мірою був виражений у молодих тварин. У них відзначали зниження індексу маси серця до маси тіла майже до нормального показника, були менш виражені дистрофічні та некротичні зміни в кардіоміоцитах, а також спостерігали зменшення площі вогнищ ушкодження. Крім того, переважно в молодих тварин відмічено зменшення рівня апоптозу – апоптотичний індекс знижувався в них майже вдвічі, в той час як у старих мишей практично не змінювався [5].

В подальших експериментах для доклінічної оцінки перспектив та безпеки застосування ММСК плаценти людини було досліджено їхні терапевтичні ефекти в мишей з моделлю ізопротеренол-індукованої кардіоміопатії в ранні (48 год) та віддалені (4 тиж) строки. Нативні культивовані або кріоконсервовані клітини трансплантували через 21 добу після першого введення ізопротеренолу.

У суспензії дисоційованих зразків з тканини міокарда мишей за допомогою проточної цитометрії через 48 год після трансплантації нативних культивованих клітин плаценти виявлено присутність донорських клітин за експресією HLA людини у відносній кількості 0,0025 %, а через 4 тиж. після трансплантації – 0,0056 %. При трансплантації кріоконсервованих ММСК плаценти ці показники становили 0,004 % та 0,0036 % у відповідні строки. Присутність мітохондрій донорських клітин також була підтверджена за допомогою імуногістохімічного дослідження гістологічних зрізів міокарда (рис. 6.16) [308].

На гістологічних препаратах через 48 год після трансплантації нативних культивованих ММСК плаценти кардіоміоцити містили ядра з великою кількістю гетерохроматину та набряклого цитоплазмом. У багатьох кардіоміоцитах цитоплазма була еозинофільна, спостерігали набряк інтерстиційного простору (рис. 6.17 А). У периваскулярному просторі були присутні нечисленні лімфоцити і фібробласти (рис. 6.17 Б).

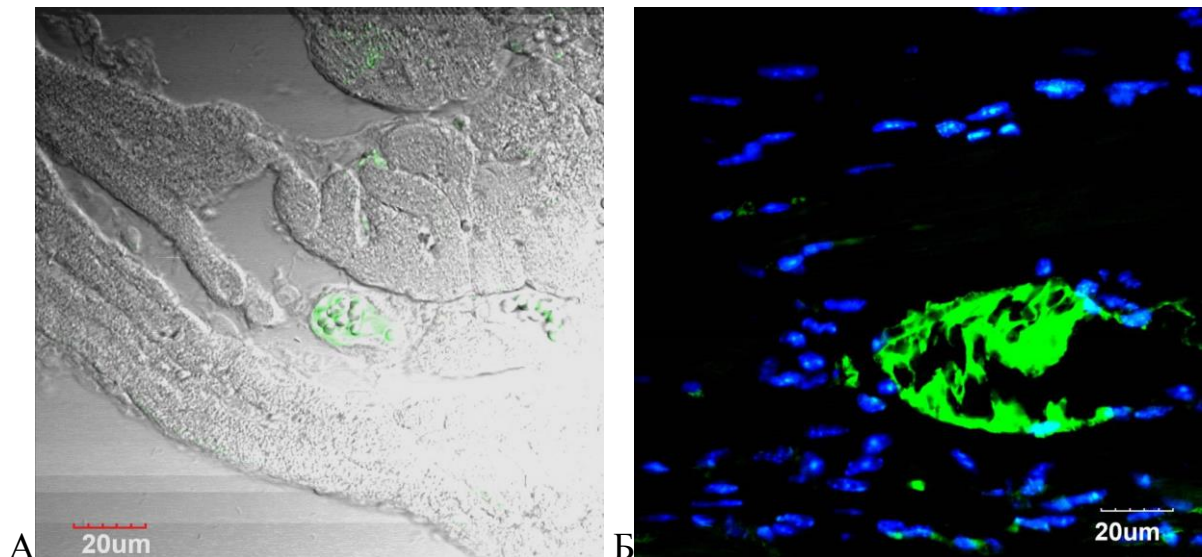


Рисунок 6.16 – Мікрофото гістологічних зрізів міокарда миші з моделлю кардіоміопатії через 48 год (А) та 4 тиж. (Б) після трансплантації ММСК плаценти. Імуногістохімічне забарвлення на мітохондрії трансплантованих клітин людини (зелений колір), ядра забарвлені DAPI (синій колір). Комбінована флуоресцентна мікроскопія з фазовим контрастом, шкала – 20 мкм.

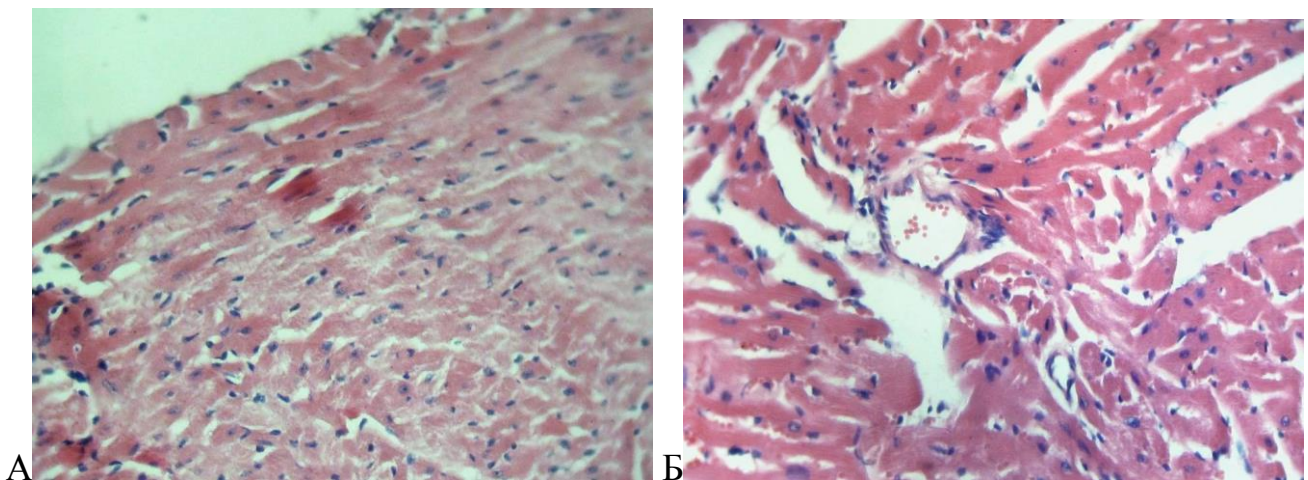


Рисунок 6.17 – Мікрофото гістологічних зрізів міокарда миші через 23 доби після моделювання кардіоміопатії та 48 год після трансплантації нативних ММСК плаценти (опис у тексті). Забарвлення гематоксилін-еозином, світлова мікроскопія, зб. $\times 400$.

Через 48 год після трансплантації кріоконсервованих ММСК плаценти в більшості кардіоміоцитів спостерігали еозинофілію цитоплазми, деструкцію і розриви ланцюжків кардіоміоцитів по вставних дисках (рис. 6.18 А).

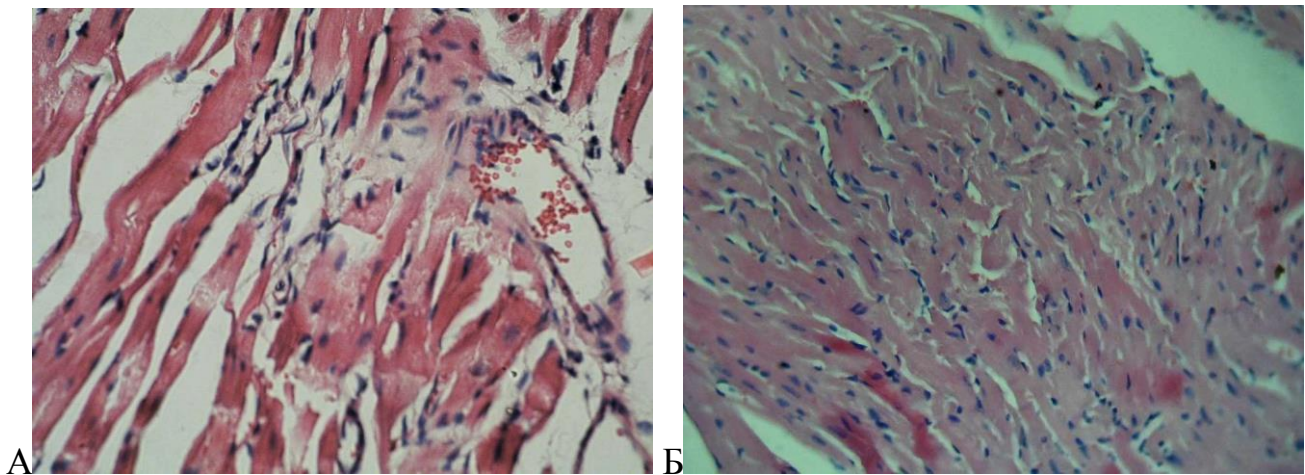


Рисунок 6.18 – Мікрофото гістологічних зрізів міокарда миші через 23 доби після моделювання кардіоміопатії та 48 год після трансплантації кріоконсервованих ММСК плаценти (опис у тексті). Забарвлення гематоксилін-еозином. Світлова мікроскопія, зб. $\times 400$.

Ядра окремих кардіоміоцитів гіпертрофовані з великою кількістю гетерохроматину. Також відмічено звивистість ланцюжків кардіоміоцитів, а в периваскулярному просторі виявлено незначну лімфоцитарну інфільтрацію і невелику кількість фібробластів (рис. 6.18 Б). Загалом, не виявлено периваскулярного набряку, геморагій і вираженої лімфоцитарної інфільтрації тканини, проте ще зберігались ознаки пошкодження міокарда, типові для змодельованої кардіоміопатії.

На гістологічних препаратах міокарда тварин контрольної групи через 4 тиж. після введення середовища-носія клітин (7 тиж. після моделювання кардіоміопатії) кардіоміоцити містили ядра з великою кількістю гетерохроматину, набряк цитоплазми досить виражений. Спостерігали еозинофілія окремих кардіоміоцитів з ознаками апоптозу, набряк інтерстиційного простору і периваскулярний набряк. Геморагії не виявлені, але було зафіксовано адгезію еритроцитів до стінок судин. У периваскулярному просторі були розташовані численні лімфоцити і невелика кількість фібробластів (рис. 6.19 А). Тобто, у віддалені строки після моделювання кардіоміопатії в мишей зберігаються суттєві морфологічні ознаки пошкодження міокарда.

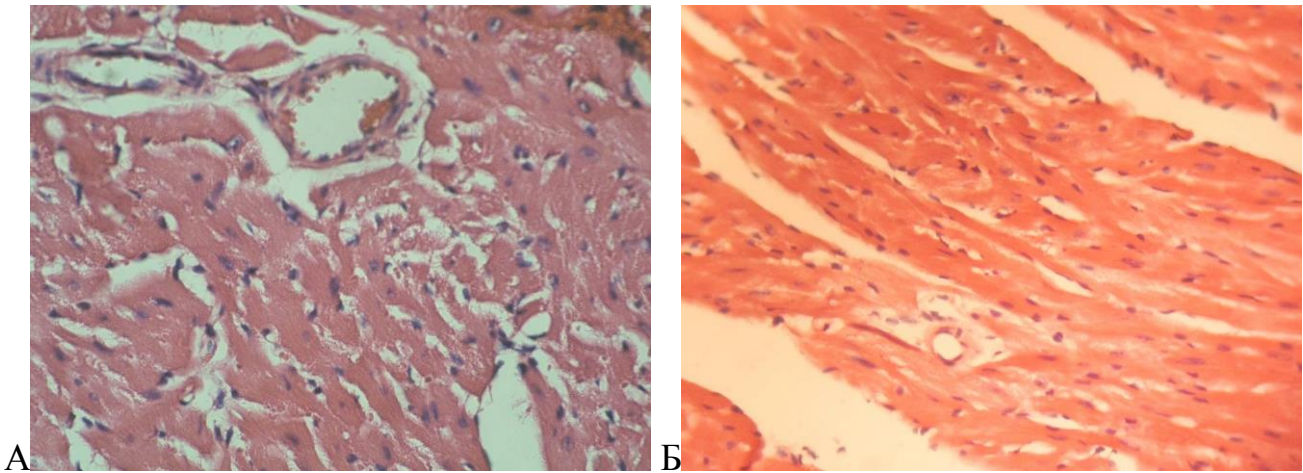


Рисунок 6.19 – Мікрофото гістологічних зрізів міокарда миші через 7 тиж. після моделювання кардіоміопатії (А) та 4 тиж. після трансплантації кріоконсервованих ММСК плаценти (Б) (опис у тексті). Забарвлення гематоксилін-еозином. Світлова мікроскопія, зб. $\times 400$.

Водночас, через 4 тиж. після трансплантації кріоконсервованих ММСК плаценти (7 тиж. після моделювання пошкодження серця) у тканині міокарда мишей лише в поодиноких кардіоміоцитів спостерігали помірний набряк, порушення орієнтації міофібрил та їх розволокнення. Була виявлена загальна еозинофілія кардіоміоцитів, ядра в більшості з них з великою кількістю гетерохроматину, проте без набряку. Одиначні ядра кардіоміоцитів містили велике ядерце і світлу нуклеоплазму. Периваскулярний набряк не виражений, також були відсутні лімфоцитарна інфільтрація, геморагії, і кровонаповнення мікроциркуляторного русла. У периваскулярному просторі розташовувались одиничні фібробласти і лімфоцити (рис. 6.19 Б).

У гістологічних препаратах міокарда мишей через 4 тиж. після трансплантації нативних ММСК плаценти (7 тиж. після моделювання пошкодження серця) більшість кардіоміоцитів також були еозинофільні з гомогенною цитоплазмою, ядра містили значну кількість гетерохроматину, а в периваскулярному просторі виявляли поодинокі лімфоцити. Лише для поодиноких кардіоміоцитів характерною була звивистість форми, гіпертрофія ядер, набряк і еозинофілія цитоплазми без виражених ознак апоптозу (рис. 6.20 А).

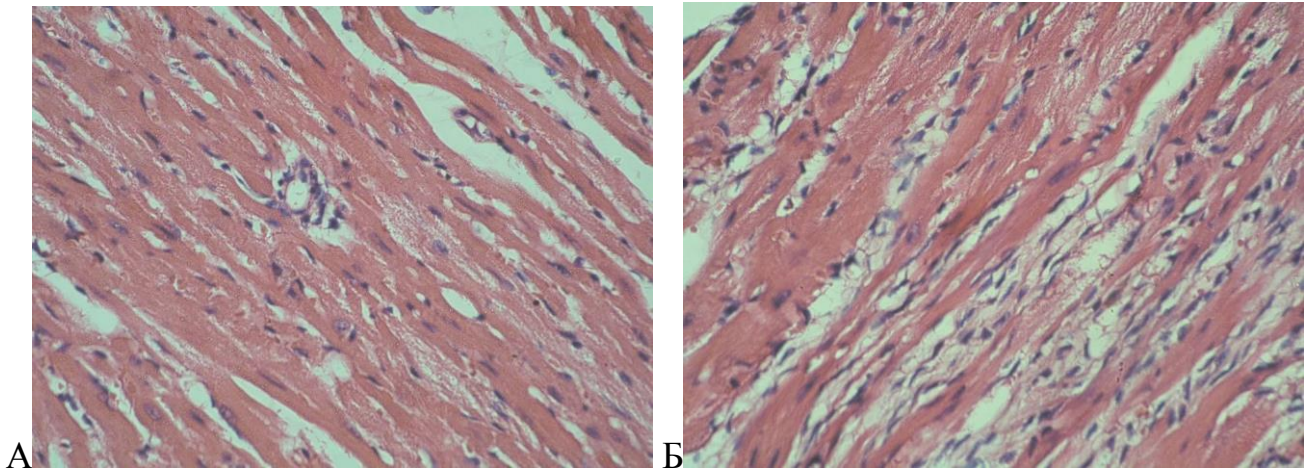


Рисунок 6.20 – Мікрофото гістологічних зрізів міокарда миші через 7 тиж. після моделювання кардіоміопатії та 4 тиж. після трансплантації нативних ММСК плаценти (опис у тексті). Забарвлення гематоксилін-еозином. Світлова мікроскопія, зб. $\times 400$.

Цікавим був факт виявлення в інтерстиції міокарда осередків скупчення значної кількості фібробластоподібних клітин, які синтезували навколо себе пухкий екстрацелюлярний матрикс, на відміну від фіброзу у тварин контрольної групи. У цих ділянках не виявлено периваскулярного набряку, кровонаповнення судин і геморагій, що свідчить про відсутність запальної реакції (рис. 6.20 Б).

Загалом, дані гістологічного дослідження вказують на суттєве покращення структурних морфологічних параметрів міокарда у віддалені строки після трансплантації як нативних, так і кріоконсервованих ММСК плаценти людини, у той час як у контрольній групі зберігались ознаки ішемічного пошкодження.

Для оцінки впливу ММСК плаценти на функціональні показники міокарда в мишей було проведено електрокардіографічне дослідження. На ЕКГ у контрольній групі тварин, яким вводили середовище-носії клітин, зберігались ознаки змодельованого пошкодження міокарда, що проявлялось у підвищенні частоти серцевих скорочень, розширенні комплексу QRS, деформації рубця R та порушенні збудливості у формі шлуночкових екстрасистол.

Середні значення частоти серцевих скорочень та ширини комплексу QRS за даними електрокардіографії в групах мишей, які отримували трансплантацію нативних або кріоконсервованих ММСК плаценти людини, а також контрольних тварин наведені в таблицях 6.3-6.5, відповідно.

Таблиця 6.3 – Аналіз параметрів ЕКГ у мишей із змодельованим пошкодженням міокарда, яким трансплантовано нативні ММСК плаценти (n = 6).

	На початку експерименту (n = 12)	Через 3 тиж після моделювання пошкодження	Через 4 тиж після трансплантації клітин
Частота серцевих скорочень, уд./хв	411 ± 31	543 ± 99*	464 ± 51
Ширина комплексу QRS, сек	0,043 ± 0,006	0,047 ± 0,012	0,055 ± 0,007*

Таблиця 6.4 – Аналіз параметрів ЕКГ у мишей із змодельованим пошкодженням міокарда, яким трансплантовано кріоконсервовані ММСК плаценти (n = 6).

	На початку експерименту (n = 12)	Через 3 тиж після моделювання пошкодження	Через 4 тиж після трансплантації клітин
Частота серцевих скорочень, уд./хв	411 ± 31	452 ± 41*	433 ± 58
Ширина комплексу QRS, сек	0,043 ± 0,006	0,053 ± 0,006*	0,051 ± 0,009

Таблиця 6.5 – Аналіз параметрів ЕКГ у мишей контрольної групи, яким введено носій клітин (n = 6).

	На початку експерименту (n = 6)	Через 3 тиж після моделювання пошкодження	Через 4 тиж після введення середовища-носія клітин
Частота серцевих скорочень, уд./хв	417 ± 118	500 ± 46*	484 ± 51*
Ширина комплексу QRS, сек	0,040 ± 0,004	0,045 ± 0,007	0,058 ± 0,003*

Примітки: * – $p \leq 0,05$ у порівнянні з даними на початку експерименту

У 2-х тварин, у яких після моделювання пошкодження на ЕКГ було зафіксовано появу деформації зубця R та екстрасистол, після трансплантації нативних ММСК деформація зубця R зберігалась, проте екстрасистол не виявлено. У 3 тварин, у яких після моделювання пошкодження на ЕКГ було зафіксовано появу деформації зубця R та передсердні екстрасистоли, після трансплантації кріоконсервованих ММСК також деформація зубця R зберігалась, проте екстрасистол також не виявлено.

В підсумку, на моделі ішемічного пошкодження серця в мишей за допомогою морфологічних та інструментальних методів продемонстровано високий регенеративний потенціал ММСК плаценти людини, який реалізується шляхом міграції стовбурових клітин в осередок пошкодження, пригнічення запалення, апоптозу, фіброзу, а також завдяки активації неоваскуляризації ішемізованої тканини міокарда.

Додатково у наших спільних дослідженнях з Lykhus O. та ін. продемонстровано, що ММСК з плаценти мишей та з Вартонових драглів пуповини людини, які були тестовані нами за розробленими критеріями якості, як і ММСК з жирової тканини, здатні зменшувати прояви LPS-індукованого нейрозапалення в головному мозку мишей та покращувати поведінкові реакції в піддослідних тварин. Клітини з обох джерел відповідали за експресією маркерів CD90, CD73, CD105, CD34, CD44, CD45 імунотипу ММСК, а також реалізували мультипотентний потенціал при спрямованому диференціюванні. При цьому використання плацентарних ММСК, мічених GFP, дозволило виявити трансплантовані внутрішньовенно донорські клітини в кровоносних судинах головного мозку мишей. Тварини, яким після LPS вводили плацентарні клітини, не демонстрували епізодичного порушення пам'яті, накопичення патологічного амілоїду бета $A\beta$ (1-42) і зменшення кількості нікотинових рецепторів ацетилхоліну nAChR у тканині головного мозку та мітохондріях зокрема. Важливо, що ММСК можуть усувати патологічні симптоми, які виникли протягом 3 тижнів після моделювання нейрозапалення. При цьому ксеногенні ММСК людини були майже такими ж ефективними, як і алогенні мишачі [234, 415].

Подібні результати було отримано і на нокаутних мишах $\alpha 7^{-/-}$, нейрони яких у головному мозку не експресують нікотинових рецепторів ацетилхоліну nAChR субтипу $\alpha 7$ та демонструють прозапальний фенотип. Введені внутрішньовенно ММСК з плаценти мишей або пуповини людини з визначеним імунотипом та мультипотентним потенціалом диференціювання, проникали в головний мозок мишей $\alpha 7^{-/-}$ і зберігались там щонайменше 2 тижні, покращуючи епізодичну пам'ять і сприяючи більшій стійкості мітохондрій до апоптогенного впливу [233]. Загалом, отримані дані дозволяють припустити, що ММСК плаценти, які відповідають належним доклінічним критеріям якості та ефективності, як і ММСК з жирової тканини, є потенційним терапевтичним інструментом у подальших клінічних дослідженнях для лікування не лише серцево-судинних захворювань, а й патології ЦНС, асоційованої з нейрозапаленням.

Додаткове підтвердження якості та безпеки клітинних препаратів ММСК плаценти, які були тестовані за запропонованими критеріями, продемонстровано у наших спільних дослідженнях з Svitina H. та ін., де було детально охарактеризовано ММСК з плаценти людини і щурів та оцінено їхній вплив на прогресування диметилгідразин-індукованого раку товстої кишки в щурів. За даними проточної цитометрії та спрямованого диференціювання клітини з плаценти щура проявляли імунотип і мультипотентний потенціал, притаманний класичним ММСК: на пасажі 3 рівень експресії CD90 складав 89,8 %, CD29 – 46,4 %, CD45 – 2,7 %, хоча CD44 становив лише 7,2 %. Водночас, ММСК плаценти людини демонстрували суттєво вищу експресію маркера CD44 (99,7 %) при експресії CD90 на рівні 95,6 %, CD29 – 34,9 % і CD45 – 0,6 %. Встановлено, що протягом 22 тижнів після введення трансплантовані ММСК плаценти можуть приживлятися в різних тканинах організму реципієнта, але суттєво не впливають на ріст та метастазування індукованої пухлини кишківника [15, 337]. Загалом, це вказує на важливість визначення та дотримання розроблених морфофункціональних та імунотипічних критеріїв якості ММСК різного походження, зокрема і плаценти, для подальших доклінічних та клінічних досліджень при супутніх злякисних новоутвореннях.

6.4 Клінічна оцінка безпеки та ефективності інтраміокардіальної трансплантації ММСК плаценти в лікуванні хворих з ішемічною кардіоміопатією

У першій фазі пілотного клінічного дослідження "Оцінка ефективності застосування стовбурових клітин міокарда, кісткового мозку, плаценти, жирової тканини та їх комбінацій у лікуванні хворих на ішемічну кардіоміопатію" в пацієнтів з ішемічною кардіоміопатією та важкою серцевою недостатністю вперше у світі була проведена інтраміокардіальна трансплантація ММСК плаценти людини.

У нашому клінічному дослідженні на основі попереднього наукового пошуку, аналізу результатів експериментального дослідження та клінічного досвіду профільних спеціалістів з кардіохірургії було визначено доцільним проведення трансплантації клітинних препаратів методом мікродозових інтраміокардіальних ін'єкцій.

Також були розроблені критерії комплексної оцінки ефективності клітинної трансплантації у хворих на ішемічну кардіоміопатію:

- зменшення симптомів серцевої недостатності (набряків, задишки);
- зменшення больового синдрому за грудиною;
- підвищення толерантності до фізичного навантаження;
- покращення скоротливої функції серця та перфузії міокарда за даними ультразвукового дослідження;
- відсутність ускладнень після трансплантації.

Додатково було розроблено шкалу оцінки ступеня ефективності клітинної терапії ішемічної кардіоміопатії за аналізом скоротливої функції серця (табл. 6.6), а також шкалу ступеня переносимості досліджуваного клітинного препарату (табл. 6.7). Ці шкали можуть бути використані для оцінки безпеки та ефективності терапевтичного застосування препаратів на основі стовбурових клітин різного походження в лікуванні й іншої патології серця, що супроводжується серцевою недостатністю.

Таблиця 6.6 – Ефективність клітинної терапії ішемічної кардіоміопатії

Висока ефективність	<p>Зменшення класу серцевої недостатності на 2 класи.</p> <p>Збільшення фракції викиду лівого шлуночка на $\geq 15\%$.</p> <p>Зменшення кінцево-сistolічного об'єму на $\geq 15\%$.</p> <p>Зменшення кінцево-діастолічного об'єму на $\geq 15\%$.</p> <p>Підвищення регіональної скоротливості серця на $\geq 15\%$.</p>
Помірна ефективність	<p>Зменшення класу серцевої недостатності на 1 клас.</p> <p>Збільшення фракції викиду лівого шлуночка від 5 до 15 %.</p> <p>Зменшення кінцево-сistolічного об'єму від 5 до 15 %.</p> <p>Зменшення кінцево-діастолічного об'єму від 5 до 15 %.</p> <p>Підвищення регіональної скоротливості серця від 5 до 15 %.</p>
Низька ефективність	<p>Клас серцевої недостатності без змін</p> <p>Збільшення фракції викиду лівого шлуночка на $\leq 5\%$.</p> <p>Зменшення кінцево-сistolічного об'єму на $\leq 5\%$.</p> <p>Зменшення кінцево-діастолічного об'єму на $\leq 5\%$.</p> <p>Підвищення регіональної скоротливості серця на $\leq 5\%$.</p>

Таблиця 6.7 – Ступені переносимості клітинного препарату

Добра	При об'єктивному огляді або інструментальних дослідженнях у динаміці не виявляються патологічні зміни або клінічно значущі відхилення і/або пацієнт не відмічає прояв побічних реакцій.
Задовільна	При об'єктивному огляді або інструментальних дослідженнях у динаміці виявляються незначні зміни, які носять перехідний характер і/або пацієнт відмічає прояв незначних побічних, що не причиняють серйозних проблем.
Незадовільна	При об'єктивному огляді або інструментальних дослідженнях у динаміці виявляються значні зміни і/або пацієнт відмічає прояв побічних реакцій, що мають значний негативний вплив на його самопочуття.

Після інтраміокардіальної трансплантації ММСК плаценти в інтра- та післяопераційному періоді ускладнень чи загрозливих станів для життя пацієнтів не відмічали. Також не збільшувався час їх перебування на штучній вентиляції легень та загальний строк перебування в стаціонарі. Хворі з ішемічною кардіоміопатією вже через місяць зазначали про суттєве зменшення симптомів серцевої недостатності та покращення якості життя. У 100 % пацієнтів зникла задишка та болі за грудиною, у 75 % зникли набряки. Усі пацієнти відмічали підвищення толерантності до фізичних навантажень, покращення працездатності, сну, нормалізацію пульсу та артеріального тиску. Протягом перших 3 міс після трансплантації було показано суттєве покращення скоротливої функції серця за показником фракції викиду лівого шлуночка (зростання на $28,3 \pm 11,3$ %, $p < 0,05$), а також зменшення дилатації серця за кінцево-систоличним та кінцево-діастолічним об'ємами (рис. 6.21).

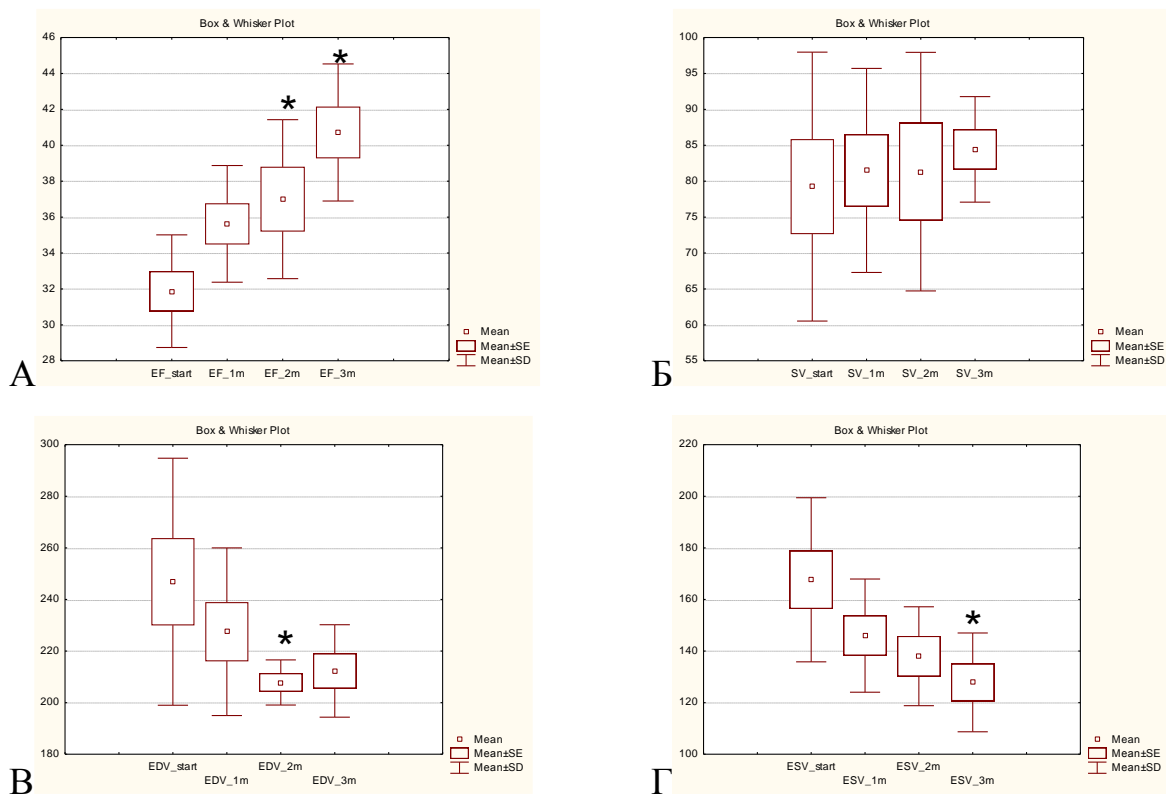


Рисунок 6.21 – Гістограми динаміки показників фракції викиду лівого шлуночка (А), ударного об'єму (Б), кінцево-діастолічного (В) та кінцево-систоличного (Г) об'єму серця за даними ехокардіографії в пацієнтів з ішемічною кардіоміопатією до лікування та через 1, 2 і 3 місяці після інтраміокардіальної трансплантації ММСК плаценти. Примітка: * – $p \leq 0,05$ у порівнянні з даними до початку лікування.

У дослідженні у ранні строки після інтраміокардіальної трансплантації алогенних ММСК плаценти показано підвищення ефективності лікування хворих з тяжкими формами серцевої недостатності, у поєднанні з ішемічною хворобою серця зі зниженою скоротливою здатністю лівого шлуночка. Ці дані корелювали з поліпшенням регіонарної скоротливості міокарда, визначеної за допомогою speckle-tracking-ехокардіографії, особливо в зонах, куди безпосередньо вводили клітини (рис. 6.22).

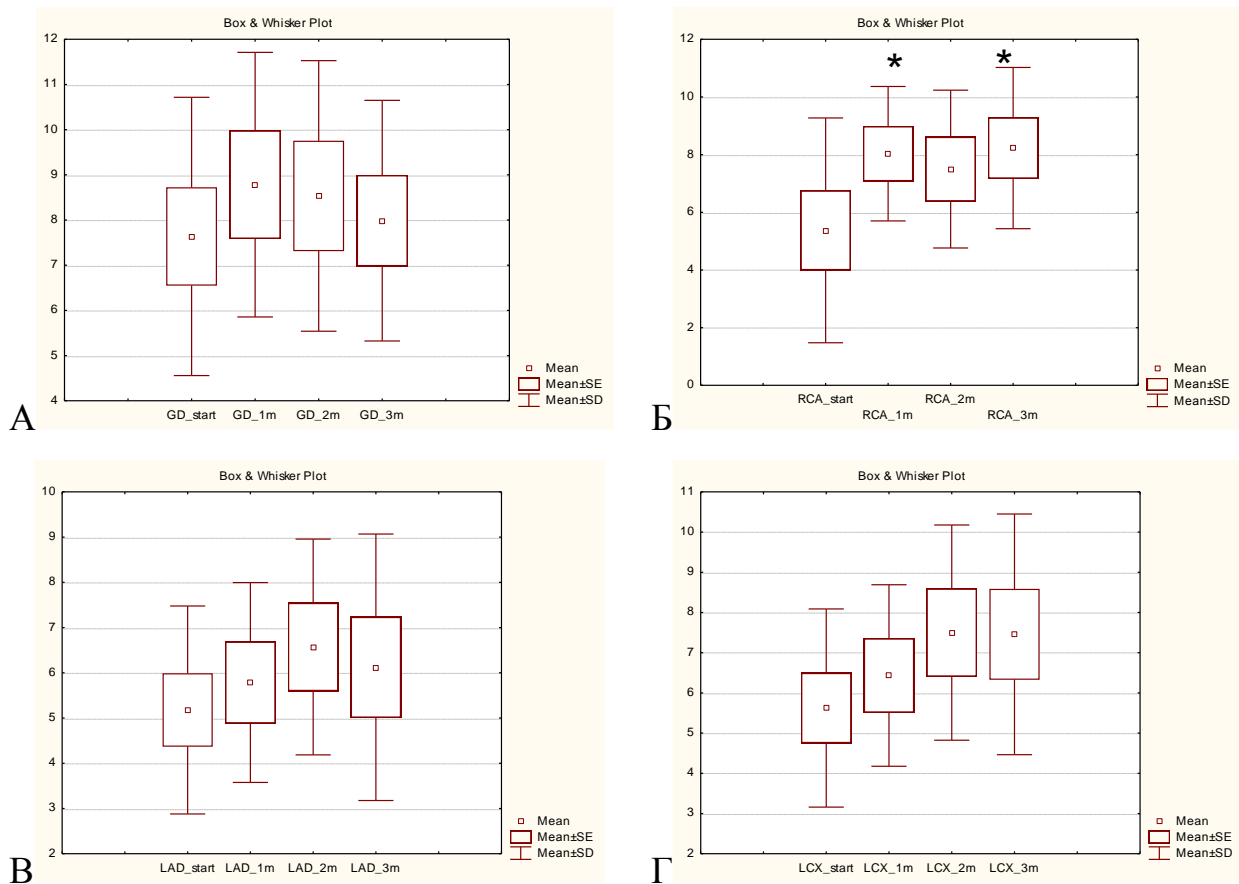


Рисунок 6.22 – Гістограми динаміки показників загальної регіонарної скоротливості міокарда (А), сегментарної скоротливості в басейні правої коронарної артерії (Б), передньої низхідної гілки лівої коронарної артерії (В) та огинаючої гілки лівої коронарної артерії (Г) за даними speckle-tracking-ехокардіографії в пацієнтів з ішемічною кардіоміопатією до лікування та через 1, 2 і 3 місяців після інтраміокардіальної трансплантації ММСК плаценти.

Примітка: * – $p \leq 0,05$ у порівнянні з даними до лікування.

Через 12 міс після трансплантації в пацієнтів відмічали покращення показників скоротливої функції та об'ємів за даними ехокардіографії, а саме: підвищення фракції викиду лівого шлуночка ($40 \pm 5,4$ %), зменшення кінцево-діастолічного об'єму ($210 \pm 9,7$ мл), зменшення кінцево-систолічного об'єму ($130 \pm 8,6$ мл).

Також через 12 міс після трансплантації продемонстровано значне покращення якості життя за результатами аналізу даних опитувальників Minnesota Living with Heart Failure Questionnaire та Heart Quality of Life (рис. 6.23), які є одними з найбільш широко застосовуваних профільних анкет щодо якості життя пацієнтів із серцевою недостатністю. Вони визначають оцінки за двома аспектами – фізичним та емоційним, а також загальну комплексну оцінку якості життя таких хворих.

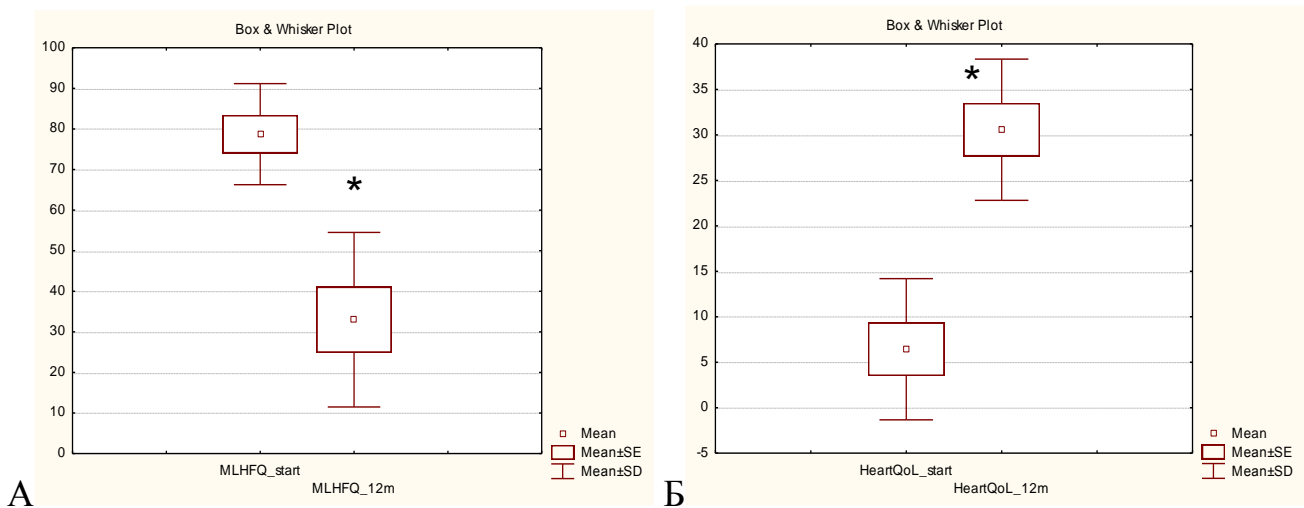


Рисунок 6.23 – Гістограми індексів якості життя за даними опитувальників MLHFQ (А) та HeartQoL (Б) у пацієнтів з ішемічною кардіоміопатією до лікування та через 12 місяців після трансплантації ММСК плаценти. Примітка: * – $p \leq 0,05$ у порівнянні з показниками до лікування.

Станом на 18 місяців після трансплантації усі пацієнти перебували в задовільному стані і за час спостереження не виявлено клінічних ознак ускладнень або побічних ефектів, які могли бути пов'язані з трансплантацією клітин.

Отже, за результатами клінічного дослідження було продемонстровано, що інтраміокардіальна трансплантація ММСК плаценти в комплексі з реваскуляризацією міокарда істотно покращує скоротливу функцію серця в пацієнтів з ішемічною кардіоміопатією, що проявляється швидким та істотним зменшенням симптомів серцевої недостатності та покращення якості життя.

Протягом перших 3 міс після реваскуляризації та трансплантації плацентарних ММСК істотно збільшується фракція викиду лівого шлуночка, зменшується кінцево-систоличний і кінцево-діастолічний об'єми серця. У пацієнтів, які отримали реваскуляризацію разом з інтраміокардіальною трансплантацією ММСК плаценти щонайменше станом на кінець 3-го місяця покращується регіонарна скоротливість міокарда, особливо в ділянках ін'єкції клітин і щонайменше через 1 рік значущо покращується якість життя за даними опитувальників MLHFQ та HeartQoL.

Загалом, у пілотному клінічному дослідженні продемонстровано, що інтраміокардіальна трансплантація ММСК плаценти є безпечною та може використовуватись у комплексному лікуванні хворих з ішемічною кардіоміопатією, ускладненою важкою серцевою недостатністю внаслідок зниження скоротливої здатності лівого шлуночка. Проте, актуальними залишаються подальші клінічні випробування з комплексної оцінки безпеки та ефективності повторних трансплантацій стовбурових клітин, а також застосування їх в комбінації з іншими типами прогеніторів.

Основні положення розділу висвітлені в публікаціях здобувача із зазначенням особистого внеску та відповідних посилань на список цитованих джерел [1, 3, 5, 10, 19, 20, 180, 181, 233, 234, 257, 307, 308, 309, 310, 311, 312, 337, 415].

РОЗДІЛ 7 АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ ОТРИМАНИХ РЕЗУЛЬТАТІВ

7.1 Обговорення результатів дослідження ММСК з різних джерел

Згідно з планом роботи на першому етапі було розроблено технології отримання та культивування в моношарі ММСК з кількох джерел: кісткового мозку, жирової тканини та плаценти мишей. Для підтвердження належних характеристик ММСК, які були використані в подальших дослідженнях, отримані культури проаналізовано за параметрами росту в культурі, морфологією, імунофенотипом та потенціалом до спрямованого диференціювання в остеогенному, хондрогенному та адипогенному напрямках. Морфофункціональне порівняння зразків з різних тканин відіграє важливе значення для визначення оптимального джерела клітин у дорослому організмі.

Спочатку було отримано первинні культури адгезивних клітин кісткового мозку та жирової тканини мишей, здатних виживати і проліферувати в умовах *in vitro*. Нами було встановлено, що для культур ММСК кісткового мозку у порівнянні з клітинами жирової тканини характерний більш тривалий теоретичний максимальний час культивування – 3,2 міс. проти 2,9 міс., відповідно. Цей показник ґрунтується на наявності ліміту Хейфліка: клітинна культура, що характеризується більшою відносною швидкістю приросту популяції, швидше вичерпує ліміт Хейфліка і тому теоретичний максимальний час її культивування зменшується. Тобто, максимальний час культивування обернено пропорційний відносній швидкості приросту кількості клітин.

На основі аналізу відносної швидкості приросту популяції на ранніх та пізніх строках досягнення конфлюентності встановлено, що клітини підшкірної жирової тканини мають кращі показники експансії в динаміці, що підтверджує переваги їх використання для подальшого безпосереднього введення, спрямованого диференціювання або створення тривимірних культур. Отримані нами дані співвідносяться з результатами інших дослідників, які підтверджують, що ММСК з жирової тканини мають вищу проліферативну здатність і нижчі рівні клітинного старіння в культурі, порівнюючи з кістковим мозком [70].

Зокрема, дослідження Burrow K. та ін. продемонструвало, що ММСК з жирової тканини здатні проліферувати швидше та досягати більшого показника подвоєння популяції, ніж з кісткового мозку в того ж донора. При цьому клітин з обох джерел були здатні до диференціювання на ранніх етапах; однак, у той час як потенціал до спрямованого комітування в культурі з кісткового мозку з часом зменшувався, ММСК з жирової тканини зберігали досить високу здатність диференціюватись в остео-, хондро- і адипогенні лінії [52]. Численні дослідження ММСК з жирової тканини також продемонстрували подібний потенціал мультилінійного диференціювання, хоча деякі автори дискутують як про посилений, так і про еквівалентний та навіть зменшений остеогенний, хондрогенний або адипогенний потенціал ММСК з жирової тканини, порівнюючи з ММСК кісткового мозку [27, 242]. Отже, продемонстровано, що ММСК з жирової тканини мають більший проліферативний потенціал та питому швидкість приросту популяції клітин, у порівнянні з ММСК кісткового мозку, що обґрунтовує переваги їх використання для виготовлення клітинних продуктів та потенційну ефективність застосування в доклінічних і клінічних дослідженнях.

Також нами була розроблена технологія поетапного остеогенного диференціювання ММСК: спочатку моношарову культуру індукували в хондрогенному напрямі, а потім завершували процес комітування клітин у стандартному середовищі для остеогенного диференціювання. Такий спосіб дозволяє частково відтворити етапи закладки кісткової тканини в ембріогенезі, наближуючи модель культури клітин *in vitro* до умов формування органів *in vivo*. Застосований метод комбінованого фарбування Alcian Blue та Safranin O культур клітин, диференційованих у хондрогенному напрямі, дав змогу підтвердити спрямування спеціалізації культури та визначити межі відкладання позаклітинного матриксу в окремих клітин. Окрім цього, показано, що при конденсації культур сульфатовані глікозаміноглікани відкладаються по периферії утвореного сфероїда, а протеоглікани – всередині конгломерату. Такий розподіл компонентів спостерігається і в хрящовій тканині, а отже клітини, утворюючи сфероїди при конденсації *in vitro*, здатні до просторової організації та перерозподілу функцій у межах конгломерату [184].

За допомогою електронної мікроскопії встановлено певні зміни ультраструктури ММСК з жирової тканини під час остеогенного диференціювання. Якщо недиференційовані стромальні клітини мають грубу ендоплазматичну сітку з розширеними цистернами і подовженими мітохондріями, то наприкінці диференціювання вони не лише змінюють фібробластоподібний вигляд на полігональний, набуваючи остеобластоподібної морфології, а й набувають ознак, характерних для клітин з низькою проліферативною активністю, які активно продукують екстрацелюлярний матрикс, багатий на колаген та неорганічні сполуки. У позаклітинному матриксі серед волокон колагену спостерігаються везикули різного розміру, подібні до вузликів кальцифікації. На противагу цьому, ознаки значної метаболічної активності клітин у нативній культурі (велике еухроматичне ядро, досить помітний гранулярний ендоплазматичний ретикулум з розширеними цистернами, подовжені мітохондрії, апарат Гольджі та проміжні пучки мікрофіламентів, ендосомальні елементи і ліпідні гранули) вказують на високий рівень синтезу білка, необхідного для проліферації клітин, та низький ступінь їх диференціювання [17, 354]. Загалом, було показано, що електронна мікроскопія є цінним інструментом при з'ясуванні внутрішньоклітинних змін та міжклітинних взаємодій під час диференціювання. Отримані нові дані про ультраструктурну характеристику ММСК у динаміці можуть слугувати додатковими критеріями ефективності спрямованого диференціювання та підтвердження їхніх мультипотентних властивостей.

Як обов'язковий етап підтвердження мінімальних критеріїв ММСК, було встановлено імунофенотип стромальних клітин з кісткового мозку, підшкірної та вісцеральної жирової тканини мишей за експресією мезенхімальних (CD90, CD73, CD105) та гемопоетичних (CD45, CD34) маркерів. За морфофункціональними ознаками та поверхневими антигенами клітини з усіх досліджуваних джерел відповідали характеристикам ММСК з певними особливостями. Зокрема, на ранніх пасажах *in vitro* для кісткового мозку мишей підтверджено можливість експресії CD45, а для ММСК з жирової тканини – CD34, що співпадає з даними інших авторів [266, 334].

Високий рівень експресії маркерів CD44, CD73 та CD90 є типовим для стромальних клітин з мультипотентними властивостями, однак у клітин з кісткового мозку експресія CD45 та CD117 зберігалася тривалий час. Як відомо, первинна культура клітин кісткового мозку мишей досить гетерогенна за клітинним складом і на ранніх пасажах CD45 може бути виявлений на адгезуючих клітинах моноцитарного ряду.

Водночас, відносно високий рівень експресії маркера CD34 на ранніх пасажах є типовим для культури ММСК з жирової тканини і може свідчити про потенціал диференціювання в ендотеліальному напрямі. Така особливість може сприяти активації неоангіогенезу та кращій васкуляризації трансплантатів для забезпечення їх виживання, що було продемонстровано в наших подальших експериментах. Важливо зазначити, що хоча при порівнянні колонієутворюючої активності культури клітин з вісцеральної жирової тканини мали більший показник, ніж з підшкірної, за експресією маркерів CD73 і CD90 вони значно відрізнялись.

Важливою особливістю ММСК з жирової тканини є їхня мала чутливість до відсутності білка, що дає можливість культивування в середовищах, які не містять фетальної сироватки корів або містять низькі концентрації аутологічної сироватки пацієнта без істотної втрати потенціалу клітин. У разі клінічного застосування це дозволяє повністю запобігти алергізації організму реципієнта та ризику передачі йому пріонових інфекцій. Хоча при культивуванні ММСК з жирової тканини в середовищі без сироватки подвоєння популяції відбувається повільніше (на 5-6 добу), тоді як у середовищі з 0,5 % людської сироваткою – на 2-й день, експресія основних маркерів у цих умовах співставна з 10 % FBS [274]. Присутність антибіотиків та антимікотиків у середовищі культивування істотно не впливає на потенціал проліферації та диференціювання ММСК з жирової тканини. Додатковою значною перевагою ММСК з жирової тканини є висока життєздатність після розморожування, що також було продемонстровано в наших дослідженнях. Це досить важливо для кріоконсервації та тривалого зберігання клітинних продуктів у кріобанках.

Нейропротекторні ефекти ММСК в тканинах головного мозку, виявлені у наших спільних дослідженнях з Tsuprykov O. та ін. на моделях ішемічного пошкодження [17, 353, 389] та Lykhmus O. та ін. на моделі LPS-індукованого нейрозапалення [234, 415], а також на моделях пошкодження периферичної нервової системи у спільних дослідженнях з Govbakh I. та ін. [4, 125, 294], можуть бути пов'язані як із заміщенням ушкоджених судинних структур завдяки диференціюванню та інтеграції трансплантованих клітин, так і з виробленими гуморальними біоактивними чинниками, здатними модулювати регенерацію.

Більшість дослідників вважають, що нейропротекторні властивості ASCs реалізуються не прямо через диференціювання, а паракринно завдяки трофічним факторам та активації клітин реципієнта. Зокрема, відомо, що кондиційне середовище з ASCs захищає культуру мозочкових гранулярних нейронів від індукованого апоптозу за допомогою активації каспази-3 [103]. ASCs здатні пригнічувати проліферацію Т-клітин *in vitro* через активність індуцибельної синтази оксиду азоту (iNOS) і циклооксигенази, а також запобігають індукованому ліпополісахаридом дозріванню дендритних клітин *in vitro*. На моделі аутоімунного енцефаломієліту міграція ASCs у демієлінізовані ділянки поряд із збільшенням кількості ендогенних олігодендроцитів супроводжується пригніченням функції аутоантиген-специфічних Т-клітин, а також зменшенням кількості активованих CD11c⁺40^{high} та CD11c⁺TNF- α ⁺ дендритних клітин у дренажних лімфатичних вузлах [33].

У подальших наших дослідженнях було розроблено технологію отримання високопроліферативної культури стромальних клітин з плаценти мишей, які за імунофенотипічними характеристиками та потенціалом спрямованого диференціювання відповідали мінімальним критеріям ММСК. Окрім того, цікавим виявився факт присутності популяції клітин з експресією ендотеліального маркера CD31, а також рецептора фактору росту стовбурових клітин CD117, що співвідноситься з даними інших дослідників та може вказувати на перспективи застосування цього типу клітин для регенерації серцево-судинної системи.

У наших спільних дослідженнях з Shablii V. та ін. продемонстровано, що з плаценти людини можна виділити ММСК з високою проліферативною активністю, які здатні до мультилінійного остеогенного, адипогенного та хондрогенного диференціювання *in vitro*. Отримані культури мають поверхневий імунофенотип $CD90^+CD73^+CD105^+HLA-ABC^{low}CD34^-CD45^-CD133^-CD14^-$, експресують при цьому віментин, а також містять мінорну популяцію клітин, позитивних на цитокератин 7. Цікаво, що віментин-позитивні ММСК плаценти не експресували цитокератин *in situ*, але подвійне забарвлення клітин $CK7^+Vim^+$ у тканинних експлантатах і культурі з них вказувало на індуковану експресію $CK7$ *in vitro*. Експресія $CK7$ -позитивними клонами мезодермальних генів *SPP1*, *COL2A1* та *PPARG2* додатково підтверджує їхнє мезенхімальне походження [310]. Віментин є білком проміжних філаментів сполучних тканин та інших тканин мезодермального походження, який відіграє значну роль у закріпленні органел та підтримці їхнього положення в цитоплазмі. Саме віментин, як компонент цитоскелета, забезпечує цілісність клітин та їхню стійкість до механічного стресу. Цитокератин 7 є компонентом цитоскелета під час диференціювання вже епітеліальних клітин. Тобто, отримані культури клітин з плаценти, з одного боку, відповідають загальновизнаним критеріям ММСК, проте мають низку особливостей за експресією маркерів мезенхімально-епітеліального переходу, які можуть впливати як на культуральні характеристики *in vitro*, так і на реалізацію ними регенеративного потенціалу вже *in vivo*.

При доклінічній оцінці терапевтичного потенціалу на моделі ізопротеренол-індукованої кардіоміопатії в мишей продемонстровано, що нативні та кріоконсервовані ММСК плаценти здатні до заселення пошкодженої тканини серця *in vivo*. За допомогою флуоресцентної імуногістохімії донорські клітини було виявлено в тканинах серця реципієнта через 4 тижні після внутрішньовенного введення, що вказує на їхню здатність мігрувати та виживати в міокарді навіть в умовах ксеногенної трансплантації. Це додатково підтверджує виражені імуносупресивні властивості ММСК плаценти, які запобігають маніфестації реакцій відторгнення трансплантата.

Також важливо відмітити, що після внутрішньовенної трансплантації плацентарних ММСК мишам з кардіоміопатією спостерігається підвищення метаболічної активності окремих кардіоміоцитів (гіпертрофія ядер), послаблення запального процесу та нормалізація електрофізіологічної збудливості міокарда [308]. Проте, іноді відмічали посилення синтезу елементів екстрацелюлярного матриксу в інтерстиції міокарда [19]. При цьому на функціональному рівні за допомогою аналізу електрокардіограм у тварин із змодельованою кардіоміопатією встановлено зменшення частоти екстрасистол після трансплантації ММСК з плаценти.

Результати проведених нами доклінічних експериментів на мишах та аналіз даних досліджень інших авторів на великих лабораторних тваринах були важливою необхідною передумовою початку перевірки безпеки та ефективності клітинної терапії захворювань серця з використанням ММСК з плаценти в клінічних дослідженнях на людях.

У результаті проведення пілотного клінічного дослідження після інтраміокардіального введення ММСК плаценти в пацієнтів з ішемічною кардіоміопатією за даними інструментального обстеження було встановлено покращення скоротливої функції серця, а за даними об'єктивної симптоматики та анкетування – зменшення симптомів серцевої недостатності та покращення якості життя щонайменше до 1-го року спостереження. Істотне зростання фракції викиду лівого шлуночка, зменшення кінцево-систоличного і кінцево-діастолічного об'ємів серця продемонстровано протягом перших 3 міс. після трансплантації клітин. Важливо, що за даними speckle-tracking ехокардіографії, покращення регіонарної скоротливості міокарда переважало саме в осередках введення клітин, що може свідчити про локальні терапевтичні ефекти трансплантату. Проте, позитивна динаміка функціональних показників міокарда за даними ультразвукового дослідження поступово зменшувалась, починаючи з 6-го місяця спостереження, що вказує на необхідність перегляду кратності введення клітинного препарату з додаванням у більш віддалені строки повторних ін'єкцій для підтримання необхідного терапевтичного ефекту.

Механізм терапевтичного впливу досліджуваних стовбурових клітин плаценти залишається суперечливим і, ймовірно, численні їхні ефекти комбінуються та потенціюються для відновлення структури та функції серця після ішемічного пошкодження міокарда. Отримані нами результати дозволяють припустити, що застосування стовбурових клітин плаценти може стати новою пріоритетною стратегією при клінічних дослідженнях ефективності та безпеки клітинної терапії ішемічної хвороби серця особливо з огляду на парадигму багаторазового проведення клітинної трансплантації. Окрім того, для виявлення найбільш ефективної дози та поєднання клітин відповідно до нозології перспективною є розробка комбінованого застосування тканиноспецифічних кардіальних стовбурових клітин у поєднанні з ММСК різного походження (з плаценти, жирової тканини, кісткового мозку), з огляду на їхні трофічні, протизапальні та проангіогенні властивості.

Численні експерименти інших дослідників на моделях пошкодження міокарда у тварин продемонстрували безпеку та високий регенеративний потенціал інтраміокардіальної трансплантації як аутологічних, так і алогенних стовбурових клітин міокарда, кісткового мозку, плаценти, жирової тканини або їх комбінацій, що підтверджено морфологічними та функціональними показниками [240]. Суттєво кращі результати отримано при введенні комбінації клітин та при повторних трансплантаціях клітин різного типу. Можна припустити, що не завжди вибір одного типу клітин може бути оптимальною стратегією клітинної терапії, а поєднання різних джерел для трансплантації дасть змогу забезпечувати їх синергізм та посилення клінічного результату. Саме тому перспективними є подальші дослідження з оцінки терапевтичних ефектів комбінованого застосування ММСК різного походження в поєднанні з тканиноспецифічними стовбуровими клітинами міокарда.

Ще одним з важливих аспектів контролю безпеки новітніх препаратів прогресивної терапії, є оцінка онкогенного потенціалу клітинних та тканинних трансплантатів, який, теоретично, може реалізовуватись через злоякісну трансформацію клітин донора, або ж їх вплив на ракові клітини, присутні в організмі реципієнта.

У наших спільних дослідженнях з Svitina H. та ін. продемонстровано безпеку застосування ММСК належної якості з плаценти людини і щурів на фоні змодельованого у щурів диметилгідразин-індукованого раку товстої кишки, хоча й не виявлено позитивного терапевтичного ефекту клітинної терапії при цій патології. Проте, на сьогодні наявність діагностованих супутніх доброякісних або злоякісних солідних пухлин досі залишається абсолютним протипоказанням при проведенні клінічних випробувань клітинної терапії соматичних захворювань, якщо це дослідження не спрямоване саме на лікування новоутворень. Проведення передтрансплантаційного діагностичного онкоскринінгу пацієнтів, для котрих планують регенеративні втручання з використанням ММСК, слід вважати обов'язковим елементом клінічного протоколу клітинної терапії.

Загалом, ММСК з плаценти є доступним альтернативним джерелом виготовлення клітинних препаратів для потреб регенеративної медицини. Проте, з огляду на гістологічні особливості тканини плаценти, різноманітність методів її обробки та протоколів вирощування клітин, отримані в результаті культури можуть бути досить неоднорідними за субпопуляційним складом, що потребує більш ретельного та виваженого підходу з підтвердження критеріїв чистоти та відповідності цільових популяцій стовбурових клітин. Використання розширених панелей антитіл для мультипараметричного імунофенотипування та імуноцитохімічного дослідження, доповнення додаткових протоколів спрямованого диференціювання, визначення продукції цитокінів та ростових факторів методами імуноферментного аналізу (enzyme-linked immunosorbent assay – ELISA), оцінка експресії специфічних генів методами молекулярно-генетичних досліджень (real-time PCR, microarray) можуть бути важливим етапом у комплексній оцінці якості виділеної популяції клітин ще на етапі культури *in vitro*. Вибір найбільш відповідного виду лабораторних тварин, ретельна валідація моделі захворювання, підбір оптимальної дози клітин, способу та кратності введення, використання інформативних лабораторних та інструментальних методів обстеження при оцінці їхнього терапевтичного потенціалу є ключовими аспектами в прогнозуванні безпеки і ефективності новітніх методів клітинної терапії на доклінічному етапі в експерименті *in vivo*.

7.2 Обговорення результатів дослідження ММСК в умовах тривимірного культивування

Трансплантація стовбурових клітин має на меті не лише заміщення втрачених структурних елементів організму, а й запуск ендогенних репаративних процесів завдяки активації власних резидентних клітин-попередників. Проте, однією з головних проблем при регенерації тканин та органів є забезпечення виживання трансплантованих клітин у місці їх застосування для подальшого тривалого та ефективного функціонування, особливо з урахуванням таких локальних патологічних змін в осередку пошкодження, як запалення та ішемія.

Як було зазначено раніше, регенеративний потенціал стовбуровими клітинами реалізується в умовах ніші, яка має певну просторову організацію, забезпечуючи контактну та безконтактну взаємодію різних типів клітин завдяки сигнальним молекулам. Відтворення умов мікрооточення стовбурових клітин перед трансплантацією може значно підвищити їхній регенеративний потенціал та ефективність застосування. Розроблені з цією метою матрикси здатні не лише заповнювати дефекти тканин, а й бути в ролі носіїв для клітин, відтворюючи просторову тривимірну нішу *in vitro*. При цьому актуальним залишається встановлення впливу умов тривимірного культивування на ефективність виживання, проліферації та потенціал до спрямованого диференціювання ММСК різних типів.

Особливий інтерес викликають перспективи застосування таких тривимірних культур клітин при травмах опорно-рухового апарату та патології серцево-судинної системи, які посідають провідні місця в структурі захворюваності людей працездатного віку, а тому становлять суттєву соціальну та економічну проблему в усіх країнах [120, 121]. Ключова роль у патогенезі серцево-судинних захворювань належить пошкодженням тканин ішемічного генезу з недостатньою перфузією. Порушення мікроциркуляції є причиною і сповільненої регенерації переломів кісток. Важливо, що 3D-носії можуть не лише забезпечувати тривале виживання трансплантованих клітин, а й сприятимуть неоангіогенезу в ішемізованих тканинах.

Можна припустити, що додаткові можливості спрямованого тканиноспецифічного диференціювання стовбурових клітин (наприклад, у напрямі ендотеліоцитів, кардіоміоцитів, остеобластів) та співкультивування різних типів прогеніторних клітин у складі тривимірних конструкцій дозволять більш ефективно відновити належну цитоархітектоніку, мікроциркуляцію та, відповідно, функцію ушкоджених органів у значно коротші строки.

Традиційна техніка моношару, яка використовується для культивування ММСК, не повноцінно відтворює необхідні умови міжклітинної взаємодії для диференціювання стовбурових клітин, знижуючи його ефективність. На відміну від 2D культивування, тривимірне культивування у формі багатоклітинних агрегатів, що частково імітує умови мікрооточення стовбурових клітин *in vivo*, дозволяє істотно покращити їх виживання в тканині реципієнта та підвищити загальний регенеративний потенціал. Дослідження ультраструктурних характеристик клітин у 3D сфероїдах спрямоване на встановлення механізмів самоорганізації клітини, контактної міжклітинної сигналізації, продукції позаклітинного матриксу, стійкості до гіпоксії залежно від розміру сфероїда.

У наших дослідженнях *in vitro* було розроблено технології вирощування ММСК в об'ємних самоорганізованих агрегатах мікрмаси, що доповнює результати інших авторів [93]. Зокрема, нами було підібрано оптимальну кількість ММСК з кісткового мозку та з підшкірної жирової тканини мишей для формування тривимірної культури мікрмаси, а також продемонстровано можливість її ефективного спрямованого диференціювання в остеогенному напрямі. Це було підтверджено за допомогою специфічного забарвлення отриманих мікрмас на солі кальцію з використанням барвника Alizarin Red S [12].

Дослідниками продемонстровано, що потенціал проліферації та диференціювання дисоційованих клітин, отриманих із сфероїдів ММСК, співставний зі звичайними моношаровими культурами. Фактично, більш виражена мінералізація екстрацелюлярного матриксу та вміст ліпідних вакуолей були у відновлених клітинах, порівнюючи з моношаром, що свідчить про посилене диференціювання клітин, культивованих у 3D-сфероїдах [86].

Murphy K. та ін. продемонстрували для сфероїдів ММСК співставний остеогенний і підвищений проангіогенний потенціал, порівнюючи з моношаровими культурами [250]. Yamaguchi Y. та ін. з використанням імуноцитохімічного аналізу та полімеразної ланцюгової реакції із зворотною транскрипцією в режимі реального часу встановили, що у сфероїдах ММСК щурів, на відміну від моношарових культур, посилюються остеогенні властивості. На моделі пошкодження кісток черепа комп'ютерна томографія та гістологічний аналіз показали, що в дефектах, заміщених трансплантованими сфероїдами, відбувається посилена регенерація кісткової тканини [380].

Інтенсивна міграція клітин від сфероїдів до адгезивної поверхні *in vitro* свідчить про здатність клітин виживати в 3D культурі, при цьому їхня морфологія на поверхні сфероїдів під впливом факторів остеоіндуктивного диференціювання змінюється на остеобластну, а проліферативна активність знижується, що додатково підтверджує перехід клітин у спеціалізований тип.

У вже згаданих вище наших дослідженнях для двовимірних культур була продемонстрована можливість поетапного остеогенного диференціювання ММСК з попередньою хондрогенною індукцією, що частково відтворює *in vitro* умови ніші для закладки та формування кістки в організмі [184]. У низці експериментів інших дослідників було виявлено залежність спрямованості диференціювання клітини від її оточення. Використовуючи техніку мікроділянок для контролю форми клітин та ступеня розпластування, було показано, що в ММСК, які адгезувалися на мікроділянках, однак були обмежені в розпластуванні, активувалися гени хондрогенезу у відповідь на стимуляцію TGF- β , тоді як клітини, які не були обмежені в розпластуванні на субстраті, диференціювалися в гладкі м'язи.

Отже, структурні зміни в клітинах, які відбуваються протягом морфогенезу, можуть відігравати безпосередню регуляторну роль у спрямуванні їх диференціювання [361]. Однак, тільки структурних змін буває недостатньо для кінцевої спеціалізації клітин і при відсутності, наприклад, TGF- β *in vitro* ММСК конденсуються без хондрогенного диференціювання [292].

В наших подальших експериментах *in vivo* продемонстровано, що 3D трансплантати ММСК з жирової тканини, культивованих методом мікромаси, здатні покращувати регенерацію кісткової тканини на моделі пошкодження трубчатих кісток у мишей (патент України 60512). При цьому трансплантати спрямовано диференційовані в остеогенному напрямі, забезпечують кращі морфологічні показники її відновлення, у порівнянні із культурою мікромаси без попереднього диференціювання [190]. Виживання клітин у тривимірній культурі, поряд з їхньою просторовою самоорганізацією і збереженням здатності до остеогенного диференціювання, може забезпечувати більш високий регенеративний потенціал таких трансплантатів для відновлення ушкоджень кісткової тканини методами клітинної терапії (патент України 104927). Це може бути пояснено тим, що сфероїдна культура, залежно від розміру, сприяє збереженню компонентів екстрацелюлярного матриксу, таких як ламінін і фібронектин, що було продемонстровано у дослідженні Lee J. та ін. [207].

Хоча створення тривимірних сфероїдів стовбурових клітин має на меті покращення їхніх функцій, але суттєвою проблемою залишається гіпоксичне ядро та недостатнє проникнення поживних речовин і сигнальних молекул у внутрішню частину мікромаси, що обмежує їхні розміри [206].

Зокрема, Laschke M. та ін. виявили, що каркаси, заселені диференційованими в остеогенному напрямі сфероїдами, демонструють помітно порушену васкуляризацію, спричинену втратою здатності диференційованих органоїдів утворювати мікросудинні мережі. Це було пов'язано зі зниженою інтеграцією імплантатів у тканину та вказувало на дедиференціювання сфероїдів у таких умовах *in vivo*. Ці результати вказують на те, що остеогенне диференціювання сфероїдів ASCs помітно погіршує їхню здатність до васкуляризації [179].

Тому окрім культури мікромаси, в якій клітини самоорганізуються в тривимірну структуру, нами також було досліджено ефективність заселення ММСК з жирової тканини у сформовані об'ємні носії. Одним із перспективних варіантів створення тривимірних матриксів є карбомерні гідрогелі.

Карбомери – це полімери на основі поліакрилової кислоти, які у водному розчині переходять зі стану золю в гель при підвищенні рН понад 5,5 [299]. Завдяки своїм властивостям вони реалізують потенціал носіїв природного походження, забезпечуючи просторову структуру, подібну до живої тканини, але залишаючись при цьому нетоксичними та неімуногенними [137]. З іншого боку, завдяки можливості регулювати фізико-хімічні параметри гідрогелів, змінюючи пропорції та модифікації складових компонентів, досягається необхідна кінетика деградації носія, що корелює з інтеграцією трансплантата в тканини реципієнта.

На початковому етапі досліджень було розроблено технологію виготовлення об'ємного трансплантату на основі карбомеру 974Р та агарози в оригінальних пропорціях. Були підібрані оптимальні умови формування 3D-культур, з огляду на хімічний склад компонентів, концентрацію клітин та строки культивування. Проведено оцінку швидкості регідратації отриманих гідрогелів та їхньої здатності вивільняти барвник у динаміці культивування *in vitro*. Було встановлено необхідну кількість клітин та об'єми матриксів для максимально швидкого і ефективного їх заселення клітинами [191]. Як і для культур мікромаси, продемонстровано, що ММСК з жирової тканини зберігають потенціал спрямованого диференціювання в умовах об'ємного тривимірного культивування в гідрогелі, характерний для двовимірних моношарових культур, що також було підтверджено специфічним забарвленням Alizarin Red S на фосфати кальцію та ВСІР/НВТ на лужну фосфатазу.

Сформовані об'ємні культури на основі карбомерних гідрогелів можуть бути використані як трансплантати для вивчення відновлювальних процесів при ушкодженнях тканин в експерименті *in vivo*. На сьогодні вже описано численні варіанти експериментального та клінічного застосування матриксів з клітинами різного походження при пошкодженнях кісток, хрящів, міжхребцевих дисків, шкіри, а також запропоновано проведення розширених клінічних випробувань з оцінки безпеки та ефективності їх застосування [137]. Ці підходи особливо актуальні в реконструктивній хірургії для регенерації пошкоджень м'яких тканин та загоєння ран.

У роботі продемонстровано, що об'ємні гідрогельні носії на основі карбомеру 974Р в умовах трансплантації *in vivo* підтримують виживання заселених ММСК з жирової тканини, синтез ними міжклітинного матриксу і забезпечують інтеграцію трансплантата в тканини реципієнта [191]. На моделі критичної ішемії кінцівок встановлено регенеративний потенціал імплантованих гідрогелів, заселених ММСК з жирової тканини, що проявлялось покращенням перфузії м'язів за результатами лазерної доплерівської флоуметрії та відновленням морфології тканин за даними гістологічного дослідження [6].

Поєднання технологій створення культур мікрмаси або гідрогельних матриксів та спрямованого диференціювання заселених у них клітин відкриває широкі перспективи для регенеративної медицини. Поетапне спрямоване диференціювання мультипотентних клітин *in vitro* в об'ємних конструкціях дозволить частково відтворити фізіологічні механізми формування тканини *in vivo* та отримати просторово організовану культуру клітин, здатних виживати, проліферувати та диференціюватися в заданому напрямі.

Важливо зазначити, що вибір типу тривимірного трансплантату залежить від морфологічних та функціональних особливостей тканини, яка потребує терапевтичного впливу. Наприклад, аутологічна трансплантація жирової тканини часто використовується в реконструктивній хірургії, проте рівень резорбції жирових фрагментів може становити від 25 % до 80 %. Хоча зосередження на виживанні трансплантата виглядає очевидним напрямом для покращення клінічних результатів, дослідження багатьох авторів показують, що довгострокове збереження об'єму графта частково пояснюється регенерацією жирової тканини [338]. Отже, досить актуальними можуть бути технології для покращення адипогенезу в таких трансплантатах.

Одним з перспективних підходів може бути додавання до ліпоаспірату клітин SVF або культивованих ММСК з жирової тканини, як варіант клітинно-опосередкованого ліпотрансферу, що встановили численні дослідження. Зокрема, у роботі Tang H. та ін. самостійні жирові трансплантати продемонстрували погане збереження об'єму та виживання при підсадці під шкіру мишей.

Майже всі введені людські адипоцити загинули, але по периферії інкапсульованого трансплантата утворилась нова жирова тканина миші. Додаткове застосування стромально-васкулярної фракції покращувало проліферацію як судин у самому трансплантаті від людини, так і новоутвореної жирової тканини миші [338]. Yuan Y. та ін. продемонстрували, що додавання ММСК з жирової тканини під час трансплантації ліпоаспірату значно збільшило час його виживання та співвідношення васкуляризованої тканини в трансплантаті. При цьому рівні експресії VEGF і HGF були вищими у фрагментах жиру в комбінації з ММСК з жирової тканини [397].

Проте, у наших спільних дослідженнях з Поляченком Ю. В. та ін. при трансплантації фрагментів жирової тканини, заселених алогенними ММСК з жирової тканини, було виявлено ознаки активації деструктивно-запальних процесів у трансплантаті, погіршене виживання адипоцитів та в подальшому – дефіцит маси пересадженої тканини [14]. Ці дані дещо суперечать результатам інших дослідників, але можуть пояснюватись застосуванням саме алогенних клітин для заселення жирової тканини, на які реалізувалась надмірна імунна відповідь. При цьому, за даними імуногістохімічного дослідження, мічені трансплантовані клітини локалізувались переважно в стінках дрібних судин, що підтверджує їхній проангіогенний вплив. Отримані результати додатково підтверджують необхідність виваженого та настороженого підходу при виборі оптимального безпечного джерела клітин для трансплантації.

Важливо, що підтримуючий вплив мезенхімальних стовбурових клітин *in vivo* на стабілізацію трансплантата жиру та локальну індукцію ангіогенезу не залежить від віку донора клітини чи тривалості культивування клітин *in vitro* [314]. Siennicka K. та ін. порівнювали підтримуючу дію ММСК з жирової тканини від молодих донорів *in vivo* з ефектами клітин від старих донорів і ММСК з індукованим старінням у довготривалих культурах *in vitro*. Жирові трансплантати, збагачені ММСК з жирової тканини (незалежно від їхнього віку), зберігають свій об'єм довше, ніж трансплантати без додавання стовбурових клітин. Формування нових судин у збагачених клітинами жирових трансплантатах було більш

інтенсивним, порівнюючи з контролем [322]. Можна зробити висновок, що старіння ММСК суттєво не знижує їхню здатність підтримувати виживання трансплантатів жирової тканини.

Ми вважаємо, що при спільній трансплантації ММСК з жирової тканини забезпечують більш тривале виживання трансплантату завдяки диференціюванню в ендотеліоцити та неоваскуляризації жирової тканини. Ефект від трансплантації тільки жирової тканини буде тимчасовим через недостатнє її кровопостачання, у той час як ММСК, окрім диференціювання в адипоцити, також стимулюють необхідний для трансплантату ангиогенез. При цьому жирова тканина є живим носієм для ММСК, сприяючи повноцінному їх функціонуванню.

Ці багатообіцяючі результати значно розширюють перспективи використання стовбурових клітин у клінічних умовах і вказують на те, що збагачення жирового трансплантата ММСК може зробити ліпофілінг надійною альтернативою класичному хірургічному відновленню тканин з використанням алогенного матеріалу або технології мігруючого клаптя. Однак, для широкого впровадження технології клітинно-опосередкованого ліпотрансферу у пластичній та реконструктивній хірургії м'яких тканин потрібна розробка стандартизованих протоколів виділення SVF або культури ММСК з жирової тканини, підбір оптимальної дози клітин під об'єм трансплантату тощо. Додаткової оцінки потребує також довготривала ефективність і безпека CAL у лонгітудинальних дослідженнях на великих вибірках пацієнтів.

Наукова новизна результатів цього фрагменту досліджень полягає в тому, що було встановлено вплив тривимірного культивування як на ефективність проліферації та потенціал до спрямованого диференціювання ММСК з жирової тканини в культурі *in vitro*, так і на їх виживання при трансплантації тваринам *in vivo*.

Продемонстровано здатність гідрогельних матриксів здійснювати механічну підтримку клітин, забезпечуючи належну цитоархітекtonіку та міжклітинні взаємодії для довгострокового виживання та функціонування трансплантату. На тривимірних культурах також можуть бути отримані нові дані про взаємний вплив клітин різного типу та ступеня зрілості при їх сумісному культивуванні.

Загалом, практичне значення фрагменту дослідження тривимірних культур полягає в розробці нових біотехнологічних підходів для підвищення ефективності застосування ММСК для регенерації пошкоджень багатьох тканин, зокрема кісток та м'язів. У результаті, запропоновано детальні протоколи тривимірного культивування ММСК з жирової тканини в культурі мікрмаси та у складі об'ємних конструкції на основі гідрогелів, які можуть знайти застосування як у фундаментальних наукових дослідженнях у галузі клітинних технологій, так і при впровадженні нових клінічних підходів у регенеративній медицині та тканинній інженерії.

Вдосконалення технології культур мікрмаси та заселення клітинами тривимірних матриксів на основі карбомеру 974Р дозволить моделювати просторову організацію їхньої тканинної ніші та підтримувати міжклітинні взаємодії, що в підсумку сприятиме довгостроковому виживанню та спеціалізації трансплантатів для більш ефективного відновлення пошкоджених тканин і органів. 3D моделі можуть точно імітувати властивості нативної тканини; при цьому сфероїди зі стовбурових клітин жирової тканини демонструють покращену регенеративну здатність, порівнюючи з моношаровими культурами.

Для відтворення структурної цитоархітектоніки тканини в 3D системах, повинні бути враховані певні характеристики матриксу: відповідні механічні параметри і хімічний склад, стимуляція клітинного росту та передачі сигналів, а також транспортування поживних речовин, газів і продуктів метаболізму. Необхідність швидкого і надійного заселення таких носіїв клітинами різних типів потребує розробки нових біотехнологічних підходів 3D культивування з обов'язковою оцінкою їхньої безпеки та ефективності, що продемонстровано в наших дослідженнях.

Додаткова динамічна перфузія трансплантатів в умовах біореакторів буде сприяти заселенню 3D-матриксів і спрямованій індукції клітин, а також дозволить стандартизувати технологію культивування. Перспективними є й подальші дослідження з інтеграції до складу об'ємних носіїв ростових факторів або цитокінів, відповідальних за хемотаксис, проліферацію та тканиноспецифічне диференціювання стовбурових клітин.

7.3 Обговорення результатів дослідження ендотеліальних клітин-попередників

У нашому дослідженні було розроблено та впроваджено методи виділення і культивування ендотеліальних прогеніторних клітин з аорти миші, які мають переваги над відомими раніше (патент України 127428). Зокрема, Kobayashi M. та ін. запропонував обробку цільної висіченої аорти колагеназою з подальшим промиванням її внутрішнього просвіту для збору ендотеліальних клітин [173]. Згідно з протоколом Wang J. та ін., щойно виділену аорту розрізали на невеликі сегменти та висівали на матрицю ендотелієм донизу, щоб забезпечити проростання ендотелію [364]. У нашому ж протоколі додатково видаляли зовнішні шари аорти та підготували лише очищену інтиму для подальшого перенесення на покриту фібронектином поверхню культурального посуду, що дозволяє зменшити контамінацію культури стромальними елементами.

Також розроблено діагностичні панелі моноклональних антитіл, необхідних для мультипараметричного імунофенотипування клітин з ендотеліальним фенотипом за маркерами CD31, CD38, CD309/VEGFR-2 методом проточної цитометрії. За морфологічними характеристиками та експресією специфічних поверхневих маркерів отримані культури клітин з аорти миші відповідали ендотеліальному фенотипу. Додатково запропоновано техніку культивування мічених GFP ендотеліальних прогеніторних клітин в умовах двовимірних моношарових та тривимірних об'ємних культур, що дозволяє візуалізувати в динаміці зміну їхньої морфології та фенотипу методами люмінесцентної мікроскопії та імуноцитохімії.

Результати нашого дослідження демонструють здатність ендотеліальних клітин з аорти покращувати регенерацію в ішемізованій тканині, що підтверджує дані інших авторів, які трансплантували клітини-попередники різного походження. За допомогою інструментальних та гістологічних методів нами встановлено, що ендотеліальні клітини-попередників з аорти миші, трансплантовані локально як у формі суспензії, так і з попереднім заселенням у гідрогель, реалізують виражені регенеративні ефекти на ішемізовану м'язову тканину в мишей з моделлю критичної ішемії кінцівок, що проявляється у

відновленні рівня перфузії тканини та покращенні її цитоархітектоніки в ранні періоди після трансплантації (через 2 та 4 тижні відповідно). Проте, через 8 тижнів після трансплантації гідрогелів, заселених ендотеліальними прогеніторами, ця тенденція не зберігалась, що може свідчити про лімітований в часі регенеративний потенціал застосованої терапевтичної дози клітин [194]. З іншого боку, виявлений ефект може підтверджувати теорію, за якою прогеніторні клітини, потрапляючи в осередок пошкодження, з часом зазнають негативного впливу мікрооточення скомпрометованої ніші та не можуть тривало реалізовувати свій регенеративний потенціал на належному рівні. У цьому випадку актуальною може стати повторна трансплантація клітин або носіїв, заселених ними, для пролонгації та посилення очікуваних терапевтичних ефектів.

Відомо, що в регенерації ішемічного пошкодження через паракринні механізми беруть участь різні типи клітин за допомогою продукції численних цитокінів, хемокінів і факторів росту. Зокрема, у дослідженні Kwon Y. та ін. внутрішньом'язова ін'єкція в ішемізовану кінцівку кондиційного середовища, отриманого з ММСК, оброблених TNF- α , запобігала некрозу тканин та втраті кінцівки, стимулювала кровотік та ангіогенез в ішемізованій ділянці. Ін'єкція рекомбінантних білків IL-6 та IL-8 призвела до посиленої міграції внутрішньовенно трансплантованих ендотеліальних прогеніторів в ішемізовану кінцівку та покращила перфузію тканин *in vivo* [189]. Тобто, за допомогою додавання специфічних ростових факторів та цитокінів можна досягти потенціювання терапевтичних ефектів різних типів стовбурових клітин, зокрема, при ішемічних пошкодженнях, що супроводжуються ендотеліальною дисфункцією.

Надзвичайно важлива також безпосередня міжклітинна взаємодія, яка може реалізуватись через взаємне доповнення функцій різних типів клітин. Численні доклінічні дослідження свідчать, що оптимізоване формування кровоносних судин може потребувати паракринних і структурних внесків від кількох типів попередників: проангіогенних мієлоїдних, диференційованих з ГСК; циркулюючих або резидентних ендотеліальних, що утворюють капіляри; судин-стабілізуючих периваскулярних, похідних з мезенхімальних стовбурових клітин [283].

В експериментальному дослідженні Park J. та ін. на моделі ішемії кінцівок миші ко-трансплантація ендотеліальних клітин із клітинами гладких м'язів покращила кровопостачання та збільшила швидкість відновлення в ішемізованих кінцівках, порівнюючи з трансплантацією лише ендотеліальних або м'язових клітин. Крім того, така ко-трансплантація стимулювала ангиогенез і призводила до активного утворення капілярів і артерій *in vivo* [273]. Однак, в іншому дослідженні Amani S. та ін. комбінована терапія з ММСК і опасистих клітин у щурів із моделлю критичної ішемії кінцівок призвела до зменшення терапевтичного ефекту. Водночас, автори відзначають, що комбінація гідрогелю та прогеніторних клітин реалізує більший ангиогенний потенціал у місці ішемії, ніж кожен агент окремо [29]. Це є додатковим підтвердженням, що просторова організація трансплантата і контактна взаємодія клітин є важливими для реалізації регенеративного потенціалу. У нашому дослідженні розроблено методику заселення ендотеліальних прогеніторних клітин в карбомерний гідрогель, який сприяє формуванню тривимірної мережі клітин та забезпечує трофіку трансплантата і міжклітинний сигналінг.

Результати доклінічної оцінки морфологічних, імунофенотипічних та функціональних характеристик ендотеліальних прогеніторних клітин можуть бути успішно трансльовані для подальших клінічних досліджень ефективності клітинної терапії ішемічних пошкоджень з використанням клітин ендотеліального ряду. На сьогодні відомі численні клінічні випробування клітинної терапії критичної ішемії кінцівок з використанням різних типів стовбурових клітин [116, 288, 360]. У рандомізованому дослідженні SCelta (NCT02454231) порівнювали безпеку та терапевтичні ефекти збагачених циркулюючих EPCs із моноклеарними кісткового мозку. У пацієнтів, які отримували EPCs, спостерігалася позитивна кореляція між кількістю введених клітин і збільшенням перфузії м'язів, а кількість ампутацій та смертей в обох групах була нижчою, порівнюючи з контролем [223]. У іншому проспективному рандомізованому сліпому дослідженні (NCT02089828) очищені CD34⁺ клітини не поступалися моноклеарам периферичної крові при лікуванні індукованої ангиїтом критичної ішемії кінцівок і сприяли більш ранньому усуненню проявів ішемії [89].

Водночас, на регенеративний потенціал ендотеліальних клітин-попередників можуть суттєво впливати лімітуючі фактори як з боку донора, так і з боку реципієнта. Зокрема, було показано, що проліферація, адгезія та міграція ендотеліальних прогеніторів у пацієнтів з цукровим діабетом у відповідь на гіпоксію були значно знижені, порівнюючи з контролем. Крім того, мобілізація клітин з кісткового мозку та залучення в ішемізовану тканину були значно пригнічені в мишей з моделлю цукрового діабету. Клітини, введені системно, покращили, але повністю не нормалізували відновлення ішемізованої тканини [235].

Також у більшості клінічних випробувань використовували аутологічні клітини, які були вже пошкоджені хронічним захворюванням, а тому продемонстрували низьку виживаність у середовищі ішемії та дисфункцію внаслідок супутніх атеросклеротичних або діабетичних уражень [283]. Крім того, існує низка інших обмежень для коректного порівняння клінічних досліджень, разом із стандартизацією тяжкості захворювання, типу, дози, шляху та частоти введення клітин [127].

Отже, застосування ендотеліальних прогеніторів, які за морфологічними, імунофенотипічними та функціональними характеристиками відповідають належним критеріям якості, може сприяти проангіогенному потенціалу клітинної терапії. При цьому заселення таких клітин в об'ємні тривимірні конструкції забезпечує їхню належну просторову самоорганізацію для максимально ефективної контактної та паракринної взаємодії як між собою, так і з тканинами реципієнта в місці імплантації. Окрім того, такі об'ємні носії дозволяють підтримувати трофіку донорських клітин, продукцію ними сигнальних молекул та ростових факторів для більш тривалого виживання трансплантата та реалізації ним належних терапевтичних ефектів.

Успішна трансляція отриманих доклінічних результатів у подальших великих, добре спланованих плацебо-контрольованих клінічних дослідженнях підвищить безпеку та ефективність клітинної терапії захворювань серцево-судинної системи, які супроводжуються ендотеліальною дисфункцією, що є одним з актуальних завдань сучасної регенеративної медицини.

7.4 Обговорення результатів дослідження тканиноспецифічних прогеніторних клітин з міокарда

За результатами досліджень нами було розроблено методики отримання резидентних стовбурових клітин міокарда ссавців (пат. України 149486). Продемонстровано, що для формування кардіосфер з первинних культур експлантів біопатів серця необхідною умовою є наявність кардіотрофіну, як ростового фактора, та послідовна зміна полі-D-лізину і фібронектину, як субстратів росту. Вважають, що наявність додаткових екзогенних ростових факторів та компонентів позаклітинного матриксу є необхідною умовою для отримання кардіосфер та популяції кардіальних прогеніторних клітин з них [68]. Полі-D-лізин належить до кількох типів гомополімерів лізину з молекулярною масою 50-150 kDa та є синтетичним екстрацелюлярним матриксом. Фібронектин – це високомолекулярний (~500-600 кДа) глікопротеїн позаклітинного матриксу, який зв'язується з мембранними рецепторними білками інтегринами. Як експансія клітин, так і їх диференціювання залежать від властивостей поверхні культурального субстрату. Зокрема, полікатіонні властивості молекули полі-D-лізину дозволяють взаємодіяти з аніонними сайтами мембрани, сприяючи їх більш ефективному прикріпленню до поверхні росту. Молекула фібронектину містить RGD-послідовність амінокислот (Arg-Gly-Asp), яка є місцем прикріплення через інтегрини $\alpha 5\beta 1$ і $\alpha V\beta 3$ на поверхні мембрани. Фібронектин також зв'язується з іншими білками позаклітинного матриксу, такими як колаген, фібрин і протеоглікани гепарансульфату. Тобто, основна функція зазначених компонентів – поліпшення адгезії клітин до культуральної поверхні, сприяння проліферації, морфогенезу, диференціюванню та міграції [399].

Відомо, що клітини, виділені з кардіосфер, мають високий проліферативний потенціал та здатні диференціюватися в ендотеліальні, гладком'язові клітини, а також у кардіоміоцити. Імунофлуоресцентне дослідження з конфокальною мікроскопією підтверджує високу проліферативну активність кардіосфер за експресією Ki-67. При цьому проліферуючі клітини активно експресують connexin-43 та альфа-саркомерний актин, що вказує на високий потенціал

інтеграції електричної провідності між клітинами. При співкультивуванні з кардіоміоцитами новонароджених щурів CSCs людини та свині проявляють біофізичні характеристики кардіоміоцитів, разом із синхронізацією переносу кальцію між сусідніми клітинами. Важливо, що після 3-х та більше пасажів (6 подвоєнь популяції, 60 діб у культурі) не виявляють відхилень у каріотипі [306]. У нашому дослідженні отримано проліферуючі культури кардіальних прогеніторів з міокарда новонароджених та дорослих мишей. Про високий потенціал інтеграції клітин та збереження їхньої збудливості свідчить поява ритмічної скоротливої активності як у кардіосферах, так і в моношарових культурах під час їх термінального диференціювання.

За даними літератури, ключовими маркерами для прогеніторних клітин з міокарда є CD90, CD105, CD117 (c-kit). Окрім того, CSCs можуть помірно експресувати маркер гемопоетичних стовбурових клітин CD34, ендотеліальний маркер CD31 та рецептор судинного ендотеліального фактора росту (VEGF) CD309. При цьому вони є негативними за маркерами MDR1, CD133 і CD45, що суттєво відрізняє їх від кістковомозкових та циркулюючих ендотеліальних прогеніторів, які можуть заселяти серце. При термінальному диференціюванні ці клітини починають експресувати типові для кардіоміоцитів маркери troponin I, troponin T, важкі ланцюги міозину та connexin-43. Деякі з трансплантованих тваринам CSCs також здатні утворювати судинні структури та експресувати α -актин гладких м'язів [43]. У нашій роботі за допомогою проточної цитометрії та імуноцитохімічного дослідження було встановлено, що за імунофенотипічними характеристиками експресії низки маркерів отримані культури клітин з міокарда відповідають фенотипу CSCs і можуть бути використані в подальших дослідженнях. На ранніх пасажах у культурах клітин з експлантів міокарда новонароджених мишей наростала експресія мезенхімальних маркерів CD44, CD105 та CD90. Відмічено присутність мінорної популяції клітин CD34⁺117⁺ які за фенотипом відповідають кардіальним прогеніторним клітинам. У термінально диференційованих культурах було виявлено спонтанну ритмічну скоротливу активність *in vitro*, а також підтверджено експресію кардіального тропоніна I, рецептора фактора росту ендотелію судин VEGFR-2 (CD309) і ендотеліального маркера CD31 [195].

Продемонстровано, що в новонароджених мишей у тканині міокарда міститься більша кількість клітин з експресією маркерів мультипотентних прогеніторів, ніж у дорослих тварин. При цьому відносний вміст таких клітин є більшим у передсердях, ніж у шлуночках. Тому пріоритетним напрямом подальших досліджень є виділення та культивування клітин з міокарда саме новонароджених мишей, зокрема – з ділянки вушок передсердь. Отримані результати підтверджують дані Chan H. та ін., що також продемонстрували відмінності в проліферативному потенціалі та експресії маркерів клітин з передсердь та шлуночків [63]. Оскільки кардіосфери мають досить великий розмір, вони не можуть бути застосовані, наприклад, інтракоронарно через ризик емболії мікросудин. Тому додатковий етап передбачає дисоціацію кардіосфер або їх повторне культивування на поверхні з фібронектином.

Експерименти на мишах були успішно трансльовані на біоптатах серця від людини, унаслідок чого вдосконалено технології виділення та культивування тканиноспецифічних прогеніторних клітин з міокарда, які експресували специфічні маркери CD90, CD105, CD117 (c-kit), а при подальшому спрямованому диференціюванні – CD31 та тропонін I. Слід зазначити, що отримання культур клітин-попередників з міокарда людини потребує багато часу і займає в середньому від 3-х до 7-и тижнів. Крім того, для нарощування і отримання їх у достатній терапевтичній кількості необхідні як високовартісні реактиви, так і культуральний пластик зі спеціальним покриттям. При цьому необхідно враховувати, що існує висока вірогідність контамінації культур іншими типами клітин, зокрема і фібробластами серця.

Розроблені нами протоколи вирощування стовбурових та прогеніторних клітин належної якості з міокарда мишей та людини можуть бути використані в подальших доклінічних та клінічних дослідженнях для підвищення скоротливої функції серця та покращення його перфузії при патології, що супроводжується важкою серцевою недостатністю як у дорослих пацієнтів, так і новонароджених із вродженими вадами серця.

7.5 Обговорення результатів дослідження впливу старіння на характеристики стовбурових клітин

Питання впливу старіння на фенотипові та функціональні характеристики стовбурових клітин є досить актуальним для сучасної регенеративної медицини. Зміни в стовбурових клітинах, індуковані при асоційованій з віком патології, можуть мати вплив як на ефективність ендогенної репарації на рівні тканини, так і на культуральні та функціональні характеристики клітинного продукту. Відповідно, у разі виготовлення клітинного препарату з біологічного матеріалу від донора похилого віку, виникає об'єктивна настороженість щодо якості та безпеки таких трансплантатів не лише для алогенного, а й для аутологічного застосування.

Вибір оптимального джерела клітин, оцінка їх якості з урахуванням віку та стану здоров'я донора визначають подальшу загальну ефективність і безпеку клітинної терапії. Важливо відмітити, що Україна була одним із новаторів у дослідженні впливу стовбурових клітин на процеси старіння. Ще в 70-80-х роках минулого століття в експериментах на мишах, проведених в Інституті геронтології (м. Київ), було встановлено пригнічуючий вплив старого організму на трансплантовані гемопоетичні стовбурові клітини молодих донорів, що пізніше підтверджено в аналогічних дослідженнях у США [54].

Ключова проблема в клінічному застосуванні соматичних стовбурових клітин різного походження полягає в тому, що немає чіткої відповіді на питання, наскільки їхня користь може бути обмежена старінням внаслідок віку донора або множинних поділів, спричинених експансією *in vitro* при нарощуванні необхідної терапевтичної дози. Як відомо, у пацієнтів похилого віку жирова тканина зазнає запальних інволютивних змін, а тому клітини, отримані з неї, можуть суттєво відрізнитись за своїм функціональним та регенеративним потенціалом [224]. Окрім того, оскільки необхідний ефект лікування досягається при оптимальній терапевтичній дозі клітин, з метою нарощування необхідної кількості для трансплантації саме в старших пацієнтів часто виникає потреба їх більш тривалого культивування.

Клітини на ранніх строках у культурі можуть відрізнитись за деякими характеристиками від ММСК на пізніх пасажах. Стимульоване їх розмноження поза організмом може супроводжуватись накопиченням мутацій, зміною експресії генів, активацією апоптозу та продукцією асоційованих із старінням молекул, які характерні для старіючих клітин у тканинах *in vivo* [395]. Саме тому актуальним завданням є з'ясування впливу цих процесів на проліферативний, диференціувальний, імуномодулюючий та репаративний потенціали ММСК як в умовах фізіологічного, так і індукованого старіння.

Присутність сенесцентних клітин у клітинних препаратах небажана, оскільки це знижує їхню життєздатність, потенціал диференціювання та трофічні можливості [404]. Якщо розглядати жирову тканину, як джерело ММСК, то SASP-фенотип стосується не лише зрілих адипоцитів, а й стовбурових клітин SVF, що позначається на їхньому потенціалі до проліферації, диференціювання, а також може індукувати апоптоз у сусідніх клітинах реципієнта після трансплантації.

Відомо, що вік донора відіграє важливу роль у експресії клітинами поверхневих маркерів. Існують дані, що під час експансії ММСК, зокрема кісткового мозку, у культурі *in vitro* відбувається сенесценція клітин та зниження здатності до диференціювання, але при цьому експресуються нормальні рівні стандартних поверхневих маркерів. Окрім того, на їхню експресію можуть впливати: тривалість субкультивування, міжклітинні контакти, адгезія до пластику, вплив факторів росту та ферментів [83, 119].

У нашому дослідженні не було виявлено статистично значущих відмінностей у експресії типових поверхневих маркерів ММСК (CD73, CD90 та CD44) між псевдооперованими та оваріоектомованими мишами обох вікових груп, а також відмінностей між оваріоектомованими молодими і старими тваринами. При цьому в старих мишей більший відсоток клітин експресували маркер CD44 на більш високому рівні, ніж у молодих [358]. Відомо, що CD44 як трансмембранний глікопротеїн, бере участь у забезпеченні формування і функціонування ніші стовбурових клітин та підтриманні їх у спокої, визначає здатність до агрегації та міграції.

Zhu H. та ін. виявили, що ММСК активуються тромбоцитарним фактором росту (platelet-derived growth factor – PDGF) для підвищення експресії молекули адгезії CD44, відповідальної за міграцію алотрансплантата, за допомогою зв'язування з гіалуроновою кислотою позаклітинного матриксу [412]. Spaeth E. та ін. показали, що дефіцит CD44 призводить до відносного зменшення внеску клітин кісткового мозку в строму пухлини. Пригнічення CD44 у ММСК обмежувало експресію асоційованих із раком маркерів, індукованих кондиціонуванням пухлини, і такі ММСК погано мігрували та забезпечували слабку ангиогенну підтримку [327].

Виявлені в роботі факти вказують на те, що імунофенотип ASCs і, ймовірно, їх кількість у жировій тканині суттєво не змінюються з віком, що підтверджено в дослідженнях як у людей, так і тварин, опублікованих іншими дослідниками. Raschon-Pena G. показав, що популяції стовбурових клітин жирової тканини та ММСК кісткового мозку проявляють загальний профіль експресії багатьох поверхневих антигенів, зокрема CD29, CD49c, CD147, CD166 та HLA-abc. При цьому спостерігались значні відмінності в експресії CD34 та спорідненого йому білка PODXL, CD36, CD49f, CD106 та CD146. ASCs демонстрували більш виражену здатність до адипогенного диференціювання, порівнюючи з ММСК кісткового мозку, але не було виявлено відмінностей в здатності до остеогенного диференціювання. Автори це пов'язують зі зміною профілю експресії генів в умовах експонентної фази росту в культурі [269]. Водночас, старі ASCs характеризуються підвищеною експресією генів прозапальних цитокінів і мікроРНК (IL-8, IL-1 β , TNF- α , miR-203b-5p і miR-16-5p), а також маркерів апоптозу (p21, p53, каспаза-3, каспаза-9) [144].

У дослідженні Li K. та ін. не було суттєвих відмінностей в більшості поверхневих маркерів між ASCs від 1-місячних або 20-місячних мишей [216]. У дослідженні Muñoz M. та ін. не було виявлено істотних відмінностей у експресії поверхневих маркерів на ASCs у щурів віком 2, 9 та 24 місяці [249]. Водночас, ASCs, отримані від коней старше 5 років, проявляли кілька молекулярних змін, які помітно обмежують їхню регенеративну здатність [26].

У нашій роботі продемонстровано, що ММСК з жирової тканини старих тварин уже після другого пасажу демонструють зменшення проліферативного та клоногенного потенціалу, що співпадає з даними інших авторів [66, 225]. При цьому відбувається посилення адипогенного диференціювання *in vitro* в порівнянні з молодими тваринами та зниження остеогенного потенціалу. Це можна пояснити формуванням внутрішніх змін в ММСК з жирової тканини в процесі старіння внаслідок хронічного запалення і метаболічних порушень, пов'язаних з формуванням асоційованого зі старінням SASP-фенотипу.

Liu M. та ін. також показали, що хоча ASCs людини з різних вікових популяцій фенотипово схожі, вони демонструють значні відмінності на функціональному рівні і похилий вік має негативний вплив на потенціал адипогенного та остеогенного диференціювання ASCs [225]. Водночас, Zhang P. та ін. припустили, що похилий вік і супутня патологія не впливають негативно на ізоляцію ASCs, і вони зберігають високу здатність набувати фенотип ендотеліальних клітин протягом усього життя [401].

Слід зазначити, що оваріоектомія і в молодому віці призводить до зменшення проліферативного та клоногенного потенціалів ММСК з жирової тканини до рівня показників старих тварин, що також підтверджує дані інших дослідників [225]. При цьому додатково відбувається посилення адипогенного диференціювання *in vitro* в порівнянні з контрольною групою відповідного віку, що може бути причиною активації адипогенезу *in vivo* та збільшення маси тіла після оваріоектомії в молодих мишей, описаних іншими авторами [110, 204, 295]. Хоча, Chen H. та ін. виявили, що час подвоєння ASCs в обох вікових групах підтримувався нижче 70 годин, тому вік і численні пасажі менше впливають на проліферацію та остеогенне диференціювання ASCs, ніж у культурах ММСК, отриманих з кісткового мозку [66].

Також відомо, що в жінок у постменопаузі стовбурові клітини з жирової тканини мають підвищений потенціал адипогенного диференціювання під впливом короткочасного замісного введення 17 β -естрадіолу [213]. Загалом, ці патогенетичні механізми можуть лежати в основі розвитку ожиріння та метаболічного синдрому, асоційованих з менопаузою.

Отже, терапевтичний успіх клітинної терапії може залежати від багатьох факторів, разом із віком донора. У дослідженні Liu M. та ін. було показано негативний вплив віку донорської жирової тканини на властивості ММСК з жирової тканини людини: як кількість колонієутворюючих одиниць фібробластів, так і загальна кількість клітин, отриманих з SVF, а також швидкість їхньої проліферації знижуються. Крім того, спостерігалось порушення міграційної здатності клітин, отриманих від старих донорів, що пояснюється зниженою експресією хемокінових рецепторів, таких як CXCR4 і CXCR7 [225]. Тому для підвищення ефективності трансплантації клітин, зокрема аутологічної, доцільно кріоконсервувати ММСК з жирової тканини саме в молодому віці і при цьому з мінімальною кількістю пасажів. Ще одним підходом може бути блокування в культурі лігандів CCL7-CCL2-CCR2 для усунення впливу вікових змін у ММСК з жирової тканини через сигнальний шлях хемокінів, що описано Li K. та ін. [216].

Для регенеративної медицини важливо, що із старінням організму зменшується проліферативна здатність ММСК з жирової тканини, підвищується їхній адипогенний потенціал, проте остеогенний істотно не знижується. Нами ж показано, що оваріоектомія в молодому віці призводить до зниження остеогенного потенціалу ММСК з жирової тканини в мишей лінії CBA/Ca, у порівнянні з ММСК з жирової тканини контрольних тварин відповідного віку, що цілком підтверджує провідну роль естрогенів у остеогенному комітуванні ММСК, зокрема роль 17β -естрадіолу в підтримці росту та диференціювання через рецептор ER α . Крім того, 17β -естрадіол в нормальних умовах стимулює ММСК до експресії остеогенних генів лужної фосфатази, колагену I і TGF- β 1.

Враховуючи, що ММСК з жирової тканини від донорів чоловічої та жіночої статі експресують рецептори андрогенів, але низький рівень рецепторів естрогенів (ESR1 і ESR2) [388], можна припустити, що функціональний потенціал цих клітин у жінок опосередковується рецепторами андрогенів саме через низький рівень чоловічих гормонів. В умовах оваріоектомії рівень андрогенів знижується ще більше, що може вплинути на терапевтичні властивості ММСК з жирової тканини.

Загалом, можна припустити, що ММСК з жирової тканини протягом життя зберігають значну свою кількість у жировій тканині та високий функціональний потенціал *in vitro*, що може бути ефективно використано в стратегіях клітинної терапії, особливо в літніх пацієнтів.

Водночас, отримані нами дані свідчать про негативний вплив оваріоектомії, як моделі дисфункції ніші ММСК з жирової тканини, на ультраструктурні характеристики в умовах як двовимірних культур, так і 3D сфероїдів, утворених ММСК з жирової тканини.

Зокрема, значно менше полісом спостерігалось в цитоплазмі ММСК з жирової тканини з групи старих тварин, що свідчить про їхню низьку білково-синтетичну активність. Цитоплазма ММСК з жирової тканини у сфероїдах старих мишей мала значно підвищену кількість ліпідних крапель, порівнюючи з клітинами, отриманими від молодих тварин. Також спостерігалось збільшення кількості крапель ліпідів у цитоплазмі ММСК з жирової тканини як у групі молодих, так і в старих оваріоектомованих мишей, порівнюючи з контрольними тваринами того ж віку [193].

Раніше дослідниками було показано, що 3D культура сфероїдів зменшує свій розмір завдяки збільшенню секреції позаклітинних везикул. Ця подія опосередковується зниженням полімеризації актину (F-актину) [248]. Ймовірно, більший розмір сфероїдних культур ММСК з жирової тканини від старих тварин у нашому дослідженні свідчить про порушення здатності вивільняти мікроевезикули в позаклітинний простір.

Результати дослідження дозволяють припустити, що вік донора суттєво впливає на деякі функціональні характеристики ММСК з жирової тканини *in vitro*. Оваріоектомія та пов'язаний з нею дефіцит естрогенів також впливає на функціональні характеристики ММСК з жирової тканини *in vitro* в молодих мишей, а в процесі старіння додатково активуються певні механізми зниження клоногенного та проліферативного потенціалів стовбурових клітин, що робить їх менш залежними від яєчників.

Можна стверджувати, що дослідження стовбурових клітин в умовах фізіологічного старіння та розуміння впливу статевих гормонів на них дозволить дослідникам і клініцистам модулювати функції цих клітин *in vitro* для отримання максимального терапевтичного ефекту при лікуванні багатьох хвороб та уникнення побічних ефектів. Наші висновки є особливо багатообіцяючими в контексті пильності щодо потенційного клінічного застосування ММСК з жирової тканини від старих донорів.

Важливо зазначити, що вікові відмінності, виявлені при порівнянні характеристик культур ММСК з жирової тканини від молодих і старих мишей, мають системний характер на рівні організму. Зокрема, при дослідженні стовбурових клітин міокарда також встановлено, що показники експресії маркерів CD90, CD73, CD105 та CD34 були суттєво нижчими як у матеріалі зі шлуночків, так і з передсердь серця дорослих мишей віком 5 міс, у порівнянні з новонародженими тваринами. При цьому культура клітин від дорослих мишей досягала конфлюентного стану суттєво повільніше та мала гіршу скоротливу активність, у порівнянні з культурою прогеніторів від новонароджених мишей [195]. Тобто, використання прогеніторних клітин з міокарда, отриманого від пацієнтів більш раннього віку, при аутологічній трансплантації буде мати кращу ефективність.

Виявлені у нашому спільному дослідженні з Квітницькою-Рижовою Т. Ю. та ін. відмінності морфологічних показників регенерації міокарда при трансплантації прогеніторних клітин кісткового мозку мишам різного віку із змодельованою кардіоміопатією свідчать про додаткову важливість врахування індивідуальних особливостей реципієнта при виборі стратегії персоналізованої клітинної терапії [5].

Отже, підтверджено, що вік донора може суттєво впливати на характеристики різних типів соматичних стовбурових та прогеніторних клітин, визначаючи відмінності в реалізації ними свого регенеративного потенціалу при подальшій трансплантації. З іншого боку, вік реципієнта теж матиме суттєвий вплив на ніші стовбурових клітин, заселення та приживлення трансплантату в яких може бути порушеним.

Наразі докладаються значні зусилля для відкриття більш специфічних біомаркерів старіння клітин, оптимізованих комбінаторних стратегій та розробки нових методів їх виявлення. Отримані дані щодо імуномодулюючого та репаративного потенціалу ММСК в умовах старіння важливі як для розуміння фундаментальних механізмів регенерації тканин і органів, так і в прикладному аспекті – для корекції терапевтичної тактики з використанням стовбурових клітин при багатьох захворюваннях. Розроблені критерії оцінки сенесцентних культур будуть корисними для швидкого аналізу кількості старіючих клітин на різних етапах виготовлення клітинних препаратів. Загалом, встановлення характеристик сенесцентних культур дозволить отримати нові знання про механізми старіння та визначити перспективні напрями його корекції, зокрема з використанням клітинних технологій. Надійна оцінка та ідентифікація маркерів старіння має не тільки вирішальне значення для кращого розуміння його біології, але й необхідна для розробки діагностичних і терапевтичних стратегій, спрямованих для націлювання на старіння в клініці. Тому необхідно приділяти особливу увагу науково обґрунтованим підходам з оцінки не лише якості та безпеки клітинних препаратів, а й функціонального стану ніш в організмі реципієнта, що стане новим підходом у прецизійній регенеративній медицині.

В роботі були визначені цитологічні та функціональні маркери індукованого старіння культур ММСК жирової тканини у віковому аспекті. Уперше розроблені критерії доклінічної оцінки дво- та тривимірної культури ММСК від тварин різного віку з використанням комплексу цитологічних методів. Такі дослідження можуть бути особливо корисними для оцінки кількості старіючих клітин на різних етапах виготовлення клітинних трансплантатів. Це підвищить ефективність біотехнологічного процесу і дасть максимальний вихід кінцевого високоякісного продукту. На моделі гетерохронних культур ММСК також можуть бути встановлені ефекти взаємного впливу молодих та старіючих клітин на реалізацію імуномодулюючих та репаративних властивостей *in vitro* та *in vivo*. Це дозволить відтворити умови конкурентної взаємодії клітин різного віку в тканинній ніші при трансплантації та отримати нові знання про механізми контактного та безконтактного сигналіngu в реалізації регенеративного потенціалу стовбуровими клітинами.

Малодослідженим також залишається питання впливу потенційних сенотерапевтиків на старіючі клітини для корекції їхнього функціонального стану. На культурах старіючих соматичних стовбурових клітин можна проводити скринінг препаратів-сенолітиків та сеноморфіків для розробки новітніх медикаментозних підходів лікування асоційованої з віком патології. За результатами впровадження запропонованих діагностичних підходів можливе також надання послуг медичним установам у розробці методичних рекомендацій та протоколів доклінічних і клінічних випробувань щодо проведення аутологічних та алогенних трансплантацій стовбурових клітин різного походження з урахуванням вікових аспектів.

Отже, наукова новизна цього фрагменту роботи полягає в комплексній доклінічній оцінці критеріїв якості, безпеки та ефективності культивування ММСК жирової тканини в умовах фізіологічного та індукованого старіння, які можуть відрізнитись за здатністю до проліферації та мультилінійного диференціювання *in vitro* і реалізовувати цей атиповий потенціал вже *in vivo*. Практичне значення фрагменту дослідження полягає в тому, що встановлення на доклінічному етапі ключових маркерів можливої зміни проліферативних та диференціувальних властивостей культивованих клітин стане підґрунтям для розробки стандартизованих протоколів оцінки якості клітинних препаратів, призначених для клінічного застосування в людини, що на сьогодні становить суттєву проблему в аспекті біологічної безпеки.

Отримані нові дані щодо ідентифікації ключових маркерів фізіологічного та індукованого старіння стовбурових клітин на етапі доклінічної оцінки якості біотехнологічних препаратів матимуть важливе прикладне значення для обґрунтування доцільності їх зберігання в кріобанках, можливого використання їх для скринінгу сенотерапевтиків та для перспектив подальшого клінічного застосування з позицій персоналізованої терапії багатьох вік-асоційованих соціально-значущих захворювань, що є одним з пріоритетних завдань сучасної медицини.

7.6 Обговорення комплексної оцінки доклінічних критеріїв якості, безпеки та ефективності соматичних стовбурових клітин

В Україні потреба в сучасних технологіях регенеративної медицини вкрай актуальна: кількість пацієнтів, яким можна допомогти, сягає десятків тисяч, а клініки здатні застосовувати такі методи вже сьогодні [2]. Проте, розробка та впровадження новітніх лікарських засобів прогресивної терапії АТМРс на основі стовбурових клітин для клінічного застосування є досить тривалим та складним процесом, що передбачає певні обов'язкові етапи, які пропонуємо структурувати у вигляді схеми (рис. 7.1). При цьому необхідно дотримуватись низки критеріїв якості, обов'язкових до перевірки на кожному з етапів виготовлення, дослідження, зберігання та застосування клітинних трансплантатів для забезпечення необхідного очікуваного терапевтичного ефекту та недопущення побічних реакцій.

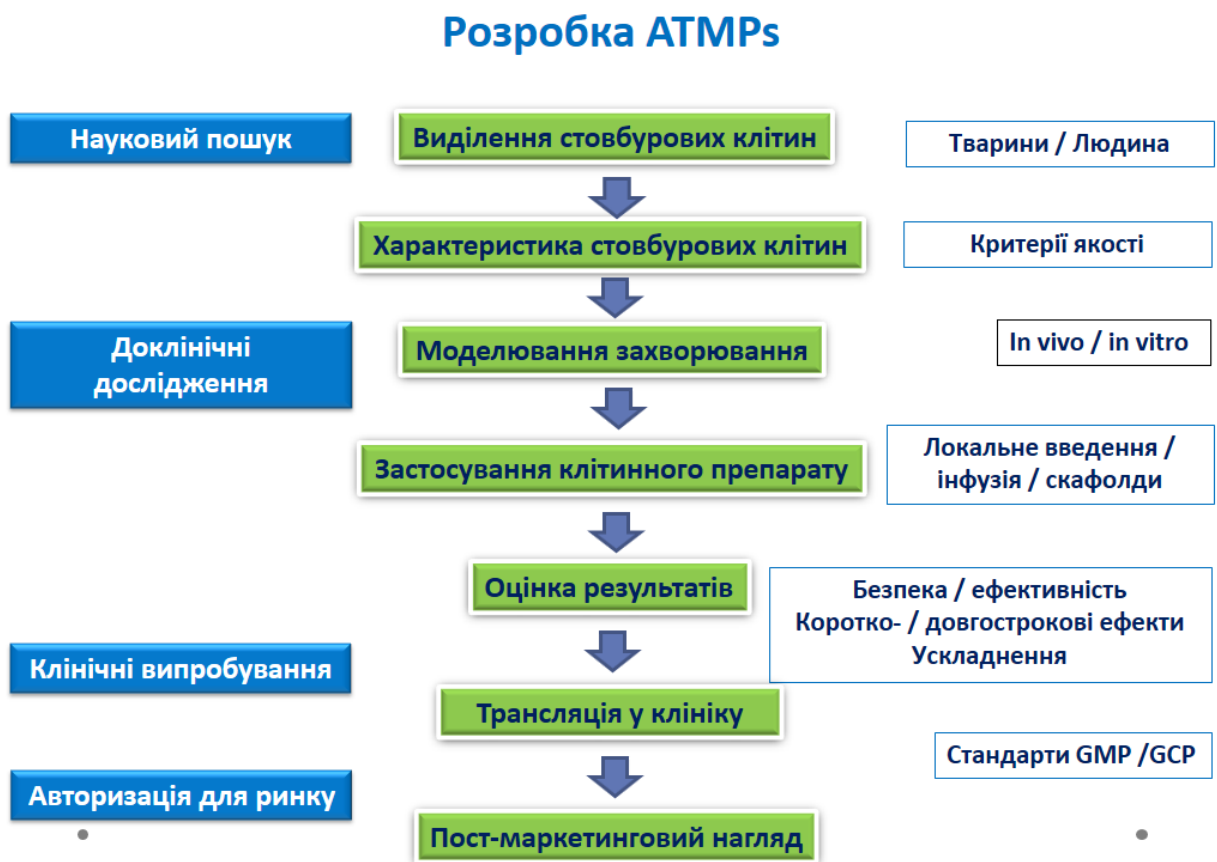


Рисунок 7.1 – Схема розробки та контролю якості лікарських засобів прогресивної терапії на основі стовбурових клітин.

На першому етапі дослідницького пошуку мають бути розроблені технології виділення певного типу стовбурових клітин з детальною їх цитологічною, молекулярно-генетичною та функціональною характеристикою в культурі *in vitro*. Джерелом соматичних стовбурових клітин для подальшої оцінки їхнього регенеративного потенціалу можуть бути як тканини спочатку від тварин, так і відразу від людини. Пріоритетними критеріями у виборі джерела клітин є доступність та безпека для донора, а також етичні та юридичні складові, пов'язані, наприклад, з ембріональними або фетальними клітинами [16].

У випадку використання клітин від людини необхідно враховувати критерії безпеки біологічного матеріалу не лише для майбутнього реципієнта, а й для оператора, який буде з ними працювати. Для цього важливими є первинне тестування крові донора та тканин від нього на збудників інфекційних хвороб з використанням низки рутинних методів.

В Директиві 2006/17/ЄС Європейського Парламенту і Ради від 08.02.2006 р. наведено перелік лабораторних тестів, які необхідно проводити донорам тканин та/або клітин, за винятком репродуктивних [74]. Проте, цією Директивою не враховуються усі технологічні аспекти забору, обробки, зберігання та передачі для використання клітин, тканин та продуктів, виготовлених з них, і не врегульовані питання їх тестування. Обмеження тестуванням лише донора несе загрозу не тільки інфікування реципієнта, а й може впливати на загальну ефективність та безпеку клітинної терапії.

Відповідно до міжнародних стандартів щодо діяльності банків пуповинної крові International Standards for Cord Blood Collection, Banking, and Release for Administration. Accreditation Manual, а також за рекомендаціями Content and Review of Chemistry, Manufacturing, and Control Information for Human Somatic Cell Therapy Investigational New Drug Applications, виданими FDA США, визначено перелік тестувань, що мають бути проведені для клітинних та тканинних продуктів, які виготовляються, зберігаються та призначені для клінічного застосування [99, 253].

Якщо мова йде про тканини фетоплацентарного комплексу, то ще до етапу забору біологічного матеріалу проводяться низка заходів, спрямованих на ефективний скринінг донорів – вагітних жінок, у яких передбачається забір пуповинної крові, пуповини або плаценти під час пологів. Донорство таких тканин проводиться на засадах добровільної інформованої згоди з врахуванням протипоказань. Пуповинну кров, пуповину та тканину плаценти можна отримувати в породіллі з неускладненим перебігом вагітності за відсутності екстрагенітальної патології. Протипоказаннями для такого донорства мають бути: інфекційні захворювання; гепатити вірусної етіології; жовтяниця нез'ясованої етіології; група ризику ВІЛ інфекції; сифіліс в анамнезі; злоякісні пухлини; аутоімунні захворювання; системні захворювання сполучної тканини; дегенеративні неврологічні захворювання; радіаційна або хіміотерапія в анамнезі; наркоманія, прийом токсичних речовин; прийом гормональних препаратів. Виключаються також жінки, вагітність яких відбувалася на фоні акушерської та екстрагенітальної патології, а саме: гестози другої половини вагітності; загроза переривання вагітності; фетоплацентарна недостатність; внутрішньоутробна патологія розвитку плоду; гіпоксія, гіпотрофія плоду; імунологічний конфлікт з плодом; гемотерапія в останні 3 тижні вагітності.

Відповідно до наказу МОЗ України "Про організацію амбулаторної акушерсько-гінекологічної допомоги в Україні" від 15.07.2011 р. № 417 усі вагітні мають обов'язково проходити серологічне обстеження на сифіліс (визначення антитіл до *Treponema pallidum* методом ELISA, на наявність ядерного антигену вірусу гепатиту В, тест на вірус імунодефіциту людини 1 та 2. Для донорів пуповинної крові та плаценти додатково методом полімеразної ланцюгової реакції визначають наявність ДНК вірусів гепатиту В та С, вірусів Епштейн-Барр (EBV) та вірусу герпесу людини типу 6 (HHV6), імуноферментним методом – антитіла до вірусу гепатиту С.

Згідно зі стандартами FDA ключовими властивостями клітинного продукту є безпека, чистота, активність та спорідненість [100]. Оцінка безпеки препаратів стовбурових клітин передбачає тестування на збудники інфекційних захворювань,

стерильність, а при неродинній трансплантації гемопоетичних клітин – також аналіз гемоглобіну для виключення гомозиготних гемоглобінопатій. Основними показниками чистоти та активності такого клітинного продукту є загальний вміст ядровмісних клітин, їхня життєздатність та абсолютний вміст CD34⁺ клітин. Оцінка спорідненості клітин, що визначає їхню сумісність з клітинами реципієнта, передбачає типування за системою антигенів головного комплексу гістосумісності (HLA), визначення групи крові та резус-фактора.

Для виключення присутності інфекційних збудників зразки пуповинної крові та плаценти повинні підлягати обов'язковому тестуванню методом PCR на вірус ВІЛ типу 1 та 2, вірус гепатиту В та С, цитомегаловірус (HCMV), *Treponema pallidum*. Додатково матеріал з амніотичної оболонки після пологів може бути протестований на вірус простого герпесу типу 1 та 2 (HSV-1/2), *Chlamydia trachomatis*, *Toxoplasma genitalium*, *Ureaplasma spp.*, а якщо у вагітної було виявлено антитіла класу IgG до токсоплазми, матеріал плаценти також тестують на ДНК *Toxoplasma gondii*. Тестування на Т-лімфотропний вірус людини типу I та II (HTLV), яке рекомендоване в США, не є обов'язковим в ЄС і проводиться лише для окремої популяції донорів з високим ризиком інфікування. Аналогічно тестування на *West Nile Virus* та *Trypanosoma cruzi* може проводитись лише для вагітних з ендемічних зон по лихоманці Західного Нілу та хвороби Шагаса відповідно. У випадку позитивних результатів дослідження крові вагітної, пуповинної крові або плаценти на зазначені інфекції, отриманий біологічний матеріал не може бути використаний для подальшого процесингу та має підлягати знищенню з дотриманням норм біологічної безпеки.

Клітинний препарат, безумовно, має бути стерильним. Перевірку стерильності клітинних препаратів різного походження можна проводити за методикою "Дослідження на стерильність зразків консервованої крові, її компонентів, препаратів, консервованого кісткового мозку, плазмозаміщуючих та консервуючих розчинів", затвердженою наказом МОЗ України № 164 "Про затвердження інструкцій, регламентуючих діяльність закладів служби крові України" від 05.07.1999 р.

Препарати стовбурових клітин підлягають мікробіологічному дослідженню на аеробну та анаеробну мікрофлору. Для запобігання пірогенних реакцій при введенні клітинних препаратів додатково проводиться тест на визначення бактерійних ендотоксинів (Limulus Lysate Test – LAL test). При позитивному результаті досліджень на стерильність приготовані препарати підлягають вилученню зі сховища та знищенню. При негативному результаті мікробіологічного дослідження зразки препаратів культивованих клітин додатково можуть бути протестовані методом PCR на наявність інфекційних збудників роду *Mycoplasma* та ДНК вірусів герпесу, цитомегаловірусу, вірусу герпесу 6 типу. Матеріал плаценти також має підлягати патогістологічному дослідженню для підтвердження нормальної будови тканини плаценти та відсутності ознак її дисфункції, що можуть вплинути в подальшому на якість та безпеку клітинних продуктів.

Контроль якості первинних культур соматичних стовбурових клітин на етапі процесингу передбачає відповідність їх певним *in vitro* критеріям типоспецифічності та функціональної активності за допомогою мікроскопічного аналізу культури, імунофенотипування на специфічні маркери, визначення життєздатності, колонієутворюючої активності та потенціалу диференціювання. Протягом усього часу культивування за допомогою інвертованого мікроскопа проводиться візуальний контроль клітин для оцінки їхньої морфології, швидкості проліферації, відсутності контамінації бактеріальною або грибовою мікрофлорою. Зміна морфології та швидкості подвоєння популяції клітин може вказувати на старіння культури, контамінацію її мікоплазмою, невідповідність умов культивування потребам цільових популяцій клітин. Культури, в яких виявлено мікробну флору, підлягають додатковому дослідженню для ідентифікації збудника, встановлення ймовірних шляхів забруднення та подальшому знищенню.

Одним з ключових кількісних показників, що визначає якість клітинного препарату, є життєздатність клітин. Абсолютна кількість та відносний вміст життєздатних клітин можуть бути підраховані під мікроскопом у гемоцитометрії

Ньюбауера або за допомогою автоматичного лічильника клітин після додавання вітальних барвників Trypan Blue, Acridine Orange, Propidium Iodide. Більш точним є визначення життєздатності за проникненням у клітини з пошкодженою мембраною 7-аміноактиноміцину D (7-AAD) з подальшим підрахунком таких клітин на лазерному проточному цитометрі. Наприклад, за рекомендаціями FDA загальний вміст ядровмісних клітин перед кріоконсервуванням має складати не менше 5×10^8 на одиницю пуповинної крові, а їхня життєздатність – не менше 85 %. Абсолютний вміст CD34 клітин при цьому має бути не менше $1,25 \times 10^6$ при життєздатності понад 85 % [100]. За результатами наших досліджень ММСК з різних джерел показник відносного вмісту життєздатних клітин для клітинних препаратів високої якості має становити не менше 90 %, а обмежено допустимим є використання препаратів із показником 80-90 %.

Зберігання препаратів стовбурових клітин має здійснюватися в спеціалізованих кріосховищах у парах рідкого азоту при температурі -196°C . Не допускається розморожування і повторне заморожування зразків. Окремий репрезентативний зразок, наприклад, гемопоетичних клітин має бути розморожений перед застосуванням препарату для повторної оцінки у ньому загального вмісту ядровмісних та CD34 клітин, а також життєздатності CD34 (не менше 70 %) та CD45 клітин (не менше 40 %). Окрім оцінки життєздатності, після розморожування зразків гемопоетичних клітин повторно має визначатись колонієутворююча активність за потенціалом до формування еритроїдних та гранулоцитарно-макрофагальних колоній у культурі *in vitro*. Для препаратів культивованих ММСК важливо дотримуватись показника відносного вмісту життєздатних клітин після розморожування не менше 85 %.

Мультипараметричне імунофенотипування мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин з різних джерел передбачає визначення відповідності отриманої культури мінімальним критеріям до ММСК, затверджених Міжнародним товариством з клітинної терапії (International Society for Cellular Therapy – ISCT) [88]. Крім адгезії до пластику *in vitro*, понад 95 % цього типу клітин мають експресувати маркери CD105, CD73 та CD90 і при цьому

менше 2 % клітин у культурі можуть експресувати маркери гемопоетичних клітин CD45, CD34, CD14 або CD11b, CD79 α або CD19 та HLA-DR. Важливо відмітити, що культури активованих ММСК, особливо кісткового мозку, можуть експресувати молекули головного комплексу гістосумісності класу HLA-DR на досить високому рівні.

Використання в діагностичних панелях для фенотипування ММСК інших позитивних (CD44, CD106/VCAM-1, STRO-1, CD271/NGFR, CD200, Ganglioside GD2, Frizzled-9, TNAP, SUSD2) або негативних (CD2, CD3, CD15/Lewis X, CD16/Fc γ RIII, CD38, CD56, CD66b/CEACAM-8, CD123/IL-3R α , CD235a/Glycophorin) маркерів не обмежується, проте має бути обґрунтовано з позицій наукової, клінічної, а часом, і економічної доцільності. Відносний та абсолютний вміст CD34⁺ клітин у препаратах гемопоетичних стовбурових клітин (з кісткового мозку, пуповинної крові, плаценти) також має бути визначено методом проточної цитометрії за протоколом ISHAGE за допомогою відповідних моноклональних антитіл, кон'югованих з флуорохромами [335].

Під час дослідження було розроблено та апробовано діагностичні панелі моноклональних антитіл, наведених у додатку 4, для мультипараметричного імунофенотипування методом проточної цитометрії соматичних стовбурових клітин різних типів від експериментальних тварин та людини. Також було розроблено протоколи імунофенотипування ендотеліальних прогеніторних клітин за експресією маркерів CD34, CD31 та CD309 (VEGFR2) [194]. Додатково, як базовий контроль ефективності гейтування, розроблено протокол сортування з високою життєздатністю стовбурових клітин кісткового мозку мишей за результатами імунофенотипування субпопуляцій коротко- та довгоживучих гемопоетичних прогеніторів Lin⁻Sca-1⁺c-kit⁺, Lin⁻Sca-1⁺c-kit⁺flt3⁺CD150⁻, Lin⁻Sca-1⁺c-kit⁺flt3⁺CD150⁺ та Lin⁻Sca-1⁺c-kit⁺flt3⁻CD150⁻ [197]. Окрім того, у наших спільних дослідженнях з Kuchma M. та ін. за експресією ключового гемопоетичного маркера CD34 встановлено більшу фенотипову гетерогенність субпопуляцій гемопоетичних прогеніторів з плаценти людини в порівнянні з прогеніторами з пуповинної крові та фетальної печінки [180, 181].

При цьому також було розроблено протоколи сортування субпопуляцій гемопоетичних прогеніторів з плаценти та пуповинної крові людини методом проточної цитометрії. У спільних дослідженнях з Shablii V. та ін. у культурі ММСК з плаценти людини визначено експресію ключових мезенхімальних (CD90, CD73, CD105) та трофобластних (хоріонічний гонадотропін, пан-цитокератин, рецептор епідермального фактора росту HER2) маркерів [18, 312]. Також розроблено діагностичну панель для фенотипування тканиноспецифічних прогеніторів з міокарда мишей та людини, яка передбачає тестування на маркери CD90, CD44, CD117, CD31 та тропонін I [195].

Підтвердження третього ключового критерію ММСК – мультипотентного потенціалу за здатністю до спрямованого диференціювання *in vitro* в остеобласти, хондробласти та адипоцити, має бути проведене ще на етапі валідації технології виготовлення клітинного продукту і для регулярного контролю якості може не використовуватись. У наших дослідженнях розроблено протоколи підтвердження мультипотентного потенціалу ММСК з кісткового мозку, жирової тканини, плаценти. Для тканиноспецифічних прогеніторних клітин має бути підтверджено диференціювання в зрілі клітини певного типу, що також було продемонстровано нами для культур ендотеліальних прогеніторів з аорти та попередників кардіоміоцитів з міокарда.

Однією з центральних проблем роботи зі стовбуровими клітинами поза організмом є їхня швидка та різноспрямована мутаційна мінливість. Цитогенетичний аналіз культур стовбурових клітин проводиться для виявлення хромосомних аберацій, які характерні для конкретного донора або можуть з'явитись під час культивування та свідчать про нестабільність геному і потенційні ризики злоякісної трансформації таких клітин. Якщо каріотип відрізняється від нормального, клітинний препарат має підлягати знищенню. Зміни в геномі клітин можуть бути визначені за допомогою флуоресцентної гібридизації (Fluorescence In Situ Hybridization – FISH), порівняльної геномної гібридизації (Comparative Genomic Hybridization – CGH), аналізу одностандартного поліморфізму (Single Nucleotide Polymorphism – SNP).

У разі використання алогенних стовбурових клітин акцент робиться на відсутності ризику перенесення інфекцій та реакції відторгнення клітинного трансплантата при системному або локальному введенні таких препаратів. Продукти стовбурових клітин, отримані з аферезу периферичної крові, кісткового мозку або пуповинної крові, містять різну кількість еритроцитів донора, які потенційно можуть руйнуватись імунною системою реципієнта. Алогенні клітини не завжди будуть ідентичні клітинам реципієнта, тому для деяких типів стовбурових клітин, зокрема ГСК, проводять типування донора та реципієнта за певними системами антигенів. За міжнародними рекомендаціями FACT-JACIE алогенні донори та реципієнти клітинних продуктів мають бути протестовані за алелями головного комплексу гістосумісності [96]. Для HLA-типування має використовуватись ДНК-типування з високою роздільною здатністю, як мінімум HLA-A, B, та DRB1 для усіх алогенних донорів, а також HLA-C для неродинних алогенних донорів та родинних донорів, які не є сибсами. Донор та виготовлений продукт гемопоетичних стовбурових клітин має бути тестований на групу крові по системі ABO та Rh для запобігання гемолітичних реакцій, а безпосередньо перед трансплантацією проводять тест на індивідуальну сумісність еритроцитів.

Загалом, для аутологічних стовбурових клітин дорослого організму актуальною є можливість практично в будь-якому віці пацієнта отримати необхідну кількість власних клітин, що дозволяє попередити реакції відторгнення трансплантата, ризик передачі трансмісивних інфекцій і зняти багато юридичних та етичних обмежень клітинної терапії з приводу ембріонального або фетального донорського матеріалу. З іншого боку, значний досвід успішного застосування алогенних трансплантатів пояснюється можливістю отримувати стовбурові клітини від здорових донорів, які не скомпрометовані негативними генетичними, епігенетичними або патогенетичними факторами перебігу захворювання в реципієнта. Крім того, кріоконсервовані алогенні клітини можуть бути збережені в кріобанках тривалий час і застосовані в необхідній терапевтичній дозі практично відразу, коли виникне така потреба, без необхідності витрачати час на їх нарощування та тестування.

Ще один важливий аспект контролю якості клітинного продукту стосується реплікативного старіння клітин у культурі. Для отримання необхідної кількості клітин для досліджень або достатньої терапевтичної дози для клінічного застосування часто виникає об'єктивна потреба в тривалій їх експансії в культурі *in vitro*, особливо якщо недостатній первинний об'єм тканини, з якої виділяють клітини, або вони мають низький проліферативний потенціал.

Однак за сучасних двовимірних підходів стовбурові клітини швидко зазнають реплікативного старіння, їхній ріст уповільнюється, а функціональні властивості погіршуються за механізмами, які ще недостатньо з'ясовані. При тривалому розмноженні спостерігають значні зміни в морфології клітин, їхньої проліферації, здатності до диференціювання та енергетичному метаболізмі, які пов'язані зі збільшенням експресії асоційованої зі старінням бета-галактозидази, зменшенням довжини теломер і активності теломерази.

Важливо, що при культивуванні в 3D-умовах ці негативні зміни можуть бути дещо нівельовані [392]. Оскільки з віком потенціал клітин до диференціювання знижується, а проліферація, а отже і старіння клітин *in vitro* відбувається значно швидше, ніж *in vivo*, для досліджень та подальшого застосування доцільно використовувати клітини ранніх пасажів (до 4-го).

Можна виділити ключові маркери клітинного старіння, які варто аналізувати в програмі комплексного доклінічного контролю якості стовбурових клітин: β -галактозидаза, асоційована зі старінням (SA- β -gal); Alpha-L-Fucosidase (AFU); протеїни p16INK4a/CDKN2A, p53-p21Cip1/Waf1 та High-Mobility Group Protein B2 (HMGB2); асоційовані зі старінням гетерохроматинові осередки (SAHF); мікроядра, підраховані методом Cytokinesis-block micronucleus cytome assay (CBMN cyt); гени, пов'язані зі стовбуровістю (SOX2, POU5F1 і NANOG), антистарінням (SIRT1), окислювальним стресом (ALDH3) і підтримкою довжини теломерів.

При генотипуванні важливо зазначити, що в порушення рекомендацій з мінімальної інформації для публікації експериментів кількісної PCR (quantitative polymerase chain reaction – qPCR) у більшості звітів щодо клінічних досліджень

використовують лише один еталонний ген для нормалізації даних qPCR, і ця стабільність еталонних генів або не перевіряється, або про неї не повідомляють. Пропонується використовувати принаймні два еталонних гени для кожного експерименту qPCR. Алгоритм geNorm дозволяє проводити розширену оцінку за допомогою обчислення коефіцієнта нормалізації, поєднання двох найкращих кандидатів на еталонний ген і порівняння його з коефіцієнтом нормалізації, використовуючи 3-4 або більше кандидатів. При цьому розраховується попарна варіація різних факторів нормалізації та ухвалюється рішення про те, чи покращить аналіз додавання додаткового гена [144].

Отже, необхідним є проведення тестування не лише донора, а й кінцевого продукту клітин або тканин, який підлягає зберіганню та/або клінічному застосуванню. Мінімальний перелік обов'язкових діагностичних тестів залежить від джерела клітин або тканин та може бути розширений за відповідними медичними показами. Як новітній внесок у вирішення цієї проблеми можуть бути розроблені моделі машинного навчання з використанням технологій штучного інтелекту для автоматичного аналізу розмірів, морфології, показників проліферації та міграції соматичних стовбурових клітин різних типів *in vitro* з прогнозуванням їхнього функціонального потенціалу та відбором оптимальних за якістю культур для подальших доклінічних досліджень [77, 272]. Недотримання рекомендацій з тестування клітинного або тканинного продукту ставить під загрозу можливість його подальшого безпечного клінічного використання.

З огляду на міжнародні рекомендації та результати власних досліджень можна структурувати доклінічні критерії якості клітинних препаратів, які мають враховуватись на етапі виготовлення АТМР-продуктів: відповідність, чистота, безпека, життєздатність та ефективність (табл. 7.1).

Відповідність передбачає детальну характеристику отриманої популяції клітин на належність до певного типу за джерелом, морфофункціональними параметрами, імунофенотипом, біохімічними та/або генотиповими маркерами, потенціалом спрямованого диференціювання.

Таблиця 7.1 – Критерії якості соматичних стовбурових клітин та методи їх оцінки.

Критерій	Параметри аналізу	Метод дослідження
Відповідність	Морфологія	Мікроскопія
	Фенотипові маркери	Проточна цитометрія, імуноцитохімія
	Потенціал диференціювання	Цитохімічне забарвлення, імуноцитохімія
	Експресія генів	qPCR
Чистота	Ендотоксини	LAL-тест
	Хімічні домішки	Рідинна хроматографія
Життєздатність	Підрахунок життєздатних клітин	Мікроскопія (Trypan Blue, PI) Проточна цитометрія (7-AAD)
Безпека	Стабільність геному	Каріотипування, FISH, CGH, SNP
	Стерильність	Мікробіологічний аналіз
	Мікоплазма	PCR
	Додаткові віруси	PCR
	Маркери старіння	SA- β -gal, AFU, p16INK4a/CDKN2A, SAHF, CBMN cyt, qPCR
	Імуногенність	HLA-типсування
	Туморогенність	Трансплантація імунодефіцитним тваринам
Ефективність	Колонієутворююча активність	Аналіз колонієутворюючих одиниць (Colony-Forming Unit – CFU assay)
	Проліферативна активність	Час подвоєння популяції (Population Doubling Time – PDT)
	Продукція цитокінів, факторів росту	ELISA, qPCR, імуноцитохімія
	Регенеративний потенціал	Моделі пошкодження <i>in vitro/in vivo</i>

Чистота препарату гарантує визначений і контрольований його клітинний склад, відсутність додаткових хімічних або біологічних агентів, пов'язаних з продуктом або процесом його виготовлення (ендотоксини, антибіотики, білки сироватки, екзогенні гормони, цитокіни, фактори росту тощо) [128]. При цьому поєднання клітин з різних джерел має чітко обґрунтовуватись. За присутності неклітинних компонентів або об'ємних носіїв вони також мають бути охарактеризовані за складом, будовою, а необхідність їх використання має детально регламентуватись.

Життєздатність характеризує стійкість клітин до технології первинного виділення з тканини, умов культивування *in vitro*, доцільності кріоконсервування та визначає можливість подальшої реалізації регенеративного потенціалу при трансплантації *in vivo*. Важливо досягати необхідних параметрів життєздатності клітин не лише на етапі їх культивування, а й після розморожування клітинного продукту перед безпосереднім його застосуванням.

Безпека біотехнологічних клітинних препаратів є багатофакторною і передбачає інфекційну, імунологічну, генетичну та онкологічну складову. Контроль стерильності культури та відсутності її контамінації мікоплазмою запобігає порушенню функціональних властивостей клітин та ризику інфікування реципієнта патогенними збудниками. Одними з важливих критеріїв безпеки клітинного трансплантату є прогнозування імунологічних реакцій як з боку організму реципієнта (відторгнення), так і самого трансплантату (реакція трансплантат проти хазяїна), а також тератогенного потенціалу стовбурових та прогеніторних клітин. Для цього використовують HLA-типсування препаратів гемопоетичних стовбурових клітин за антигенами головного комплексу гістосумісності, а також різні варіанти сингенної та ксеногенної трансплантації на інбредних лабораторних тваринах, або ксеногенну трансплантацію імунодефіцитним мишам з дефектом генів, відповідальних за реакції відторгнення трансплантату (лінії NOD, SCID, RAG, NSG).

Дослідження клітинного продукту на туморогенність мають проводитись ще на етапі доклінічних досліджень перед виведенням препарату на ринок і для

регулярного контролю якості кожної культури не обов'язкові. Проте, отримані таким чином дані є попередніми та потребують віддаленого підтвердження під час подальших клінічних досліджень. Додатковим критерієм, що визначає якість клітинного продукту та потенційну безпеку і ефективність його застосування має стати оцінка маркерів реплікативного старіння клітин *in vitro*.

Ефективність клітинного препарату передбачає реалізацію стовбуровими/прогеніторними клітинами специфічних біологічних функцій. Для стовбурових клітин на етапі культури *in vitro* такими базовими функціональними параметрами є колонієутворююча активність та потенціал проліферації. За необхідності валідації паракринних ефектів може проводитись оцінка метаболічної активності за продукцією цитокінів, ростових факторів тощо методами імуноцитохімії або ELISA. На заключному етапі регенеративні ефекти препаратів стовбурових клітин мають бути проаналізовані на моделях пошкодження тканин та органів *in vitro* або *in vivo*.

Важливо, що оцінка усіх зазначених критеріїв якості має ґрунтуватись на принципах достатньої чутливості, високої специфічності і точної відтворюваності результатів аналізів кожного параметра. Саме тому в повному технологічному циклі, окрім оснащення культуральної лабораторії виробничими потужностями для виготовлення клітинних продуктів та кріобанку для їх зберігання, обов'язково має бути врахована необхідність контролю якості препаратів клітин за стандартизованими критеріями в умовах належно оснащеної діагностичної лабораторії. Це може бути окремий власний структурний підрозділ, або ж дослідження можуть проводити на базі інших установ у рамках співпраці. Важливо зазначити про необхідність додаткового зберігання в кріобанку кількох зразків клітин з кожного етапу виготовлення клітинного продукту для можливості їх повторного тестування в разі необхідності встановлення ймовірних порушень технологічного процесу, контролю якості реагентів тощо.

Підтвердженням якості роботи біотехнологічних компаній, що займаються виготовленням клітинних і тканинних продуктів є акредитація за стандартами належної виробничої практики (Good Manufacturing Practice – GMP).

GMP – це складова комплексної системи забезпечення якості, яка гарантує, що біотехнологічний продукт виробляється і контролюється за стандартами якості і відповідає призначенню. Для забезпечення всіх показників якості готової стерильної продукції мають створюватись спеціальні умови, рекомендовані для технологічного процесу, чистоти виробничих приміщень, роботи устаткування, вентиляції і чистоти повітря, системи підготовки реагентів і допоміжних матеріалів, для зниження до мінімуму ризику контамінації мікроорганізмами, частинками або пірогенами. Висуваються також певні вимоги до персоналу, спецодягу і виробничої санітарії. Щодо біотехнологічних препаратів, ці вимоги також регламентують принципи суворого контролю джерела клітин, дотримання правил забору біологічного матеріалу, його транспортування, зберігання, процесингу, характеристики, підтвердження якості та безпеки.

Для стандартизації технологій отримання клітинних продуктів для клінічного застосування багатьма біотехнологічними компаніями ведуться розробки обладнання, витратних матеріалів, поживних ростових середовищ і добавок, покликаних мінімізувати "людський фактор" при роботі з клітинним продуктом, виключити ризик його контамінації, а також максимально убезпечити оператора [95]. Наприклад, доступні системи автоматичної обробки ліпоаспірату (Cytori's Celution, Tissue Genesis та ін.), що дозволяють за короткий час виділити стромально-васкулярну фракцію, готову для клінічного застосування. Зокрема, система виділення клітин з ліпоаспірата Celution, дозволена до клінічного застосування FDA в США, може виділити від 200 до 450 тис. клітин SVF у 1 мл з життєздатністю 80-90 %. Розроблені і автоматичні роботизовані системи вирощування та кріоконсервування стовбурових клітин. Багато компаній (Invitrogen, HyClone, Lonza, Cambrex) пропонують спеціальні середовища для культивування та спрямованого диференціювання клітин, а також кріопротектори для тривалого зберігання клітинних продуктів, призначених для клінічного застосування. За наявності ксеногенних домішок поживні середовища для вирощування стовбурових клітин поділяють на такі, що містять фетальну сироватку корів (serum-containing); без сироватки або плазми (serum-free);

без компонентів тваринного походження, але можуть потенційно містити компоненти людського походження – голотрансферин, інсулін (xeno-free); містять лише продукти та матеріали з відомою хімічною структурою – малі молекули, солі, жирні кислоти тощо (chemically-defined); та середовища, для виготовлення яких використовуються продукти, матеріали, обладнання і процеси, що простежуються та контролюються (GMP/clinical grade) [95].

Наступний етап має передбачати оцінку біологічної безпеки та регенеративного потенціалу клітин у доклінічних дослідженнях на моделях пошкодження органів і захворювань у лабораторних тварин *in vivo* або в органотиповій культурі тканин *in vitro*. Вибір об'єкту дослідження має ґрунтуватись на можливості з одного боку відтворити у тварини модель патологічного процесу якомога наближену до його реального перебігу в організмі людини (для цього необхідні великі тварини – собаки, свині, примати), а з іншого – забезпечити достатню вибірку спостережень для отримання належної статистичної достовірності результатів (забезпечується завдяки використанню лінійних мишей та щурів). При цьому трансгенні та нокаутні модельні тварини дають змогу детально з'ясувати молекулярні механізми регенерації за участі стовбурових клітин при певній патології, асоційованій з генетичними дефектами, проте не завжди відтворюють реальну картину перебігу захворювання в людини.

У наших дослідженнях для доклінічної оцінки терапевтичного потенціалу різних типів соматичних стовбурових клітин на мишах було розроблено та валідовано моделі пошкодження трубчатих кісток, критичної ішемії кінцівок, ішемічної кардіоміопатії, а також використано оваріоектомію для моделювання дисфункції ніші стовбурових клітин жирової тканини.

Ще однією з переваг лабораторних тварин є можливість дослідити потенціал міграції та диференціювання трансплантованих клітин *in vivo* з використанням міток різного типу: хромосомних (за Y-хромосомою при трансплантації клітин самкам від самців); генетичних та імунологічних (виявлення експресії видоспецифічних генів або маркерів головного комплексу гістосумісності при ксеногенній трансплантації); флуоресцентних (мічення клітин

специфічними барвниками, трансфекція вірусними векторами або плазмідами з генами флуоресцентних білків попередньо в культурі, або ж трансплантація клітин від трансгенних тварин, які самостійно експресують флуоресцентні білки, бета-галактозидазу, люциферазу); міток на основі радіоактивних сполук або наночастинок металів тощо [170]. У наших дослідженнях продемонстровано безпеку та ефективність використання мічення геном зеленого флуоресцентного білка (GFP) клітин від трансгенних мишей лінії FVB-Cg-Tg(GFP)5Nagy/J.

Доза та кратність введення клітинного препарату на доклінічному етапі може бути визначена лише орієнтовно, з огляду на відмінності в масі піддослідних тварин і людини, а також певні особливості фізіології деяких тканин та органів. При цьому має бути попередньо обрано оптимальний шлях локального або системного введення та, за потреби, обґрунтована необхідність застосування тривимірних трансплантатів або об'ємних штучних носіїв клітин.

Поряд з вибором джерела клітин, безпека та ефективність клітинної терапії як у конкретного пацієнта, так і для технології загалом, значною мірою визначається правильним вибором оптимального способу їх доставки в організм. Шлях введення залежить від діагнозу, особливостей перебігу захворювання, важкості стану пацієнта, доступних інструментальних та технічних засобів, а також кваліфікації персоналу. Клітинні препарати можуть бути введені пацієнту різними шляхами: підшкірно, системно внутрішньовенно, локально внутрішньоартеріально, безпосередньо в тканину або орган, а також можливе застосування носіїв, заселених клітинами (гідрогелі, штучні каркаси, децелюляризовані носії тощо).

Більш ефективним вважається локальне введення клітин, коли вони доставляються безпосередньо до осередку патологічних змін, для скорочення часу на міграцію, підвищення ефективної терапевтичної дози та зменшення загибелі трансплантату. Ефективність підшкірного та внутрішньошкірного ін'єкційного введення продемонстрована для дермальних фібробластів та ММСК з кісткового мозку і жирової тканини при пластиці обличчя, рук, келоїдних рубців, корекції зморшок тощо [259].

Іншим варіантом локальної доставки є черезшкірні ін'єкцій суспензії клітин безпосередньо в уражену тканину. У такий спосіб вводять клітини навколо трофічних виразок і в м'язи ніг при лікуванні ішемічних ускладнень цукрового діабету та облітеруючих захворюваннях судин; у м'які тканини для лікування ліподистрофії та пластики тіла; навколо нориць при лікуванні ускладнень хвороби Крона, у сфінктер сечового міхура при стресовому нетриманні сечі, у кавернозні тіла при еректильній дисфункції, внутрішньосуглобово для лікування остеоартрозів [72, 209]. Головним обмеженням такого способу є анатомічна доступність ураженої ділянки для прямих черезшкірних ін'єкцій без ризику пошкодження інших органів, магістральних судин, нервів. Досягти локального ефекту можна і за допомогою внутрішньо-артеріального введення клітин у басейн судин, які кровопостачають необхідну ділянку. Таким способом доставляють клітини в коронарні артерії уражених відділів при ішемічній хворобі серця, у регіонарні судини головного мозку при інсультах, при критичній ішемії кінцівок на фоні цукрового діабету тощо [45, 105]. Головним ризиком при цьому є перфорація великих артерій з кровотечею, а також емболізація дрібних судин агрегатами клітин, що може спричинити розвиток інфаркту, інсульту, некрозу тканин.

При обмеженому доступі до уражених ділянок тканин та органів методом черезшкірних ін'єкцій локальна доставка клітин може бути здійснена під час оперативного втручання як основний або додатковий етап комплексного лікування. Головною перевагою такого способу є чітка візуалізація місця ін'єкції, що дозволяє визначити межі патологічно змінених тканин, придатних для введення клітин; виявити індивідуальні анатомічні особливості, що можуть вплинути на результат лікування; контролювати площу та глибину введення клітин для максимально ефективної їх доставки при мінімальних ризиках перфорації порожнистих органів, пошкодженнях магістральних судин або нервів; застосовувати об'ємні носії для формотворної або опорної функції [42].

Вибір оптимального способу доставки клітин у зону пошкодження та необхідної кратності їх введення є одними з ключових факторів в успішності клітинної терапії, що можна продемонструвати на прикладі патології міокарда.

В експериментальних та клінічних дослідженнях при клітинній терапії захворювань серця застосовують системне внутрішньовенне, локальне інтракоронарне, трансендокардіальне та трансепікардіальне введення клітин [315]. Внутрішньовенне введення клітин, яке є найбільш простим і малотравматичним, має на меті максимальне розселення трансплантованих клітин по організму з кровотоком і тому застосовується практично при усіх типах патології, де очікують позитивних системних ефектів від клітинної терапії: гематологічні хвороби, цукровий діабет, серцево-судинні захворювання, аутоімунна патологія тощо. Відомо, що стовбурові клітини здатні сприймати сигнальні молекули з тканин, мігруючи саме в осередок пошкодження (хоумінг) [225]. Проте, хоча і продемонстровано здатність трансплантованих внутрішньовенно клітин мігрувати в зону пошкодження та локально диференціюватись у спеціалізовані фенотипи, все ж, очікуване заселення введеними клітинами патологічних осередків у достатній для терапевтичного ефекту кількості потребує підвищення їх доз для трансплантації або кратності застосування, оскільки більшість з них затримуються переважно в легенях [328].

Інтракоронарна доставка клітин до міокарда є відносно безпечною і зручною, хоча тривале утримання трансплантату в зоні пошкодження залишається проблематичним. До того ж, такий підхід потребує високої кваліфікації персоналу та наявності спеціалізованого обладнання для візуалізації судин та їх катетеризації. Також при окремих видах патології осередок пошкодження достатньо ізольований, щоб трансплантовані клітини могли в нього проникнути. Наприклад, при хронічній ішемічній хворобі серця суттєво порушене кровопостачання через атеросклероз судин та фіброз міокарда. При ішемічних інсультах міграція клітин з судин обмежена через наявність гематоенцефалічного бар'єру та так званої "напівтіні" (*penumbra*) навколо осередку ураження мозку.

Можна припустити, що отримані певні позитивні клінічні ефекти клітинної терапії в таких випадках були пов'язані, насамперед, з неспецифічним системним впливом на організм завдяки продукції трансплантованими клітинами численних цитокінів та ростових факторів, які стимулювали локальні процеси регенерації

опосередковано через активацію ендогенних резидентних прогеніторів у тканинах реципієнта, а не завдяки диференціюванню трансплантату [178].

На моделях інфаркту міокарда у тварин було показано, що саме з більш тривалою персистенцією великої кількості трансплантованих клітин у зоні пошкодження пов'язані довгострокові переваги їхнього впливу на функцію серця. Численні доклінічні дослідження показали, що інтраміокардіальна доставка клітин сприяє кращому їх приживленню в серці в порівнянні з інтракоронарним введенням, і більш позитивно впливає на реалізацію ними регенеративного потенціалу [243, 251]. Інтраміокардіальна трансплантація в експерименті на великих тваринах та в людини може бути реалізована за допомогою спеціальних мікроін'єкційних катетерів, що вводяться в порожнину лівого шлуночка через доступ у стегновій артерії. Проте, таке трансендокардіальне введення потребує ретельного інструментального картування скоротливості міокарда для чіткого визначення зони постінфарктного рубця та точного позиціонування ін'єкційної голки за допомогою методів променевої візуалізації. У разі планових оперативних втручань на відкритому серці оптимальним є трансепікардіальне введення під чітким візуальним контролем необхідної зони міокарда та дозування об'єму.

У наших дослідженнях на моделі ізопротеренол-індукованої кардіоміопатії застосовано системне внутрішньовенне введення ММСК плаценти, з огляду на розмір тварин та технічні обмеження інтраміокардіального введення [19]. Проте в клінічному дослідженні в людей більш перспективними були саме інтраміокардіальні ін'єкції клітин під час оперативного втручання на відкритому серці. На моделі критичної ішемії кінцівок нами було застосоване локальне інтрамускулярне введення клітин, яке також є більш перспективним і в умовах подальших клінічних досліджень [194]. Цілком очевидно, що й у лікуванні дефектів м'яких тканин, кісток, суглобів, периферичних нервів саме локальне застосування клітинних та біоінженерних тканинних трансплантатів є пріоритетним. Щодо клітинної терапії патології центральної нервової системи, вибір оптимального способу доставки трансплантата має ґрунтуватись на ретельно зваженому співвідношенні очікуваної користі та ризиків, пов'язаних з

стереотаксичним втручанням у головний мозок, що також було оцінено в наших спільних дослідженнях з Tsurykov O. та ін. [17, 352]. Загалом, локальне введення клітин має низку переваг, проте існують і деякі технічні його обмеження, пов'язані з розмірами піддослідних тварин, потребою в спеціальних малоінвазивних засобах, ризиком ускладнень. Є вагомими підстави вважати, що розвиток методів локальної доставки з кращим приживленням трансплантату може підвищити ефективність клітинної терапії, особливо при хронічних ішемічних ушкодженнях тканин, коли сигнали хоумінгу для залучення стовбурових клітин із кровотоку знижені.

З огляду на експериментальні дані, що трансплантовані клітини при системному введенні виявляються в міокарді та інших тканинах лише в ранні строки після ін'єкції для досягнення стійкого тривалого клінічного ефекту перспективним вважають проведення повторних трансплантацій клітин [342]. Наприклад, на моделі інфаркту міокарда в щурів навіть лише двократне введення ММСК у порівнянні з одноразовим забезпечує кращі показники зростання фракції викиду, асоційовані із збільшенням маси міокарда, щільності артеріол та зменшенням фіброзу [287]. При цьому важливим є факт, що повторні введення алогенних кардіосфер не викликають локального запалення в міокарді та системних реакцій відторгнення [286]. Показано, що покращення функції серця при багаторазовому введенні клітинних препаратів властиве не тільки щурам зі змодельованою кардіоміопатією, а й для інших гризунів та для різних типів клітин [147]. Інші автори теж вважають, що для реалізації клінічного ефекту доцільним є повторне введення клітинних препаратів, хоча постійне приживлення донорських клітин не обов'язкове [44, 237].

Вищенаведені результати досліджень підвищують обґрунтовують парадигми доцільності та ефективності багаторазового введення клітин при лікуванні захворювань багатьох органів, зокрема і серця. У людей додаткової торакотомії для повторного інтраміокардіального введення клітин можна уникнути, використовуючи ехокардіографічну візуалізацію процедури ін'єкції та внутрішньошлуночкове введення підвищеної кількості клітин.

Загалом, узагальнюючи отримані в нашій роботі результати досліджень та аналізуючи дані літератури, можна сформулювати концепцію щодо впливу факторів якості *in vitro* та доклінічної ефективності *in vivo* на патогенетичні механізми реалізації регенеративного потенціалу соматичних стовбурових клітин різного походження (рис. 7.2). Стовбурові клітини постійно залучені в механізми регенерації на рівні тканин та органів завдяки здатності сприймати сигнали пошкодження та мігрувати в його осередок (homing). Шляхом контактної взаємодії із структурними компонентами ніші та продукції ростових факторів і цитокінів вони можуть не лише активувати програми власного диференціювання та спеціалізації для заміщення втрачених клітин, а й ініціювати збережені дормантні прогенітори в тканинах, запускаючи шляхи ендогенної репарації. Ключовими патогенетичними механізмами реалізації регенеративного потенціалу є імуномодулюючі ефекти, спрямовані на пригнічення локального і системного запалення; проангіогенні впливи, спрямовані на неоваскуляризацію та відновлення перфузії в зоні ішемії; антиапоптотичні прояви для зменшення загибелі клітин; пригнічення фіброзоутворення. Загалом, зазначені механізми запобігають патологічному ремоделюванню тканин та прогресуванню дисфункції органів, які розвиваються внаслідок пошкодження.

Важливо розуміти, що тип та джерело стовбурових клітин, а також функціональний стан їх ніші на рівні донора, який асоційований з віком і коморбідністю, першочергово визначають можливість та ефективність реалізації зазначених механізмів. При виготовленні ж клітинного препарату необхідно враховувати технологічні особливості, контролювати морфофункціональні характеристики, життєздатність, імунофенотип та потенціал спрямованого диференціювання культур стовбурових клітин для гарантування належної їх якості. Нарешті, для досягнення очікуваних терапевтичних ефектів важливо визначити оптимальну дозу клітин, носій, спосіб і кратність їх введення, та враховувати функціональний стан ніші вже на рівні реципієнта. Дотримання запропонованих критеріїв якості дозволить підвищити безпеку та ефективність клітинної терапії при пошкодженнях різних тканин та органів.

Фактори якості клітин з боку донора

- функціональний стан ніші донора
- тип стовбурових/прогеніторних клітин
- джерело клітин

Фактори якості культур клітин *in vitro*

- технологія виділення
- умови та тривалість культивування
- морфофункціональні характеристики
- проліферативна та клоногенна активність
- імунофенотип
- потенціал спрямованого диференціювання
- життєздатність
- відсутність контамінації мікробами та вірусами

Механізми реалізації регенеративного потенціалу стовбурових клітин

- міграція в осередок пошкодження (homing)
- контактна взаємодія та сигналінг з клітинами ніші
- активація ендогенних стовбурових/прогеніторних клітин
- диференціювання і заміщення втрачених клітин
- імуномодуляція та зменшення запалення
- проангіогенний вплив
- запобігання апоптозу
- пригнічення фіброзу
- запобігання патологічному ремоделюванню тканин

Фактори ефективності *in vivo*

- оптимальна терапевтична доза
- носій клітин
- спосіб та кратність трансплантації
- функціональний стан ніші реципієнта
- строк оцінки терапевтичних ефектів

Рисунок 7.2 – Вплив параметрів якості та ефективності стовбурових клітин на реалізацію їхнього регенеративного потенціалу.

7.7 Обговорення перспектив трансляції отриманих результатів у клініку

Успішні багатообіцяючі результати, отримані в доклінічних дослідженнях, мають бути обов'язково підтверджені з позицій безпеки та ефективності за співвідношенням "користь/ризик" у подальших клінічних дослідженнях, які передбачають кілька фаз. Зазвичай, фаза I має на меті тестування безпеки досліджуваного лікарського засобу на здорових добровольцях для подальшої перевірки його дієвості та відсутності побічних ефектів у наступній фазі II вже на хворих пацієнтах з певною патологією.

Проте, враховуючи, що клітинна терапія часто є досить специфічною для конкретного захворювання, а аlogenна трансплантація несе певні ризики, досить часто ці дві фази можуть бути об'єднані та проведені відразу на таргетній групі хворих без участі здорових добровольців. При цьому може бути встановлена оптимальна доза та кратність введення клітинного препарату. Дослідники повинні уникати призначення пацієнтам надто низької дози, щоб досягти належного лікувального ефекту, або настільки високої дози, що може спричинити серйозні побічні ефекти. Наступна фаза III встановлює цільовий терапевтичний ефект та безпеку клітинного продукту на великій групі учасників. При цьому дослідникам потрібно достатньо часу від кількох місяців до років, щоб повністю оцінити результати випробування, чи позитивні ефекти нового методу лікування переважають виявлені ризики. Після виведення на ринок вже зареєстрованого препарату довготривалі наслідки можуть оцінюватись у постмаркетингових дослідженнях фази IV для визначення неочікуваних віддалених ефектів конкретного препарату самостійно, у комбінації з іншими традиційними засобами лікування або ж у певних груп пацієнтів.

Важливо, що клінічні дослідження повинні проводитися відповідно до етичних принципів, які базуються на Гельсінській декларації й відповідають вимогам чинного законодавства. Безпека є пріоритетом на кожному з цих етапів. Якщо дослідження вважається небезпечним, воно не переходить до наступної фази. Це передбачає моніторинг несприятливих подій, тобто будь-яких неочікуваних проблем зі здоров'ям, які можуть виникнути під час дослідження.

Навіть якщо вони безпосередньо не пов'язані із застосуванням клітинного або тканинного препарату, це має бути перевірено та доведено. Дослідник збирає інформацію про те, чи пов'язана несприятлива подія з основним або супутнім лікуванням, про ступінь тяжкості, частоту та способи її вирішення. Варто зазначити, що при певних загрозливих для життя станах, коли відомі на сьогодні медикаментозні або хірургічні методи лікування залишаються не ефективними, застосування новітнього клітинного або тканинного препарату може дозволятися за життєвими показами як "терапія відчаю" без проведення попередніх клінічних випробувань.

При проведенні клінічних досліджень необхідно дотримуватись комплексного критерію прийнятності – це характеристики, яким мають відповідати усі учасники дослідження. Для кожного клінічного випробування мають бути визначені чіткі критерії включення та не включення пацієнтів у дослідження, а також виключення з нього на кожному з подальших етапів. Насамперед, це основний та супутні діагнози, анамнез хвороби, вік, стать тощо. Переконавшись, що добровольці відповідають цим критеріям, дослідники зможуть краще зрозуміти результати клінічного випробування.

Критично важливим кроком перед тим, як пацієнт зможе добровільно взяти участь у клінічному випробуванні, є його письмова інформована згода, в якій чітко зазначено обґрунтування, мету, етапи і тривалість дослідження, характеристики якості та безпеки досліджуваного клітинного препарату, методи обстеження та потенційні ризики. Нами було розроблено декілька варіантів типової інформованої згоди учасника дослідження при проведенні клінічних випробувань безпеки та ефективності клітинних препаратів ММСК плаценти при ішемічній кардіоміопатії та остеоартрозі колінного суглоба. Важливо зазначити, що учасник дослідження навіть після підписання інформованої згоди має право в будь-який момент за власним бажанням відмовитись від подальшої участі у випробуванні. Ще одним важливим моментом, з огляду на високу вартість розробки та виготовлення сучасних клітинних та тканинних препаратів, є те, що для учасників клінічних випробувань застосування досліджуваного засобу або ж альтернативного лікування в контрольній групі є безоплатним.

Для уникнення потенційних систематичних помилок, пов'язаних з малою кількістю залучених у кожне з досліджень пацієнтів, необхідним є проведення мета-аналізу численних опублікованих даних. Наприклад, у 2012 році за результатами мета-аналізу 50 клінічних досліджень із залученням 2625 пацієнтів встановлено, що трансплантація моноклеарних клітин кісткового мозку в порівнянні із стандартним лікуванням покращує функції лівого шлуночка, зменшує розмір інфаркту та ремоделювання в пацієнтів з ішемічною хворобою серця [161]. Інший мета-аналіз 30 рандомізованих досліджень (2037 пацієнтів) також підтвердив зростання фракції викиду лівого шлуночка, зменшення кінцево-сistolічного об'єму та розміру інфаркту в порівнянні з контрольною групою. Проте, автори зазначають, що вказані функціональні зміни не були підтверджені даними магнітно-резонансної томографії [81]. Останні результати мета-аналізу 41 дослідження (2732 учасники) свідчать про відсутність вагомих доказів позитивного ефекту застосування клітин кісткового мозку в пацієнтів з гострим інфарктом міокарда, що можна пояснити важким вихідним станом реципієнтів та обмеженим часом для реалізації клітинами свого регенеративного потенціалу в умовах локального запалення та гострої ішемії [105]. На противагу цьому, аналіз інших 23 досліджень (1255 пацієнтів) виявив докази потенційно сприятливого клінічного ефекту трансплантації клітин кісткового мозку на функціональний стан міокарда та прогноз виживання в довгостроковій перспективі у хворих саме на хронічну ішемічну хворобу серця [104]. Отже, очікувана ефективність клітинної терапії напряму може залежати від дизайну клінічного випробування, який потребує ретельного формування піддослідних груп, чіткого визначення строків та адекватних методів функціональної оцінки.

При проведенні клінічних досліджень також актуальним є дотримання стандартів належної клінічної практики (Good Clinical Practice – GCP), специфічних для сучасних методів клітинної терапії. GCP – це сукупність міжнародних науково обґрунтованих регламентів щодо організації, проведення, аналізу та документального оформлення клінічних випробувань лікарських засобів, дотримання яких забезпечує належну достовірність результатів, захист прав та

конфіденційність учасників випробувань; запобігає можливості фальсифікацій або помилок; гарантує підтвердження або спростування ефективності та безпеки досліджуваного препарату. Завданням Настанови з GCP, яку було затверджено на Міжнародній конференції з гармонізації технічних вимог до реєстрації лікарських засобів для людини (International Conference on Harmonization), є встановлення єдиного стандарту проведення випробувань для взаємного визнання отриманих даних уповноваженими регуляторними органами. Метою GCP є забезпечення принципів стандартизації планування та підготовки досліджень, збору первинних даних, їх моніторингу та аналізу, оформлення документації та її аудиту, встановлення обов'язків спонсорів, дослідників і контролюючих органів. Загалом, забезпечення цих норм стає запорукою наукового і біоетичного обґрунтування якості та достовірності клінічного випробування.

Можна виділити ключові контрольні точки при плануванні дизайну клінічного дослідження лікарських засобів прогресивної терапії на основі стовбурових клітин: джерело соматичних стовбурових/прогеніторних клітин; аутологічне/алогенне їхнє походження; умови та тривалість культивування, контроль використання ксеногенних компонентів; стандартизація умов підготовки препаратів до введення в багатоцентрових випробуваннях; разова і загальна доза, кратність і спосіб трансплантації; критерії формування груп пацієнтів і виключення з них; необхідна кількість учасників дослідження; об'єктивні критерії клінічної безпеки та ефективності; оцінка побічних ефектів та віддалених наслідків; належний статистичний аналіз результатів.

Проте, незважаючи на значні досягнення в застосуванні стовбурових клітин у світі, однією з головних проблем в Україні є нелегітимне та невідповідне до клінічної картини використання в клінічній практиці клітинних трансплантатів, зокрема алогенного походження, що може призводити до спотворення результатів та дискредитації такого методу лікування [281]. На жаль, в Україні поки що відсутня законодавча база у сфері трансплантації клітинних продуктів, яка на належному рівні регламентує їх виготовлення та застосування по аналогії з провідними країнами світу. Вітчизняна нормативно-правова база регулює переважно діяльність медичних закладів, пов'язану з трансплантацією органів, і не враховує

особливості трансплантації клітинних біоінженерних препаратів. Найближчим часом Україна має удосконалити та гармонізувати своє законодавство в галузі клітинної та тканинної трансплантації з відповідними міжнародними стандартами щодо якості та безпеки для донорства, отримання, перевірки, обробки, консервації, зберігання, транспортування та розповсюдження стовбурових клітин з різних джерел [168].

З огляду на актуальність та безумовну перспективність застосування клітинної трансплантації, зацікавленість держави в розвитку новітніх медичних технологій та необхідність контролю за діяльністю, пов'язаною з трансплантацією клітин і тканин, виникає потреба у створенні єдиної державної структури, яка б регулювала цей напрям [281]. Враховуючи широкі перспективи клітинної терапії в усьому світі, актуальним також є організація в Україні референтних лабораторій, які б забезпечували контроль якості клітинних продуктів та технології їх виготовлення для подальшого клінічного застосування. Залучення вітчизняних науково-дослідних та клінічних установ до міжнародних програм контролю якості та акредитації на відповідність нормам GLP, GMP та GCP є важливим аспектом інтеграції України у світову наукову спільноту в галузі регенеративної медицини. Важливо відмітити, що у базі clinicaltrials.gov офіційно зареєстровано декілька клінічних досліджень з клітинної терапії в Україні, які базуються на критеріях якості стовбурових клітин, розроблених та впроваджених за результатами цієї роботи.

Підсумовуючи, впровадження новітніх клітинних технологій потребує виваженого підходу та чіткого усвідомлення можливих ризиків. Розробка нових та вдосконалення відомих методів терапевтичного застосування стовбурових клітин має ґрунтуватися на глибокому розумінні їхньої клітинної біології, механізмів диференціювання та функціонування в нормі та в умовах патологічних змін в організмі. Тому актуальним завданням для сучасної патологічної фізіології та регенеративної медицини залишається не лише з'ясування фундаментальних властивостей стовбурових клітин *in vitro*, а й ретельна глибока оцінка їхньої безпеки та регенеративних ефектів на доклінічному етапі *in vivo*, залежно від типу, походження та диференціувального потенціалу, як відповідальний крок на шляху до їх подальшого клінічного застосування.

Висновки

Результатом дисертаційної роботи є вирішення важливої наукової та прикладної проблеми – встановлення патогенетичних механізмів реалізації регенеративного потенціалу соматичних стовбурових клітин різного походження з врахуванням їхніх критеріїв якості та ефективності застосування. Ключовими механізмами реалізації регенеративного потенціалу стовбурових клітин належної якості є їх міграція у вогнище пошкодження, диференціювання для заміщення втрачених структурних елементів; імуномодулюючі ефекти, спрямовані на пригнічення локального запалення; проангіогенний вплив для неоваскуляризації та відновлення перфузії в зоні ішемії; запобігання апоптозу; пригнічення фіброзоутворення. На підставі цього визначено концепцію оцінки критеріїв якості соматичних стовбурових клітин, яка дозволить підвищити безпеку та ефективність клітинної терапії при пошкодженнях різних типів тканин та органів.

1. Якість досліджуваних соматичних стовбурових клітин з жирової тканини, плаценти, серця та судин визначається відповідністю їхніх морфофункціональних та імунофенотипічних характеристик, потенціалу спрямованого диференціювання, проліферативною та клоногенною активністю, життєздатністю клітин, залежно від їхнього типу, походження, віку донора, технології виділення, умов та тривалості культивування *in vitro*, що потрібно враховувати при розробці клітинних продуктів для подальших доклінічних і клінічних випробувань.

2. Ефективність реалізації регенеративних ефектів соматичних стовбурових клітин залежить від дотримання належних параметрів якості клітинного продукту, а також підбору оптимальної терапевтичної дози, носія, способу та кратності трансплантації, функціонального стану ніші реципієнта, що потрібно враховувати при доклінічній оцінці регенеративного потенціалу стовбурових клітин на валідних моделях пошкодження тканин та органів *in vivo*.

3. Культури мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин жирової тканини мають більший проліферативний потенціал та питому швидкість приросту популяції (на 71,4 % на 1-му пасажі, 58,1 % на 2-му та 65,5 % на 3-му), в

порівнянні з культурами кісткового мозку, що обґрунтовує ефективність їх подальшого застосування. При цьому оваріоектомія в мишей у молодому віці, як модель дисфункції ніші стовбурових клітин жирової тканини, порушує їхні властивості, збільшуючи удвічі час подвоєння популяції ($p \leq 0,05$), знижуючи потенціал до колонієутворення (на 27,9 %) та остеогенного диференціювання (на 37,3 %), а також посилюючи адипогенез (на 93,9 %) в культурі *in vitro*.

4. Трансплантати мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин жирової тканини, спрямовано диференційованих в остеогенному напрямі в умовах тривимірного культивування методом мікрмаси, забезпечують регенерацію пошкодженої кісткової тканини завдяки заміщенню втрачених структур кістки та мають суттєво кращі морфологічні показники її відновлення, в порівнянні із трансплантатами мікрмаси без попереднього диференціювання.

5. Трансплантати гідрогелів з карбомеру 974Р, заселені мультипотентними мезенхімальними стромальними клітинами жирової тканини, здатні до васкуляризації в організмі реципієнта, забезпечують виживання клітин, а також покращують морфофункціональний стан та перфузію пошкодженої м'язової тканини (на 80,1 % на 10-ту добу, 64,8 % – на 28-му; $p \leq 0,05$) на моделі критичної ішемії кінцівок у мишей завдяки механічній підтримці, формуванню необхідної цитоархітектоніки та сигналіngu шляхом утворення міжклітинних контактів, а також збереженню потенціалу клітин до диференціювання.

6. Ендотеліальні клітини-попередники з аорти реалізують регенеративний потенціал на моделі критичної ішемії кінцівок у мишей, що проявляється у відновленні перфузії ішемізованих тканин (різниця з псевдоперованою кінцівкою $\Delta = 14,0 \pm 8,2$ %, $p \geq 0,05$) та покращенні гістологічних показників м'язової тканини. Використання матриксу Matrigel та фібронектину, як субстратів росту, сприяє проліферації прогеніторів з аорти та експресії ними ендотеліальних маркерів (CD31 – $82,5 \pm 3,1$ % на пасажі 3) для подальшої реалізації терапевтичних ефектів.

7. Зі збільшенням віку донора тканини міокарда зменшується проліферативна та скоротлива активність культур стовбурових клітин серця *in vitro*, що впливає на прогнозування їхньої подальшої ефективності. При цьому

прогеніторні клітини, отримані з вушка передсердя, мають втричі більший проліферативний потенціал ($p < 0,0001$) і відрізняються за морфологічними та імунофенотипічними характеристиками від культур клітин зі стінок шлуночків.

8. Для формування кардіосфер належної якості зі скоротливою активністю *in vitro*, які експресують тропонін I ($69,8 \pm 5,2 \%$), VEGFR-2 ($12,9 \pm 1,1 \%$) і CD117 ($16,6 \pm 6,2 \%$), необхідною умовою є наявність кардіотрофіну, як ростового фактора, та послідовна зміна полі-Д-лізину і фібронектину, як субстратів росту.

9. Мультипотентні мезенхімальні стромальні клітини плаценти реалізують регенеративні ефекти на моделі ішемічної кардіоміопатії завдяки міграції в осередок пошкодження, пригніченню запалення та запобіганню апоптозу, покращуючи морфологічні та функціональні показники міокарда. Трансляція результатів експериментальних досліджень в рамках пілотного клінічного випробування підтверджує безпеку та ефективність інтраміокардіальної трансплантації стовбурових клітин плаценти людини в комплексному лікуванні пацієнтів з ішемічною кардіоміопатією, що проявляється відновленням скоротливої функції серця (зростання фракції викиду протягом перших 3-х місяців на $28,3 \pm 11,3 \%$, $p < 0,05$), швидким та істотним зменшенням симптомів серцевої недостатності, а також покращенням якості життя.

10. У практичному аспекті дотримання стандартизованих критеріїв комплексної оцінки якості та ефективності реалізації регенеративного потенціалу стовбурових клітин на доклінічному етапі необхідне для підвищення успішності лікування пацієнтів з багатьма важкими захворюваннями, а також визначає доцільність зберігання клітинних препаратів в кріобанках, що забезпечить суттєву економію коштів, здешевлення та більшу доступність клітинних технологій для пацієнтів. Розробка та впровадження новітніх високотехнологічних підходів клітинної терапії з доведеною якістю та ефективністю має суттєве соціальне та економічне значення завдяки зростанню конкурентоспроможності вітчизняної фундаментальної науки і клінічної медицини, підвищенню ефективності надання медичної допомоги, а також зниженню показників інвалідизації та смертності працездатного населення, що є важливим аспектом підтримання національної безпеки держави.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Безруков ВВ, Бутенко ГМ, Парамонова ГИ, Сыкало НВ, Холин ВА, Олар ВВ, и др. Влияние трансплантации стволовых клеток костного мозга на миокардиопатию, вызванную введением изопротеренола. Тези наук.-практ. конф. з міжнар. уч. "Актуальні проблеми регенеративної медицини", Київ. 2012. Журн. НАМН України. 2012; т. 18, додаток:17-18.
2. Бутенко ГМ, Кирик ВМ. Регенеративная медицина и стволовые клетки - проблемы и решения. Журн АМН України. 2011; 17(1):62-66.
3. Габрієлян АВ, Голюк ЄЛ, Домбровський ДБ, Кирик ВМ, Медведєв ВВ, Руденко СА, Шаблій ВА. Новітні методи застосування стовбурових клітин і біоінженерних технологій у регенеративній медицині. Реф. роботи, удостоєної Національної премії України ім. Бориса Патона, Київ, 2021 р. Available from: http://www.kdpu-nt.gov.ua/sites/default/files/work_files/4_referat_2.pdf
4. Говбах І, Сможаник К, Пацева М, Рубцов В, Устименко А, Кирик В, та ін. Ультроструктурні зміни сідничого нерва мишей з периферичною нейропатією після трансплантації мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин жирової тканин. Фізіол. журн. 2021; 67(3):17-26. Available from: <https://doi.org/10.15407/fz67.03.017>
5. Квитницкая-Ръжова ТЮ, Клименко ПП, Хаблак ГВ, Парамонова ГИ, Кирик ВМ. Структурные изменения миокарда при моделировании кардиомиопатии и ее коррекции с помощью стволовых клеток у животных разного возраста. Світ мед. та біол. 2014; 4(47):130-134.
6. Кирик ВМ, Устименко АМ, Клименко ПП, Кучук ОВ. Регенеративний потенціал 3D-культури мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин жирової клітковини на моделі критичної ішемії нижніх кінцівок. Матеріали конференції "Ендотеліальна дисфункція при вік-залежній патології – діагностика, профілактика, лікування", Київ. 2015. Кровообіг та гемостаз. 2015; 1-2:94-95.
7. Кирик В. Эндотелиальные прогениторные клетки и преэклампсия. Збірник тез наук.-практ. конф. з міжнар. уч. "Клітинні технології в акушерстві, гінекології, неонатології та дитячій неврології", Київ. 2013:13.
8. Кирик ВМ, Бутенко ГМ. Стволовые клетки из жировой ткани: основные характеристики

и перспективы клинического применения в регенеративной медицине. Журн АМН України. 2010; 16(4):576-604.

9. Кирик В, Кучук О, Клименко П. Регенераторний потенціал ММСК жирової клітковини при пошкодженні кісткової тканини у мишей. Матеріали ІІІ міжнар. мед. конгресу "Впровадження сучасних досягнень медичної науки в практику охорони здоров'я України", Київ. 2014:16.
10. Кирик ВМ, Устименко АМ, Шаблій ВА, Немтінов ПІ, Руденко СА, Бутенко ГМ, та ін. Перспективи клітинної терапії серцево-судинних захворювань. Тези доп. наук.-практ. конф. "Інноваційні напрями в генетичній та регенеративній медицині", Київ. 2017. Cell Organ Transpl. 2017; 5(2):257. Available from: <https://doi.org/10.22494/cot.v5i2.79>
11. Кучук ОВ, Кирик ВМ. Поэтапная дифференцировка в остеогенном направлении мультипотентных клеток жировой ткани мышей. Матеріали доп. міні-симпозіума "День стовбурової клітини", Харків. 2012:23–28.
12. Кучук ОВ, Цупиков ОМ, Кирик ВМ. Культивирование и направленная остеогенная дифференцировка мультипотентных стромальных клеток костного мозга в культуре микромассы. Проблеми остеології. 2010; 13(4):36-41.
13. Кучук ОВ, Цупиков ОМ, Кирик ВМ. Культура мікромаси мультипотентних стромальних клітин кісткового мозку та можливості її застосування для регенерації кісткової тканини. Тези доп. наук. конф. мол. вчених з міжнар. уч. "Актуальні питання геронтології та геріатрії", Київ. 2011:25-26.
14. Поляченко ЮВ, Запольська КМ, Салютін РВ, Кучук ОВ, Кирик ВМ, Клименко ПП, та ін. Перспективи застосування алогенних мультипотентних мезенхімальних стовбурових клітин для захисту жирових трансплантатів від резорбції. Клін. хір. 2013; 2:60-63.
15. Світїна Г. М. Порівняльна характеристика мезенхімальних стромальних клітин плаценти щура і людини та вплив їх трансплантації на канцерогенез товстої кишки. Дис. на здоб. наук. ступ. канд. біол. наук. Київ, 2017.
16. Сушко ОМ, Кирик ВМ. Юридичні аспекти застосування стовбурових клітин в Україні. Тези доп. наук. конф. мол. вчених з міжнар. уч. "Актуальні питання геронтології та геріатрії", Київ. 2011:54-55.
17. Цупиков О. М. Вплив трансплантації стовбурових клітин на процеси регенерації нервової

тканини після ішемічного ушкодження головного мозку. Дис. на здоб. наук. ступ. д-ра мед наук. Київ, 2018.

18. Шаблій ВА. Характеристика мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин, виділених із нативної та кріоконсервованої плаценти людини. Дис. на здоб. наук. ступ. канд. біол. наук. Київ, 2013.
19. Шаблій ВА, Кучма МД, Кирик ВМ, Онищенко ГМ, Цупиков ОМ, Клименко ПП, та ін. Вплив мезенхімальних стромальних клітин з нативної та кріоконсервованої плаценти людини на деякі морфо-функціональні особливості міокарда у мишей з кардіоміопатією. Вісник невідкладної та відновлювальної медицини. 2012; 13(1):133-138.
20. Шаблій ВА, Кучма МД, Кирик ВМ, Онищенко ГМ, Цупиков ОМ, Клименко ПП, та ін. Фенотип і міграційний потенціал мультипотентних мезенхімних стромальних клітин з нативної та кріоконсервованої плаценти людини. *Biotechnologia Acta*. 2012; 5(5):34-44.
21. Afizah H, Yang Z, Hui JH, Ouyang HW, Lee EH. A comparison between the chondrogenic potential of human bone marrow stem cells (BMSCs) and adipose-derived stem cells (ADSCs) taken from the same donors. *Tissue Engineering*. 2007;13(4):659-666. Available from: <http://doi.org/10.1089/ten.2006.0118>
22. Aird KM, Zhang R. Detection of senescence-associated heterochromatin foci (SAHF). *Methods Mol Biol*. 2013; 965:185-96. Available from: http://doi.org/10.1007/978-1-62703-239-1_12
23. Alam P, Maliken BD, Jones SM, Ivey MJ, Wu Z, Wang Y, Kanisicak O. Cardiac remodeling and repair: recent approaches, advancements, and future perspective. *Int J Mol Sci*. 2021;22(23):13104. Available from: <https://doi.org/10.3390/ijms222313104>
24. Al-Ghadban S, Artiles M, Bunnell BA. Adipose stem cells in regenerative medicine: looking forward. *Front Bioeng Biotechnol*. 2022;9:837464. Available from: <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.837464>
25. Alhaque S, Themis M, Rashidi H. Three-dimensional cell culture: from evolution to revolution. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2018; 373(1750):20170216. Available from: <https://doi.org/10.1098/rstb.2017.0216>
26. Alicka M, Kornicka-Garbowska K, Kucharczyk K, Kępska M, Röcken M, Marycz K. Age-dependent impairment of adipose-derived stem cells isolated from horses. *Stem Cell Res Ther*. 2020;11(1):4. Available from: <https://doi.org/10.1186/s13287-019-1512-6>

27. Al-Nbaheen M, Vishnubalaji R, Ali D, Bouslimi A, Al-Jassir F, Megges M, et al. Human stromal (mesenchymal) stem cells from bone marrow, adipose tissue and skin exhibit differences in molecular phenotype and differentiation potential. *Stem Cell Reviews*. 2013; 9(1):32-43. Available from: <http://doi.org/10.1007/s12015-012-9365-8>
28. Altabas V, Biloš LSK. The role of endothelial progenitor cells in atherosclerosis and impact of anti-lipemic treatments on endothelial repair. *Int J Mol Sci*. 2022; 23(5):2663. Available from: <https://doi.org/10.3390/ijms23052663>
29. Amani S, Shahrooz R, Hobbenaghi R, Mohammadi R, Baradar Khoshfetrat A, Karimi A, et al. Angiogenic effects of cell therapy within a biomaterial scaffold in a rat hind limb ischemia model. *Sci Rep*. 2021;11(1):20545. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41598-021-99579-0>
30. Amer MG, Embaby AS, Karam RA, Amer MG. Role of adipose tissue derived stem cells differentiated into insulin producing cells in the treatment of type I diabetes mellitus. *Gene*. 2018;654:87-94. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.gene.2018.02.008>
31. Amini M, Zayeri F, Salehi M. Trend analysis of cardiovascular disease mortality, incidence, and mortality-to-incidence ratio: results from global burden of disease study. *BMC Public Health*. 2017; 21:401(2021). Available from: <https://doi.org/10.1186/s12889-021-10429-0>
32. An JH, Song WJ, Li Q, Kim SM, Yang JI, Ryu MO, et al. Prostaglandin E₂ secreted from feline adipose tissue-derived mesenchymal stem cells alleviate DSS-induced colitis by increasing regulatory T cells in mice. *BMC Vet Res*. 2018;14(1):354. Available from: <https://doi.org/10.1186/s12917-018-1684-9>
33. Anderson P, Gonzalez-Rey E, O'Valle F, Martin F, Oliver FJ, Delgado M. Allogeneic adipose-derived mesenchymal stromal cells ameliorate experimental autoimmune encephalomyelitis by regulating self-reactive T cell responses and dendritic cell function. *Stem Cells Int*. 2017;2017:2389753. Available from: <https://doi.org/10.1155/2017/2389753>
34. Archacka K, Bem J, Brzoska E, Czerwinska AM, Grabowska I, Kasprzycka P, et al. Beneficial effect of IL-4 and SDF-1 on myogenic potential of mouse and human adipose tissue-derived stromal cells. *Cells*. 2020;9(6):1479. Available from: <https://doi.org/10.3390/cells9061479>
35. Atlasi Y, Stunnenberg HG. The interplay of epigenetic marks during stem cell differentiation and development. *Nat Rev Genet*. 2017;18(11):643-658. Available from: <https://doi.org/10.1038/nrg.2017.57>

36. Aydin B, Mazzoni EO. Cell reprogramming: the many roads to success. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2019;35:433-452. Available from: <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-100818-125127>
37. Barbon S, Stocco E, Rajendran S, Zardo L, Macchi V, Grandi C, et al. In vitro conditioning of adipose-derived mesenchymal stem cells by the endothelial microenvironment: modeling cell responsiveness towards non-genetic correction of haemophilia A. *Int J Mol Sci.* 2022;23(13):7282. Available from: <https://doi.org/10.3390/ijms23137282>
38. Barzegar M, Vital S, Stokes KY, Wang Y, Yun JW, White LA, et al. Human placenta mesenchymal stem cell protection in ischemic stroke is angiotensin converting enzyme-2 and masR receptor-dependent. *Stem Cells.* 2021 Oct;39(10):1335-1348. Available from: <https://doi.org/10.1002/stem.3426>
39. Beltrán-Camacho L, Rojas-Torres M, Durán-Ruiz MC. Current status of angiogenic cell therapy and related strategies applied in critical limb ischemia. *Int J Mol Sci.* 2021; 22(5):2335. Available from: <https://doi.org/10.3390/ijms22052335>
40. Bicer M, Sheard J, Iandolo D, Boateng SY, Cottrell GS, Widera D. Electrical stimulation of adipose-derived stem cells in 3D nanofibrillar cellulose increases their osteogenic potential. *Biomolecules.* 2020;10(12):1696. Available from: <https://doi.org/10.3390/biom10121696>
41. Biran A, Zada L, Abou Karam P, Vadai E, Roitman L, Ovadya Y, et al. Quantitative identification of senescent cells in aging and disease. *Aging Cell.* 2017; 16(4):661-671. Available from: <http://doi.org/10.1111/accel.12592>
42. Blum KM, Mirhaidari GJM, Breuer CK. Tissue engineering: Relevance to neonatal congenital heart disease. *Semin Fetal Neonatal Med.* 2022;27(1):101225. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.siny.2021.101225>
43. Bolli R, Tang XL, Sanganalmath SK, Rimoldi O, Mosna F, Abdel-Latif A, et al. Intracoronary delivery of autologous cardiac stem cells improves cardiac function in a porcine model of chronic ischemic cardiomyopathy. *Circulation.* 2013; 128(2):122-31. Available from: <https://doi.org/10.1161/circulationaha.112.001075>
44. Bolli R. Repeated cell therapy: a paradigm shift whose time has come. *Circ Res.* 2017; 120(7):1072-1074. Available from: <https://doi.org/10.1161/circresaha.117.310710>
45. Boncoraglio GB, Ranieri M, Bersano A, Parati EA, Del Giovane C. Stem cell transplantation for ischemic stroke. *Cochrane Database Syst Rev.* 2019; 5(5):CD007231. Available from:

<https://doi.org/10.1002/14651858.CD007231>

46. Bou-Ghannam S, Kim K, Grainger DW, Okano T. 3D cell sheet structure augments mesenchymal stem cell cytokine production. *Sci Rep.* 2021;11(1):8170. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41598-021-87571-7>
47. Bouland C, Philippart P, Dequanter D, Corrillon F, Loeb I, Bron D, et al. Cross-talk between mesenchymal stromal cells (MSCs) and endothelial progenitor cells (EPCs) in bone regeneration. *Front Cell Dev Biol.* 2021; 9:674084. Available from: <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.674084>
48. Bracht JR, Vieira-Potter VJ, De Souza Santos R, Öz OK, Palmer BF, Clegg DJ. The role of estrogens in the adipose tissue milieu. *Ann N Y Acad Sci.* 2020; 1461(1):127-143. Available from: <http://doi.org/10.1111/nyas.14281>
49. Bruggeman KF, Williams RJ, Nisbet DR. Dynamic and responsive growth factor delivery from electrospun and hydrogel tissue engineering materials. *Adv Healthc Mater.* 2018;7(1). Available from: <https://doi.org/10.1002/adhm.201700836>
50. Bruun K, Schermer E, Sivendra A, Valaik E, Wise RB, Said R, et al. Therapeutic applications of adipose-derived stem cells in cardiovascular disease. *Am J Stem Cells.* 2018;7(4):94-103. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6261868>
51. Bura A, Planat-Benard V, Bourin P, Silvestre JS, Gross F, Grolleau JL, et al. Phase I trial: the use of autologous cultured adipose-derived stroma/stem cells to treat patients with non-revascularizable critical limb ischemia. *Cytotherapy.* 2014;16(2):245-57. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2013.11.011>
52. Burrow KL, Hoyland JA, Richardson SM. Human adipose-derived stem cells exhibit enhanced proliferative capacity and retain multipotency longer than donor-matched bone marrow mesenchymal stem cells during expansion in vitro. *Stem Cells Int.* 2017; 2017:2541275. Available from: <http://doi.org/10.1155/2017/2541275>
53. Buscail E, Le Cosquer G, Gross F, Lebrin M, Bugarel L, Deraison C, et al. Adipose-derived stem cells in the treatment of perianal fistulas in crohn's disease: rationale, clinical results and perspectives. *Int J Mol Sci.* 2021;22(18):9967. Available from: <https://doi.org/10.3390/ijms22189967>
54. Butenko G. Heterochronic chimeras as a model in gerontologic research. The theoretical basis of aging research. Wien: Facultas Verlag; 1990.

55. Calcinotto A, Kohli J, Zagato E, Pellegrini L, Demaria M, Alimonti A. Cellular senescence: aging, cancer, and injury. *Physiol Rev.* 2019; 99(2):1047-1078. Available from: <http://doi.org/10.1152/physrev.00020.2018>
56. Cambria E, Pasqualini FS, Wolint P, Günter J Steiger J, Bopp A, et al. Translational cardiac stem cell therapy: advancing from first-generation to next-generation cell types. *npj Regen Med* 2017; 2:17. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41536-017-0024-1>
57. Can A, Dao DT, Arad M, Terrillion CE, Piantadosi SC, Gould TD. The mouse forced swim test. *J Vis Exp.* 2012;(59):e3638. Available from: <https://doi.org/10.3791/3638>
58. Cannella V, Piccione G, Altomare R, Marino A, Di Marco P, Russotto L, et al. Differentiation and characterization of rat adipose tissue mesenchymal stem cells into endothelial-like cells. *Anat Histol Embryol.* 2018;47(1):11-20. Available from: <https://doi.org/10.1111/ahe.12318>
59. Çağavi E, Koç A, Şahoğlu Gıkktaş S. The heart of the matter: cardiac stem cells. *Turk J Biol.* 2016; 40(5):968-980. Available from: <https://doi.org/10.3906/biy-1602-63>
60. Chait A, den Hartigh LJ. Adipose tissue distribution, inflammation and its metabolic consequences, including diabetes and cardiovascular disease. *Front Cardiovasc Med.* 2020; 7:22. Available from: <http://doi.org/10.3389/fcvm.2020.00022>
61. Chambers DC, Enever D, Ilic N, Sparks L, Whitelaw K, Ayres J, et al. A phase 1b study of placenta-derived mesenchymal stromal cells in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Respirology.* 2014;19(7):1013-8. Available from: <https://doi.org/10.1111/resp.12343>
62. Chambers SEJ, Pathak V, Pedrini E, Soret L, Gendron N, Guerin CL, Stitt AW, Smadja DM, Medina RJ. Current concepts on endothelial stem cells definition, location, and markers. *Stem Cells Transl Med.* 2021;10(Suppl 2):S54-S61. Available from: <https://doi.org/10.1002/sctm.21-0022>
63. Chan HH, Meher Homji Z, Gomes RS, Sweeney D, Thomas GN, Tan JJ, et al. Human cardiosphere-derived cells from patients with chronic ischaemic heart disease can be routinely expanded from atrial but not epicardial ventricular biopsies. *J Cardiovasc Transl Res.* 2012; 5(5):678-87. Available from: <https://doi.org/10.1007/s12265-012-9389-0>
64. Chen C, Tang Q, Zhang Y, Yu M, Jing W, Tian W. Physioxia: a more effective approach for culturing human adipose-derived stem cells for cell transplantation. *Stem Cell Res Ther.* 2018;9(1):148. Available from: <https://doi.org/10.1186/s13287-018-0891-4>
65. Chen HJ, Chen CH, Chang MY, Tsai DC, Baum EZ, Hariri R, et al. Human placenta-derived

- adherent cells improve cardiac performance in mice with chronic heart failure. *Stem Cells Transl Med.* 2015;4(3):269-75. Available from: <https://doi.org/10.5966/sctm.2014-0135>
66. Chen HT, Lee MJ, Chen CH, Chuang SC, Chang LF, Ho ML, et al. Proliferation and differentiation potential of human adipose-derived mesenchymal stem cells isolated from elderly patients with osteoporotic fractures. *J Cell Mol Med.* 2012; 16:582-592. Available from: <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2011.01335.x>
67. Cheng NC, Wang S, Young TH. The influence of spheroid formation of human adipose-derived stem cells on chitosan films on stemness and differentiation capabilities. *Biomaterials.* 2012; 33(6):1748-58. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.11.049>
68. Chimenti I, Gaetani R, Forte E, Angelini F, De Falco E, Zoccai GB, et al. Serum and supplement optimization for EU GMP-compliance in cardiospheres cell culture. *J Cell Mol Med.* 2014; 18(4):624-34. Available from: <https://doi.org/10.1111/jcmm.12210>
69. Cho YB, Park KJ, Yoon SN, Song KH, Kim DS, Jung SH, et al. Long-term results of adipose-derived stem cell therapy for the treatment of Crohn's fistula. *Stem Cells Transl Med.* 2015;4(5):532-7. Available from: <https://doi.org/10.5966/sctm.2014-0199>
70. Choudhery MS, Badowski M, Muise A, Pierce J, Harris DT. Donor age negatively impacts adipose tissue-derived mesenchymal stem cell expansion and differentiation. *Journal of Translational Medicine.* 2014; 12(1):8. Available from: <http://doi.org/10.1186/1479-5876-12-8>
71. Chu DT, Nguyen Thi Phuong T, Tien NLB, Tran DK, Minh LB, et al. Adipose tissue stem cells for therapy: an update on the progress of isolation, culture, storage, and clinical application. *J Clin Med.* 2019;8(7):917. Available from: <https://doi.org/10.3390/jcm8070917>
72. Ciccocioppo R, Klersy C, Leffler DA, Rogers R, Bennett D, Corazza GR. Systematic review with meta-analysis: Safety and efficacy of local injections of mesenchymal stem cells in perianal fistulas. *JGH Open.* 2019;3(3):249-260. Available from: <https://doi.org/10.1002/jgh3.12141>
73. ClinicalTrials.gov database. Available from: <http://www.clinicaltrials.gov>.
74. Commission Directive 2006/17/EC of 8 February 2006 implementing Directive 2004/23/EC of the European Parliament and of the Council as regards certain technical requirements for the donation, procurement and testing of human tissues and cells. Available from: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX%3A32006L0017>
75. Crowley CA, Smith WPW, Seah KTM, Lim SK, Khan WS. Cryopreservation of human adipose

tissues and adipose-derived stem cells with DMSO and/or trehalose: a systematic review. *Cells*. 2021;10(7):1837. Available from: <http://doi.org/10.3390/cells10071837>

76. Culenova M, Ziaran S, Danisovic L. Cells involved in urethral tissue engineering: systematic review. *Cell Transplant*. 2019;28(9-10):1106-1115. Available from: <https://doi.org/10.1177/0963689719854363>
77. Cunha AB, Hou J, Schuelke C. Machine learning for stem cell differentiation and proliferation classification on electrical impedance spectroscopy. *J Electr Bioimpedance*. 2019; 10(1):124-132. Available from: <http://doi.org/10.2478/joeb-2019-0018>
78. da Cruz L, Fynes K, Georgiadis O, Kerby J, Luo YH, Ahmado A, et al. Phase 1 clinical study of an embryonic stem cell-derived retinal pigment epithelium patch in age-related macular degeneration. *Nat Biotechnol*. 2018;36(4):328-337. Available from: <https://doi.org/10.1038/nbt.4114>
79. De Carvalho FG, Justice JN, Freitas EC, Kershaw EE, Sparks LM. Adipose tissue quality in aging: how structural and functional aspects of adipose tissue impact skeletal muscle quality. *Nutrients*. 2019;11(11):2553. Available from: <https://doi.org/10.3390/nu11112553>
80. de Castro LL, Lopes-Pacheco M, Weiss DJ, Cruz FF, Rocco PRM. Current understanding of the immunosuppressive properties of mesenchymal stromal cells. *J Mol Med (Berl)*. 2019;97(5):605-618. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00109-019-01776-y>
81. de Jong R, Houtgraaf JH, Samiei S, Boersma E, Duckers HJ. Intracoronary stem cell infusion after acute myocardial infarction: a meta-analysis and update on clinical trials. *Circ Cardiovasc Interv*. 2014;7(2):156-67. Available from: <https://doi.org/10.1161/CIRCINTERVENTIONS.113.001009>
82. Deinsberger J, Reisinger D, Weber B. Global trends in clinical trials involving pluripotent stem cells: a systematic multi-database analysis. *NPJ Regen Med*. 2020;5:15. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41536-020-00100-4>
83. Demaria M. Senescent cells: New target for an old treatment? *Mol Cell Oncol*. 2017; 4(3):e1299666. Available from: <http://doi.org/10.1080/23723556.2017.1299666>
84. Di Bella C, Farlie P, Penington AJ. Bone regeneration in a rabbit critical-sized skull defect using autologous adipose-derived cells. *Tissue Eng Part A*. 2008; 14(4):483-90. Available from: <https://doi.org/10.1089/tea.2007.0137>
85. Di Stefano AB, Grisafi F, Perez-Alea M, Castiglia M, Di Simone M, Meraviglia S, et al. Cell quality evaluation with gene expression analysis of spheroids (3D) and adherent (2D) adipose stem

- cells. *Gene*. 2021; 768:145269. Available from: <http://doi.org/10.1016/j.gene.2020.145269>
86. Di Stefano AB, Urrata V, Trapani M, Moschella F, Cordova A, Toia F. Systematic review on spheroids from adipose-derived stem cells: Spontaneous or artefact state? *J Cell Physiol*. 2022;237(12):4397-4411. Available from: <https://doi.org/10.1002/jcp.30892>
87. Directive 2001/83/EC European Commission 2007 Regulation EC No. 1394/2007. Available from: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/en/ALL/?uri=CELEX%3A32007R1394>
88. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006;8(4):315-7. Available from: <https://doi.org/10.1080/14653240600855905>
89. Dong Z, Pan T, Fang Y, Wei Z, Gu S, Fang G, et al. Purified CD34⁺ cells versus peripheral blood mononuclear cells in the treatment of angiitis-induced no-option critical limb ischaemia: 12-Month results of a prospective randomised single-blinded non-inferiority trial. *EBioMedicine*. 2018;35:46-57. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2018.08.038>
90. Donnelly H, Salmeron-Sanchez M, Dalby M. Designing stem cell niches for differentiation and self-renewal. *J R Soc Interface*. 2018. 15(145):20180388. Available from: <http://doi.org/10.1098/rsif.2018.0388>
91. Duval K, Grover H, Han LH, Mou Y, Pegoraro AF, Fredberg J, et al. Modeling physiological events in 2D vs. 3D cell culture. *Physiology (Bethesda)*. 2017;32(4):266-277. Available from: <https://doi.org/10.1152/physiol.00036.2016>
92. Eelen G, de Zeeuw P, Treps L, Harjes U, Wong BW, Carmeliet P. Endothelial cell metabolism. *Physiol Rev*. 2018;98(1):3-58. Available from: <http://doi.org/10.1152/physrev.00001.2017>
93. Egger D, Tripisciano C, Weber V, Dominici M, Kasper C. Dynamic cultivation of mesenchymal stem cell aggregates. *Bioengineering (Basel)*. 2018;5(2):48. Available from: <https://doi.org/10.3390/bioengineering5020048>
94. Eigenberger A, Felthaus O, Schratzenstaller T, Haerteis S, Utpatel K, Prantl L. The Effects of shear force-based processing of lipoaspirates on white adipose tissue and the differentiation potential of adipose derived stem cells. *Cells*. 2022;11(16):2543. Available from: <https://doi.org/10.3390/cells11162543>
95. EMA Guideline on quality, non-clinical and clinical requirements for investigational advanced

therapy medicinal products in clinical trials. January 2019. Available from: <https://www.ema.europa.eu/en/guideline-quality-non-clinical-clinical-requirements-investigational-advanced-therapy-medicinal>

96. FACT-JACIE International Standards for hematopoietic cellular therapy product collection, processing, and administration. 8th edition. v. 8.1. Dec 2021. Available from: <https://www.factglobal.org/standards/hct-standards>
97. Fanton Y, Robic B, Rummens JL, Daniëls A, Windmolders S, Willems L, et al. Cardiac atrial appendage stem cells engraft and differentiate into cardiomyocytes in vivo: A new tool for cardiac repair after MI. *Int J Cardiol.* 2015;201:10-9. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2015.07.066>
98. Fatima LA, Campello RS, Santosetal R. Estrogenreceptor 1 (ESR1) regulates VEGFA in adipose tissue. *Sci Rep.* 2017; 7(1). Available from: <https://doi.org/10.1038/s41598-017-16686-7>
99. FDA Content and Review of Chemistry, Manufacturing, and Control (CMC) Information for Human Somatic Cell Therapy Investigational New Drug Applications (INDs). April 2008. Available from: <https://www.fda.gov/media/73624/download>
100. FDA Regulation of Human Cells, Tissues, and Cellular and Tissue-Based Products (HCT/Ps) - Small Entity Compliance Guide. Available from: <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/regulation-human-cells-tissues-and-cellular-and-tissue-based-products-hctps-small-entity-compliance>
101. Fenech M. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay evolution into a more comprehensive method to measure chromosomal instability. *Genes (Basel).* 2020;11(10):1203. Available from: <https://doi.org/10.3390/genes11101203>
102. Festing MF. On determining sample size in experiments involving laboratory animals. *Lab Anim.* 2018;52(4):341-350. Available from: <https://doi.org/10.1177/0023677217738268>
103. Figiel-Dabrowska A, Radoszkiewicz K, Rybkowska P, Krzesniak NE, Sulejczak D, Samowska A. Neurogenic and neuroprotective potential of stem/stromal cells derived from adipose tissue. *Cells.* 2021;10(6):1475. Available from: <https://doi.org/10.3390/cells10061475>
104. Fisher SA, Brunskill SJ, Doree C, Mathur A, Taggart DP, Martin-Rendon E. Stem cell therapy for chronic ischaemic heart disease and congestive heart failure. *Cochrane Database Syst Rev.* 2014; 4:CD007888. Available from: <https://doi.org/10.1002/14651858.CD007888.pub2>

105. Fisher SA, Zhang H, Doree C, Mathur A, Martin-Rendon E. Stem cell treatment for acute myocardial infarction. *Cochrane Database Syst Rev.* 2015; 2015(9):CD006536. Available from: <http://doi.org/10.1002/14651858.CD006536>
106. Fitzgerald SJ, Cobb JS, Janorkar AV. Comparison of the formation, adipogenic maturation, and retention of human adipose-derived stem cell spheroids in scaffold-free culture techniques. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2020; 108(7):3022-3032. Available from: <https://doi.org/10.1002/jbm.b.34631>
107. Follin B, Juhl M, Cohen S, Pedersen AE, Gad M, Kastrup J, Ekblond A. Human adipose-derived stromal cells in a clinically applicable injectable alginate hydrogel: Phenotypic and immunomodulatory evaluation. *Cytotherapy.* 2015;17(8):1104-18. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2015.04.008>
108. Frangogiannis NG. Cell therapy for peripheral artery disease. *Curr Opin Pharmacol.* 2018;39:27-34. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.coph.2018.01.005>
109. Freshney RI. *Culture of animal cells: a manual of basic technique and specialized applications*, 6th ed. New Jersey: Wiley-Blackwell; 2010. 672 p. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1290/BR090501.1>
110. Fu Y, Li R, Zhong J, Fu N, Wei X, Cun X, et al. Adipogenic differentiation potential of adipose-derived mesenchymal stem cells from ovariectomized mice. *Cell Prolif.* 2014; 47:604-614. Available from: <https://doi.org/10.1111/cpr.12131>
111. Fuhrmann-Stroissnigg H, Santiago FE, Grassi D, Ling Y, Niedernhofer LJ, Robbins PD. SA- β -galactosidase-based screening assay for the identification of senotherapeutic drugs. *J Vis Exp.* 2019;(148). Available from: <https://doi.org/10.3791/58133>
112. Mrkovački J, Srzentić Dražilov S, Spasovski V, Fazlagić A, Pavlović S, Nikčević G. Case report: successful therapy of spontaneously occurring canine degenerative lumbosacral stenosis using autologous adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. *Front Vet Sci.* 2021;8:732073. Available from: <https://doi.org/10.3389/fvets.2021.732073>
113. Ganey T, Hutton WC, Moseley T, Hedrick M, Meisel HJ. Intervertebral disc repair using adipose tissue-derived stem and regenerative cells: experiments in a canine model. *Spine.* 2009;34(21):2297-304. Available from: <https://doi.org/10.1097/BRS.0b013e3181a54157>
114. Gao J, Yuan Y, Chen Y. PDX1 transfection induces human adipose derived stem cells

- differentiation into islet-like cells: what is the benefit for diabetic rats? *Pharmazie*. 2018;73(4):213-217. Available from: <https://doi.org/10.1691/ph.2018.7993>
115. Gao S, Guo X, Zhao S, Jin Y, Zhou F, Yuan P, et al. Differentiation of human adipose-derived stem cells into neuron/motoneuron-like cells for cell replacement therapy of spinal cord injury. *Cell Death Dis*. 2019;10(8):597. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41419-019-1772-1>
116. Gao W, Chen D, Liu G, Ran X. Autologous stem cell therapy for peripheral arterial disease: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Stem Cell Res Ther*. 2019;10(1):140. Available from: <https://doi.org/10.1186/s13287-019-1254-5>
117. Gao W, Yang X, Du J, Wang H, Zhong H, Jiang J, Yang C. Glucocorticoid guides mobilization of bone marrow stem/progenitor cells via FPR and CXCR4 coupling. *Stem Cell Res Ther*. 2021;12(1):16. Available from: <https://doi.org/10.1186/s13287-020-02071-1>
118. Georgiev-Hristov T, García-Arranz M, Trébol-López J, Barba-Recreo P, García-Olmo D. Searching for the optimal donor for allogenic adipose-derived stem cells: a comprehensive review. *Pharmaceutics*. 2022; 14(11): 2338. Available from: <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14112338>
119. Ghaneialvar H, Soltani L, Hamid R, Lotfi A. Characterization and classification of mesenchymal stem cells in several species using surface markers for cell therapy purposes. *Indian J Clin Biochem*. 2018; 33(1):46-52. Available from: <https://doi.org/10.1007/s12291-017-0641-x>
120. Giedrimiene D, King R. Burden of cardiovascular disease (CVD) on economic cost. Comparison of outcomes in US and Europe. *Circulation: Cardiovascular Quality and Outcomes*. 2017;10:A207. Available from: https://doi.org/10.1161/circoutcomes.10.suppl_3.207
121. Go AS, Mozaffarian D, Roger VL, Benjamin EJ, Berry JD, Blaha MJ, et al. American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. Heart disease and stroke statistics-2014 update: a report from the American Heart Association. *Circulation*. 2014;129(3):e28-e292. Available from: <https://doi.org/10.1161/01.cir.0000441139.02102.80>
122. Golovynska I, Kalmukova O, Svitina HM, Kyryk VM, Shablii VA, Senchylo NV, et al. Morpho-functional characteristics of bone marrow multipotent mesenchymal stromal cells after activation or inhibition of epidermal growth factor and toll-like receptors or treatment with DNA intercalator cisplatin. *Cytometry Part A*. 2019; 95A:24-33. Available from: <https://doi.org/10.1002/cyto.a.23593>

123. González-Gualda E, Baker AG, Fruk L, Muñoz-Espín D. A guide to assessing cellular senescence in vitro and in vivo. *FEBS J.* 2021; 288(1):56-80. Available from: <http://doi.org/10.1111/febs.15570>
124. Gotoh M, Yamamoto T, Shimizu S, Matsukawa Y, Kato M, Majima T, et al. Treatment of male stress urinary incontinence using autologous adipose-derived regenerative cells: Long-term efficacy and safety. *Int J Urol.* 2019; 26:400-5. Available from: <https://doi.org/10.1111/iju.13886>
125. Govbakh I, Kyryk V, Ustymenko A, Rubtsov V, Tsupykov O, Bulgakova N, et al. Stem cell therapy enhances motor activity of triceps surae muscle in mice with hereditary peripheral neuropathy. *Int J Mol Sci.* 2021; 22(21):12026. Available from: <https://doi.org/10.3390/ijms222112026>
126. Grosso A, Burger MG, Lunger A, Schaefer DJ, Banfi A, Di Maggio N. It Takes two to tango: coupling of angiogenesis and osteogenesis for bone regeneration. *Front Bioeng Biotechnol.* 2017; 5:68. Available from: <https://doi.org/10.3389/fbioe.2017.00068>
127. Gu Y, Rampin A, Alvino VV, Spinetti G, Madeddu P. Cell therapy for critical limb ischemia: advantages, limitations, and new perspectives for treatment of patients with critical diabetic vasculopathy. *Curr Diab Rep.* 2021 Mar 2;21(3):11. Available from: <https://doi.org/10.1007/s11892-021-01378-4>
128. Guadix JA, López-Beas J, Clares B, Soriano-Ruiz JL, Zugaza JL, Gálvez-Martín P. Principal criteria for evaluating the quality, safety and efficacy of hMSC-based products in clinical practice: current approaches and challenges. *Pharmaceutics.* 2019; 11(11):552. Available from: <http://doi.org/10.3390/pharmaceutics11110552>
129. Guo DL, Wang ZG, Xiong LK, Pan LY, Zhu Q, Yuan YF, et al. Hepatogenic differentiation from human adipose-derived stem cells and application for mouse acute liver injury. *Artif Cells Nanomed Biotechnol.* 2017;45(2):224-232. Available from: <https://doi.org/10.3109/21691401.2016.1138495>
130. Guo Y, Wysoczynski M, Nong Y, Tomlin A, Zhu X, Gumpert AM, et al. Repeated doses of cardiac mesenchymal cells are therapeutically superior to a single dose in mice with old myocardial infarction. *Basic Res Cardiol.* 2017 Mar;112(2):18. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00395-017-0606-5>
131. Gurumurthy B, Bierdeman PC, Janorkar AV. Spheroid model for functional osteogenic evaluation

- of human adipose derived stem cells. *J Biomed Mater Res A*. 2017; 105(4):1230-1236. Available from: <https://doi.org/10.1002/jbm.a.35974>
132. Gustafson B, Nerstedt A, Smith U. Reduced subcutaneous adipogenesis in human hypertrophic obesity is linked to senescent precursor cells. *Nat Commun*. 2019; 10(1):2757. Available from: <http://doi.org/10.1038/s41467-019-10688-x>
133. Haack-Sørensen M, Friis T, Mathiasen AB, Jørgensen E, Hansen L, Dickmeiss E, et al. Direct intramyocardial mesenchymal stromal cell injections in patients with severe refractory angina: one-year follow-up. *Cell Transplant*. 2013;22(3):521-8. Available from: <https://doi.org/10.3727/096368912X636830>
134. Hare JM, Traverse JH, Henry TD, Dib N, Strumpf RK, Schulman SP, et al. A randomized, double-blind, placebo-controlled, dose-escalation study of intravenous adult human mesenchymal stem cells (Prochymal) after acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol*. 2009;54(24):2277-86. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2009.06.055>
135. Harrell C, Fellabaum C, Jovicic N, Djonov V, Arsenijevic N, Volarevic V. Molecular mechanisms responsible for therapeutic potential of mesenchymal stem cell-derived secretome. *Cells*. 2019; 8(5):467. Available from: <https://doi.org/10.3390/cells8050467>
136. Hawley TS, Hawley RG. *Flow cytometry protocols*. Humana Totowa, NJ, 2011. 485 p. Available from: <https://doi.org/10.1007/978-1-61737-950-5>
137. Hayati F, Ghamsari SM, Dehghan MM, Oryan A. Effects of carbomer 940 hydrogel on burn wounds: an in vitro and in vivo study. *J Dermatolog Treat*. 2018;29(6):593-599. Available from: <http://doi.org/10.1080/09546634.2018.1426823>
138. Hayrapetyan A, Bongio M, Leeuwenburgh SC, Jansen JA, van den Beucken JJ. Effect of nano-HA/collagen composite hydrogels on osteogenic behavior of mesenchymal stromal cells. *Stem Cell Rev Rep*. 2016;12(3):352-64. Available from: <https://doi.org/10.1007/s12015-016-9644-x>
139. Hebert TL, Wu X, Yu G, Goh BC, Halvorsen YD, Wang Z, Moro C, Gimble JM. Culture effects of epidermal growth factor (EGF) and basic fibroblast growth factor (bFGF) on cryopreserved human adipose-derived stromal/stem cell proliferation and adipogenesis. *J Tissue Eng Regen Med*. 2009;3(7):553-61. Available from: <https://doi.org/10.1002/term.198>
140. Heidari F, Razmkhah M, Razban V, Erfani N. Effects of indoleamine 2, 3-dioxygenase (IDO) silencing on immunomodulatory function and cancer-promoting characteristic of adipose-derived

- mesenchymal stem cells (ASCs). *Cell Biol Int*. 2021;45(12):2544-2556. Available from: <https://doi.org/10.1002/cbin.11698>
141. Hendawy H, Kaneda M, Metwally E, Shimada K, Tanaka T, Tanaka R. A comparative study of the effect of anatomical site on multiple differentiation of adipose-derived stem cells in rats. *Cells*. 2021;10(9):2469. Available from: <https://doi.org/10.3390/cells10092469>
142. Henry TD, Pepine CJ, Lambert CR, Traverse JH, Schatz R, Costa M, et al. The Athena trials: Autologous adipose-derived regenerative cells for refractory chronic myocardial ischemia with left ventricular dysfunction. *Catheter Cardiovasc Interv*. 2017; 89(2):169-177. Available from: <https://doi.org/10.1002/ccd.26601>
143. Hernandez-Segura A, Nehme J, Demaria M. Hallmarks of cellular senescence. *Trends Cell Biol*. 2018; 28(6):436-453. Available from: <http://doi.org/10.1016/j.tcb.2018.02.001>
144. Hernandez-Segura A, Rubingh R, Demaria M. Identification of stable senescence-associated reference genes. *Aging Cell*. 2019; 18(2):e12911. Available from: <http://doi.org/10.1111/accel.12911>
145. Hetemäki N, Mikkola TS, Tikkanen MJ, Wang F, Hämäläinen E, Turpeinen U, et al. Adipose tissue estrogen production and metabolism in premenopausal women. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2021;209:105849. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2021.105849>
146. Ho D, Zhao X, Gao S, Hong C, Vatner DE, Vatner SF. Heart rate and electrocardiography monitoring in mice. *Curr Protoc Mouse Biol*. 2011;1:123-139. Available from: <https://doi.org/10.1002/9780470942390.mo100159>
147. Hong KU, Guo Y, Li QH, Cao P, Al-Maqtari T, Vajravelu BN, et al. c-kit⁺ Cardiac stem cells alleviate post-myocardial infarction left ventricular dysfunction despite poor engraftment and negligible retention in the recipient heart. *PLoS One*. 2014;9:e96725. Available from: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0096725>
148. Horwitz EM, Le Blanc K, Dominici M, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini FC et al. Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 2005. 7(5):393-395. Available from: <https://doi.org/10.1080/14653240500319234>
149. Houtgraaf JH, den Dekker WK, van Dalen BM, Springeling T, de Jong R, van Geuns RJ, et al. First experience in humans using adipose tissue-derived regenerative cells in the treatment of

- patients with ST-segment elevation myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol.* 2012;59(5):539-40. Available from: <http://doi.org/10.1016/j.jacc.2011.09.065>
150. Hu C, Zhao L, Li L. Current understanding of adipose-derived mesenchymal stem cell-based therapies in liver diseases. *Stem Cell Res Ther.* 2019;10(1):199. Available from: <https://doi.org/10.1186/s13287-019-1310-1>
151. Hu K, Olsen BR. Vascular endothelial growth factor control mechanisms in skeletal growth and repair. *Dev Dyn.* 2017; 246(4):227-234. Available from: <https://doi.org/10.1002/dvdy.24463>
152. Huang H, Huang W. Regulation of endothelial progenitor cell functions in ischemic heart disease: new therapeutic targets for cardiac remodeling and repair. *Front Cardiovasc Med.* 2022;9:896782. Available from: <https://doi.org/10.3389/fcvm.2022.896782>
153. Hutchings G, Janowicz K, Moncrieff L, Dompe C, Strauss E, Kocherova I, et al. The proliferation and differentiation of adipose-derived stem cells in neovascularization and angiogenesis. *Int J Mol Sci.* 2020;21(11):3790. Available from: <https://doi.org/10.3390/ijms21113790>
154. Iaquinta MR, Mazzoni E, Bononi I, Rotondo JC, Mazziotta C, Montesi M, et al. Adult stem cells for bone regeneration and repair. *Front Cell Dev Biol.* 2019; 7:268. Available from: <https://doi.org/10.3389/fcell.2019.00268>
155. Ichim TE, Solano F, Brenes R, Glenn E, Chang J, Chan K, et al. Placental mesenchymal and cord blood stem cell therapy for dilated cardiomyopathy. *Reprod Biomed Online.* 2008;16(6):898-905. Available from: [https://doi.org/10.1016/s1472-6483\(10\)60159-9](https://doi.org/10.1016/s1472-6483(10)60159-9)
156. Ilic D, Ogilvie C. Concise review: Human embryonic stem cells-what have we done? What are we doing? Where are we going? *Stem Cells.* 2017;35(1):17-25. Available from: <https://doi.org/10.1002/stem.2450>
157. Holley SM, Kamdjou T, Reidling JC, Fury B, Coleal-Bergum D, Bauer G, et al. Therapeutic effects of stem cells in rodent models of Huntington's disease: Review and electrophysiological findings. *CNS Neurosci Ther.* 2018;24(4):329-342. Available from: <https://doi.org/10.1111/cns.12839>
158. Ishigami S, Sano T, Krishnapura S, Ito T, Sano S. An overview of stem cell therapy for paediatric heart failure. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2020; 58(5):881-887. Available from: <https://doi.org/10.1093/ejcts/ezaa155>
159. Ishii T, Eto K. Fetal stem cell transplantation: Past, present, and future. *World J Stem Cells.* 2014;

- 6(4):404-20. Available from: <https://doi.org/10.4252/wjsc.v6.i4.404>
160. Ivanischev V, Ustymenko A, Kyryk V, Butenko G. Comparative morphometric study of adipose tissue in ovariectomized mice of different ages. *Cell Organ Transpl.* 2020; 8(1):64-69. Available from: <https://doi.org/10.22494/cot.v8i1.108>
161. Jeevanantham V, Butler M, Saad A, Abdel-Latif A, Zuba-Surma EK, Dawn B. Adult bone marrow cell therapy improves survival and induces long-term improvement in cardiac parameters: a systematic review and meta-analysis. *Circulation.* 2012;126(5):551-68. Available from: <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.111.086074>
162. Jennewein M, Bubel M, Guthörl S, Metzger W, Weigert M, Pohlemann T, et al. Two- and three-dimensional co-culture models of soft tissue healing: pericyte-endothelial cell interaction. *Cell Tissue Res.* 2016;365(2):279-93. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00441-016-2391-0>
163. Jha AK, Tharp KM, Ye J, Santiago-Ortiz JL, Jackson WM, Stahl A, et al. Enhanced survival and engraftment of transplanted stem cells using growth factor sequestering hydrogels. *Biomaterials.* 2015. 47:1-12. Available from: <http://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2014.12.043>
164. Jones GN, Moschidou D, Abdulrazzak H, Kalirai BS, Vanleene M, Osatis S, Shefelbine SJ, et al. Potential of human fetal chorionic stem cells for the treatment of osteogenesis imperfecta. *Stem Cells Dev.* 2014;23(3):262-76. Available from: <https://doi.org/10.1089/scd.2013.0132>
165. Joo HS, Suh JH, Lee HJ, Bang ES, Lee JM. Current knowledge and future perspectives on mesenchymal stem cell-derived exosomes as a new therapeutic agent. *Int J Mol Sci.* 2020;21(3):727. Available from: <https://doi.org/10.3390/ijms21030727>
166. Jung YJ, Park YY, Huh JW, Hong SB. The effect of human adipose-derived stem cells on lipopolysaccharide-induced acute respiratory distress syndrome in mice. *Ann Transl Med.* 2019;7(22):674. Available from: <https://doi.org/10.21037/atm.2019.10.48>
167. Kara RJ, Bolli P, Karakikes I, Matsunaga I, Tripodi J, Tanweer O, et al. Fetal cells traffic to injured maternal myocardium and undergo cardiac differentiation. *Circ Res.* 2012;110(1):82-93. Available from: <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.111.249037>
168. Khomenko V. Review of international and national principles of law in the field of tissue and cell transplantation and the approaches of improving the regulatory framework of hematopoietic stem cells transplantation in Ukraine. *Cell Organ Transpl.* 2018; 6(1):22-37. Available from: <https://doi.org/10.22494/cot.v6i1.80>

169. Kim KS, Kim HS, Park JM, Kim HW, Park MK, Lee HS, Lim DS, Lee TH, Chopp M, Moon J. Long-term immunomodulatory effect of amniotic stem cells in an Alzheimer's disease model. *Neurobiol Aging*. 2013;34(10):2408-20. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2013.03.029>
170. Kim MH, Lee YJ, Kang JH. Stem cell monitoring with a direct or indirect labeling method. *Nucl Med Mol Imaging*. 2016;50(4):275-283. Available from: <https://doi.org/10.1007/s13139-015-0380-y>
171. Kirkland JL, Tchkonina T. Cellular senescence: a translational perspective. *EBioMedicine*. 2017; 21:21-28. Available from: <http://doi.org/10.1016/j.ebiom.2017.04.013>
172. Kleineidam B, Sielker S, Hanisch M, Kleinheinz J, Jung S. The micromass formation potential of human adipose-derived stromal cells isolated from different various origins. *Head Face Med*. 2018; 14(1):19. Available from: <https://doi.org/10.1186/s13005-018-0178-0>
173. Kobayashi M, Inoue K, Warabi E, Minami T, Kodama T. A simple method of isolating mouse aortic endothelial cells. *J Atheroscler Thromb*. 2005;12(3):138-42. Available from: <https://doi.org/10.5551/jat.12.138>
174. Koninckx R, Daniëls A, Windmolders S, Mees U, Macianskiene R, Mubagwa K, et al. The cardiac atrial appendage stem cell: a new and promising candidate for myocardial repair. *Cardiovasc Res*. 2013; 97(3):413-23. Available from: <https://doi.org/10.1093/cvr/cvs427>
175. Koo S, Won M, Li H, Kim WY, Li M, Yan C, et al. Harnessing α -1-fucosidase for in vivo cellular senescence imaging. *Chem Sci*. 2021; 12(29):10054-10062. Available from: <http://doi.org/10.1039/d1sc02259h>
176. Kouroupis D, Correa D. Increased mesenchymal stem cell functionalization in three-dimensional manufacturing settings for enhanced therapeutic applications. *Front Bioeng Biotechnol*. 2021;9:621748. Available from: <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.621748>
177. Krastev TK, Schop SJ, Hommes J, Piatkowski A, van der Hulst RRWJ. Autologous fat transfer to treat fibrosis and scar-related conditions: A systematic review and meta-analysis. *J Plast Reconstr Aesthet Surg*. 2020; 73(11):2033-2048. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.bjps.2020.08.023>
178. Krause M, Phan TG, Ma H, Sobey CG, Lim R. Cell-based therapies for stroke: are we there yet? *Front Neurol*. 2019;10:656. Available from: <https://doi.org/10.3389/fneur.2019.00656>
179. Kronemberger GS, Matsui RAM, Miranda GASCE, Granjeiro JM, Baptista LS. Cartilage and

- bone tissue engineering using adipose stromal/stem cells spheroids as building blocks. *World J Stem Cells*. 2020;12(2):110-122. Available from: <https://doi.org/10.4252/wjsc.v12.i2.110>
180. Kuchma M, Shablii V, Kyryk V, Onishchenko A, Lobitseva G. Cryopreserved human placental tissue as source of hematopoietic and mesenchymal stem cells. *World Cord Blood Congress III "Cord blood transplantation and immunobiology of haematopoietic stem cell transplant"*, Rome (IT). 2011:171.
181. Kuchma MD, Kyryk VM, Svitina HM, Shablii YuM, Lukash LL, Lobyntseva GS, et al. Comparative analysis of the hematopoietic progenitor cells from placenta, cord blood, and fetal liver, based on their immunophenotype. *BioMed Res Int*. 2015; 2015:418752. Available from: <https://doi.org/10.1155/2015/418752>
182. Kuchuk O, Kyryk V. Osteogenic induction of multipotent stromal cells of mice adipose tissue. 4th International IMBG Conference for young scientists "Molecular biology: advances and perspectives", Kyiv. 2011:166.
183. Kuchuk O, Tsupykov O, Kyryk V. Cultivation and osteogenic differentiation of murine bone marrow multipotent stromal cells in micromass culture. *Abstracts of the World Conference on Regenerative Medicine, Leipzig (DE)*. 2011. *Regenerative Medicine*. 2011; 6(6, Suppl. 2):274-276. Available from: <https://doi.org/10.2217/rme.12.16>.
184. Kuchuk OV, Kyryk VM. Stepwise differentiation of multipotent cells from murine adipose tissue in osteogenic direction. *Problems of Cryobiology and Cryomedicine*. 2012;22(2):161-164. Available from: <http://cryo.org.ua/journal/index.php/probl-cryobiol-cryomed/article/view/80>
185. Kumar M, Kasala ER, Bodduluru LN, Dahiya V, Sharma D, Kumar V, et al. Animal models of myocardial infarction: Mainstay in clinical translation. *Regul Toxicol Pharmacol*. 2016; 76:221-30. Available from: <http://doi.org/10.1016/j.yrtph.2016.03.005>
186. Kumari R, Jat P. Mechanisms of cellular senescence: cell cycle arrest and senescence associated secretory phenotype. *Front Cell Dev Biol*. 2021; 9:645593. Available from: <http://doi.org/10.3389/fcell.2021.645593>
187. Kumboyono K, Chomsy IN, Nurwidyaningtyas W, Cesa FY, Tjahjono CT, Wihastuti TA. Differences in senescence of late endothelial progenitor cells in non-smokers and smokers. *Tob Induc Dis*. 2021; 19:10. Available from: <http://doi.org/10.18332/tid/135320>
188. Kusuma GD, Manuelpillai U, Abumaree MH, Pertile MD, Brennecke SP, Kalionis B.

Mesenchymal stem cells reside in a vascular niche in the decidua basalis and are absent in remodelled spiral arterioles. *Placenta*. 2015; 36(3):312-21. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2014.12.014>

189. Kwon YW, Heo SC, Jeong GO, Yoon JW, Mo WM, Lee MJ, et al. Tumor necrosis factor- α -activated mesenchymal stem cells promote endothelial progenitor cell homing and angiogenesis. *Biochim Biophys Acta*. 2013;1832(12):2136-44. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2013.08.002>
190. Kyryk V, Kuchuk O, Klymenko P. Regenerative effects of mouse adipose-derived multipotent stromal cells in a micromass graft for the treatment of bone injury model. *Anti-Aging Eastern Europe*. 2022; 1(1):75-86. Available from: <https://doi.org/10.56543/aaeeu.2022.1.1.11>
191. Kyryk V, Kuchuk O, Mamchur A, Ustymenko A, Lutsenko T, Tsupikov O, et al. 3D culture of murine adipose-derived multipotent mesenchymal stromal cells in hydrogel based on carbomer 974P. *Cell Organ Transpl*. 2018; 6(2):195-201. Available from: <https://doi.org/10.22494/cot.v6i2.91>
192. Kyryk V, Kuchuk O, Poberezhny P, Mamchur A, Klymenko P, Rybachuk O, et al. In vivo survival of murine adipose-derived stem cells in hydrogel composed of carbomer 974P. *Збірник тез науково-практичної конференції з міжнародною участю "Трансплантація – сьогоднішня, минуле та майбутнє"*, Київ. 2014:39.
193. Kyryk V, Tsupikov O, Ustymenko A, Govbakh I, Smozhanik E, Butenko G, et al. Age-related ultrastructural changes in spheroids of the adipose-derived multipotent mesenchymal stromal cells from ovariectomized mice. *Front Cell Neurosci*. 2023; 17. Available from: <https://doi.org/10.3389/fncel.2023.1072750>
194. Kyryk V, Ustymenko A, Lutsenko T, Klymenko P, Tsupikov O. Regenerative effects of mouse aortic endothelial cells in a murine model of critical limb ischemia. *Cell Organ Transpl*. 2022; 10(2):90-96. Available from: <https://doi.org/10.22494/cot.v10i2.143>
195. Kyryk V, Ustymenko A. Isolation and phenotyping of cardiac-derived progenitor cells from neonatal mice. *Cell Organ Transpl*. 2021; 9(2):126-133. Available from: <https://doi.org/10.22494/cot.v9i2.125>
196. Kyryk VM. Advances in stem cells therapy for cardiovascular diseases. *Conference Abstracts "Regenerative technologies in modern medicine"*, Odesa. 2017. *Cell Organ Transpl*. 2017;

- 5(1):133. Available from: <https://doi.org/10.22494/cot.v5i1.73>
197. Kyryk VM. Phenotyping and sorting of murine bone marrow haematopoietic stem cells using flow cytometry. *Biotechnologia Acta*. 2014; 7(6):51-56. Available from: <http://doi.org/10.15407/biotech7.06.051>
198. de Klerk E, Hebrok M. Stem cell-based clinical trials for diabetes mellitus. *Front Endocrinol*. 2021;12:631463. Available from: <https://doi.org/10.3389/fendo.2021.631463>
199. Laloze J, Varin A, Gilhodes J, Bertheuil N, Grolleau JL, Brie J, et al. Cell-assisted lipotransfer: Friend or foe in fat grafting? Systematic review and meta-analysis. *J Tissue Eng Regen Med*. 2018;12(2):e1237-e1250. Available from: <https://doi.org/10.1002/term.2524>
200. Lang D, Glukhov AV. High-resolution optical mapping of the mouse sino-atrial node. *J Vis Exp*. 2016; 118:54773. Available from: <https://doi.org/10.3791/54773>
201. Lauden L, Boukouaci W, Borlado LR, López IP, Sepúlveda P, Tamouza R, et al. Allogenicity of human cardiac stem/progenitor cells orchestrated by programmed death ligand 1. *Circ Res*. 2013;112(3):451-64. Available from: <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.112.276501>
202. Lawrence I, Bene M, Nacarelli T, Azar A, Cohen JZ, Torres C, et al. Correlations between age, functional status, and the senescence-associated proteins HMGB2 and p16INK4a. *Geroscience*. 2018; 40(2):193-199. Available from: <http://doi.org/10.1007/s11357-018-0015-1>
203. Le Q, Madhu V, Hart JM, Farber CR, Zunder ER, Dighe AS, et al. Current evidence on potential of adipose derived stem cells to enhance bone regeneration and future projection. *World J Stem Cells*. 2021; 26; 13(9):1248-1277. Available from: <https://doi.org/10.4252/wjsc.v13.i9.1248>
204. Lee H, Choi J, Shin SS, Yoon M. Effects of Korean red ginseng (*Panax ginseng*) on obesity and adipose inflammation in ovariectomized mice. *J Ethnopharmacol*. 2016; 178:229-37. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2015.12.017>
205. Lee HW, Lee HC, Park JH, Kim BW, Ahn J, Kim JH, et al. Effects of intracoronary administration of autologous adipose tissue-derived stem cells on acute myocardial infarction in a porcine model. *Yonsei Med J*. 2015; 56(6):1522-9. Available from: <https://doi.org/10.3349/ymj.2015.56.6.1522>
206. Lee J, Lee S, Kim SM, Shin H. Size-controlled human adipose-derived stem cell spheroids hybridized with single-segmented nanofibers and their effect on viability and stem cell differentiation. *Biomater Res*. 2021; 25:14. Available from: <https://doi.org/10.1186/s40824-021->

00215-9

207. Lee JH, Han YS, Lee SH. Long-duration three-dimensional spheroid culture promotes angiogenic activities of adipose-derived mesenchymal stem cells. *Biomol Ther.* 2016; 24(3):260-7. Available from: <https://doi.org/10.4062/biomolther.2015.146>
208. Lee S, Chae DS, Song BW, Lim S, Kim SW, Kim IK, et al. ADSC-based cell therapies for musculoskeletal disorders: a review of recent clinical trials. *Int J Mol Sci.* 2021; 22(19):10586. Available from: <https://doi.org/10.3390/ijms221910586>
209. Lee WS, Kim HJ, Kim KI, Kim GB, Jin W. Intra-articular injection of autologous adipose tissue-derived mesenchymal stem cells for the treatment of knee osteoarthritis: A phase IIB, randomized, placebo-controlled clinical trial. *Stem Cells Transl Med.* 2019;8(6):504-511. Available from: <https://doi.org/10.1002/sctm.18-0122>
210. Leistner DM, Fischer-Rasokat U, Honold J, Seeger FH, Schächinger V, Lehmann R, et al. Transplantation of progenitor cells and regeneration enhancement in acute myocardial infarction (TOPCARE-AMI): final 5-year results suggest long-term safety and efficacy. *Clin Res Cardiol.* 2011; 100(10):925-34. Available from: <http://doi.org/10.1007/s00392-011-0327-y>
211. Lendeckel S, Jödicke A, Christophis P, Heidinger K, Wolff J, Fraser JK, et al. Autologous stem cells (adipose) and fibrin glue used to treat widespread traumatic calvarial defects: case report. *J Craniomaxillofac Surg.* 2004;32(6):370-3. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jcms.2004.06.002>
212. Leong YY, Ng WH, Ellison-Hughes GM, Tan JJ. Cardiac stem cells for myocardial regeneration: they are not alone. *Front Cardiovasc Med.* 2017;4:47. Available from: <http://doi.org/10.3389/fcvm.2017.00047>
213. Levine ME, Lu AT, Chen BH, Hernandez DG, Singleton AB, Ferrucci L, et al. Menopause accelerates biological aging. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2016; 113(33):9327-32. Available from: <https://doi.org/10.1073/pnas.1604558113>
214. Li CW, Lau YT, Lam KL, Chan BP. Mechanically induced formation and maturation of 3D-matrix adhesions (3DMAs) in human mesenchymal stem cells. *Biomaterials.* 2020; 258:120292. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2020.120292>
215. Li H, Wang C, Liu S, Guo Y, Chen J. Characterization of three-dimensional multipotent adipose-derived stem cell spheroids. *Biocell.* 2022; 46:1705-1716. Available from:

<https://doi.org/10.32604/biocell.2022.018442>

216. Li K, Shi G, Lei X, Huang Y, Li X, Bai L, et al. Age-related alteration in characteristics, function, and transcription features of ADSCs. *Stem Cell Res Ther.* 2021;12(1):473. Available from: <https://doi.org/10.1186/s13287-021-02509-0>
217. Li L, Xia Y. Study of adipose tissue-derived mesenchymal stem cells transplantation for rats with dilated cardiomyopathy. *Ann Thorac Cardiovasc Surg.* 2014; 20(5):398-406. Available from: <http://doi.org/10.5761/atcs.0a.13-00104>
218. Li M, Chen C. The Efficacy of cell-assisted lipotransfer versus conventional lipotransfer in breast augmentation: a systematic review and meta-analysis. *Aesthetic Plast Surg.* 2021; 45(4):1478-1486. Available from: <http://doi.org/10.1007/s00266-020-02123-0>
219. Li M, Ma J, Gao Y, Dong M, Zheng Z, Li Y, et al. Epithelial differentiation of human adipose-derived stem cells (hASCs) undergoing three-dimensional (3D) cultivation with collagen sponge scaffold (CSS) via an indirect co-culture strategy. *Stem Cell Res Ther.* 2020 Mar 31;11(1):141. Available from: <https://doi.org/10.1186/s13287-020-01645-3>
220. Li N, Long B, Han W, Yuan S, Wang K. microRNAs: important regulators of stem cells. *Stem Cell Res Ther.* 2017;8(1):110. Available from: <https://doi.org/10.1186/s13287-017-0551-0>
221. Li Z, Solomonidis EG, Meloni M, Taylor RS, Duffin R, Dobie R, et al. Single-cell transcriptome analyses reveal novel targets modulating cardiac neovascularization by resident endothelial cells following myocardial infarction. *Eur Heart J.* 2019; 40:2507-2520. Available from: <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehz305>
222. Lin YC, Leu S, Sun CK, Yen CH, Kao YH, Chang LT, et al. Early combined treatment with sildenafil and adipose-derived mesenchymal stem cells preserves heart function in rat dilated cardiomyopathy. *J Transl Med.* 2010;8:88. Available from: <https://doi.org/10.1186/1479-5876-8-88>
223. Liotta F, Annunziato F, Castellani S, Boddi M, Alterini B, Castellini G, et al. Therapeutic efficacy of autologous non-mobilized enriched circulating endothelial progenitors in patients with critical limb ischemia – The SCelta Trial. *Circ J.* 2018;82(6):1688-1698. Available from: <https://doi.org/10.1253/circj.CJ-17-0720>
224. Liu J, Ding Y, Liu Zh, Liang X. Senescence in mesenchymal stem cells: functional alterations, molecular mechanisms, and rejuvenation strategies. *Front Cell Dev Biol.* 2020; 8:258. Available

from: <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.00258>

225. Liu M, Lei H, Dong P, Fu X, Yang Z, Yang Y, et al. Adipose-derived mesenchymal stem cells from the elderly exhibit decreased migration and differentiation abilities with senescent properties. *Cell Transplantation*. 2017; 26(9):1505-1519. Available from: <https://doi.org/10.1177/0963689717721221>
226. Liu M, Zeng X, Ma C, Yi H, Ali Z, Mou X, et al. Injectable hydrogels for cartilage and bone tissue engineering. *Bone Res*. 2017;5:17014. Available from: <https://doi.org/10.1038/boneres.2017.14>
227. Liu YW, Su CT, Yen CY, Lin LJ, Hsieh PC. Arrhythmogenesis: a roadblock to cardiac stem cell therapy. *Curr Treat Options Cardiovasc Med*. 2016;18(10):61. Available from: <http://doi.org/10.1007/s11936-016-0481-7>
228. Lockhart AR, Hakakian SC, Bimbaum Z, Aronowitz AJ. Quality control considerations for clinical use of stromal vascular fraction (SVF) based therapies in the United States. *Stem Cell Res Ther*. 2016; 1(1):30-40.
229. López-Paniagua M, de la Mata A, Galindo S, Blázquez F, Calonge M, Nieto-Miguel T. Advanced therapy medicinal products for the eye: definitions and regulatory framework. *Pharmaceutics*. 2021 Mar 6; 13(3):347. Available from: <http://doi.org/10.3390/pharmaceutics13030347>
230. Lozano Navarro LV, Chen X, Giratá Viviescas LT, Ardila-Roa AK, Luna-Gonzalez ML, Sossa CL, et al. Mesenchymal stem cells for critical limb ischemia: their function, mechanism, and therapeutic potential. *Stem Cell Res Ther*. 2022;13(1):345. Available from: <https://doi.org/10.1186/s13287-022-03043-3>
231. Lu H, Ma L, Zhang Y, Feng Y, Zhang J, Wang S. Current animal model systems for ovarian aging research. *Aging Dis*. 2022;13(4):1183-1195. Available from: <http://doi.org/10.14336/AD.2021.1209>
232. Luo Y, Ge R, Wu H, Ding X, Song H, Ji H, et al. The osteogenic differentiation of human adipose-derived stem cells is regulated through the let-7i-3p/LEF1/ β -catenin axis under cyclic strain. *Stem Cell Res Ther*. 2019; 10:339. Available from: <https://doi.org/10.1186/s13287-019-1470-z>
233. Lykhmus O, Kalashnyk O, Koval L, Voytenko L, Uspenska K, Kyryk V, et al. Mesenchymal stem cells or Interleukin-6 improve episodic memory of mice lacking $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptors. *Neuroscience*. 2019; 413:31-44. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2019.06.004>

234. Lykhmus O, Koval L, Voytenko L, Uspenska K, Komisarenko S, Deryabina O, et al. Intravenously injected mesenchymal stem cells penetrate the brain and treat inflammation-induced brain damage and memory impairment in mice. *Front Pharmacol.* 2019; 10:355. Available from: <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.00355>
235. Magenta A, Florio MC, Ruggeri M, Furgiuele S. Autologous cell therapy in diabetes-associated critical limb ischemia: From basic studies to clinical outcomes (Review). *Int J Mol Med.* 2021;48(3):173. Available from: <https://doi.org/10.3892/ijmm.2021.5006>
236. Malliaras K, Li TS, Luthringer D, Terrovitis J, Cheng K, Chakravarty T, et al. Safety and efficacy of allogeneic cell therapy in infarcted rats transplanted with mismatched cardiosphere-derived cells. *Circulation.* 2012;125(1):100-12. Available from: <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.111.042598>
237. Mann I, Rodrigo SF, van Ramshorst J, Beeres SL, Dibbets-Schneider P, de Roos A, et al. Repeated intramyocardial bone marrow cell injection in previously responding patients with refractory angina again improves myocardial perfusion, anginal complaints, and quality of life. *Circ Cardiovasc Interv.* 2015;8:e002740. Available from: <https://doi.org/10.1161/circinterventions.115.002740>
238. Martin U. Therapeutic Application of pluripotent stem cells: challenges and risks. *Front Med (Lausanne).* 2017;4:229. Available from: <https://doi.org/10.3389/fmed.2017.00229>
239. Mastrullo V, Cathery W, Velliou E, Madeddu P, Campagnolo P. Angiogenesis in tissue engineering: as nature intended? *Front. Bioeng. Biotechnol.* 2020; 8:188. Available from: <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00188>
240. Mathiasen AB, Jørgensen E, Qayyum AA, Haack-Sørensen M, Ekblond A, Kastrup J. Rationale and design of the first randomized, double-blind, placebo-controlled trial of intramyocardial injection of autologous bone-marrow derived Mesenchymal Stromal Cells in chronic ischemic Heart Failure (MSC-HF Trial). *Am Heart J.* 2012;164(3):285-91. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ahj.2012.05.026>
241. Mau T, Yung R. Adipose tissue inflammation in aging. *Exp Gerontol.* 2018; 105:27-31. Available from: <http://doi.org/10.1016/j.exger.2017.10.014>
242. Mazini L, Rochette L, Amine M, Malka G. Regenerative capacity of adipose derived stem cells (ADSCs), comparison with mesenchymal stem cells (MSCs). *Int J Mol Sci.* 2019; 20(10):1-30.

Available from: <https://doi.org/10.3390/ijms20102523>

243. McCall FC, Telukuntla KS, Karantalis V, Suncion VY, Heldman AW, Mushtaq M, et al. Myocardial infarction and intramyocardial injection models in swine. *Nat Protoc.* 2012; 7(8):1479-96. Available from: <http://doi.org/10.1038/nprot.2012.075>
244. McCarthy ME, Brown TA, Bukowska J, Bunnell BA, Frazier T, Wu X, et al. Therapeutic applications for adipose-derived stem cells in wound healing and tissue engineering. *Curr Stem Cell Rep.* 2018; 4:127-137. Available from: <https://doi.org/10.1007/s40778-018-0125-9>
245. Menasché P, Alfieri O, Janssens S, McKenna W, Reichenspumer H, Trinquart L, et al. The Myoblast Autologous Grafting in Ischemic Cardiomyopathy (MAGIC) trial: first randomized placebo-controlled study of myoblast transplantation. *Circulation.* 2008; 117(9):1189-200. Available from: <http://doi.org/10.1161/circulationaha.107.734103>
246. Mendicino M, Fan Y, Griffin D, Gunter KC, Nichols K. Current state of U.S. Food and Drug Administration regulation for cellular and gene therapy products: potential cures on the horizon. *Cytotherapy.* 2019; 21(7):699-724. Available from: <http://doi.org/10.1016/j.jcyt.2019.04.002>
247. Miyazaki Y, Oda T, Inagaki Y, Kushige H, Saito Y, Mori N, et al. Adipose-derived mesenchymal stem cells differentiate into heterogeneous cancer-associated fibroblasts in a stroma-rich xenograft model. *Sci Rep.* 2021;11(1):4690. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41598-021-84058-3>
248. Mo M, Zhou Y, Li S, Wu Y. Three-dimensional culture reduces cell size by increasing vesicle excretion. *Stem Cells.* 2018;36(2):286-292. Available from: <https://doi.org/10.1002/stem.2729>
249. Muñoz MF, Argüelles S, Marotta F, Barbagallo M, Cano M, Ayala A. Effect of age and lipoperoxidation in rat and human adipose tissue-derived stem cells. *Oxid Med Cell Longev.* 2020;2020:6473279. Available from: <https://doi.org/10.1155/2020/6473279>
250. Murphy KC, Hoch AI, Harvestine JN, Zhou D, Leach JK. Mesenchymal stem cell spheroids retain osteogenic phenotype through $\alpha 2\beta 1$ signaling. *Stem Cells Transl Med.* 2016; 5(9):1229-1237. Available from: <https://doi.org/10.5966/sctm.2015-0412>
251. Nakamura K, Murry CE. Function follows form - a review of cardiac cell therapy. *Circ J.* 2019 Nov 25;83(12):2399-2412. Available from: <https://doi.org/10.1253/circj.CJ-19-0567>
252. Negoro T, Takagaki Y, Okura H, Matsuyama A. Trends in clinical trials for articular cartilage repair by cell therapy. *NPJ Regen Med.* 2018;3:17. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41536-018-0055-2>

253. NetCord-FACT International standards for cord blood collection, banking, and release for administration. Accreditation manual. 7th ed. 2019. Available from: <https://www.factglobal.org/standards/cbb-standards>
254. Nguyen A, Guo J, Banyard DA, Fadavi D, Toranto JD, Wirth GA, et al. Stromal vascular fraction: A regenerative reality? Part 1: Current concepts and review of the literature. *J Plast Reconstr Aesthet Surg*. 2016;69(2):170-9. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.bjps.2015.10.015>
255. Niada S, Giannasi C, Ferreira LM, Milani A, Arrigoni E, Brini AT. 17 β -estradiol differently affects osteogenic differentiation of mesenchymal stem/stromal cells from adipose tissue and bone marrow. *Differentiation*. 2016 Dec;92(5):291-297. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.diff.2016.04.001>
256. Nicolas J, Magli S, Rabbachin L, Sampaolesi S, Nicotra F, Russo L. 3D extracellular matrix mimics: fundamental concepts and role of materials chemistry to influence stem cell fate. *Biomacromolecules*. 2020;21(6):1968-1994. Available from: <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.0c00045>
257. Nikulina V, Kuchma M, Bukreieva T, Zahanich I, Kyryk V, Lobintseva G, et al. Cryopreservation of placenta tissue allows isolating viable mesenchymal and hematopoietic stem cells. Abstracts of ISCT 2019 Annual Meeting, Melbourne (AU). 2019. *Cytherapy*. 2019; 21(5), S78–S79. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2019.03.485>
258. Noren Hooten N, Evans MK. Techniques to induce and quantify cellular senescence. *J Vis Exp*. 2017; 123:55533. Available from: <http://doi.org/10.3791/55533>
259. Nowacki M, Kloskowski T, Pietkun K, Zegarski M, Pokrywczyńska M, Habib SL, et al. The use of stem cells in aesthetic dermatology and plastic surgery procedures. A compact review of experimental and clinical applications. *Postepy Dermatol Alergol*. 2017;34(6):526-534. Available from: <https://doi.org/10.5114/ada.2017.72456>
260. Ntege EH, Sunami H, Shimizu Y. Advances in regenerative therapy: A review of the literature and future directions. *Regenerative Therapy*. 2020; 14:136-153. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.reth.2020.01.004>
261. Ohnishi H, Oda Y, Aoki T, Tadokoro M, Katsube Y, et al. A comparative study of induced pluripotent stem cells generated from frozen, stocked bone marrow- and adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. *J Tissue Eng Regen Med*. 2012;6(4):261-71. Available from:

<https://doi.org/10.1002/term.428>

262. Okura H, Saga A, Soeda M, Miyagawa S, Sawa Y, Daimon T, et al. Intracoronary artery transplantation of cardiomyoblast-like cells from human adipose tissue-derived multi-lineage progenitor cells improve left ventricular dysfunction and survival in a swine model of chronic myocardial infarction. *Biochem Biophys Res Commun*. 2012. 425(4):859-65. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2012.08.004>
263. Oliva-Olivera W, Coín-Aragüez L, Lhamyani S, Clemente-Postigo M, Torres JA, Bernal-López MR, et al. Adipogenic impairment of adipose tissue-derived mesenchymal stem cells in subjects with metabolic syndrome: possible protective role of FGF2. *J Clin Endocrinol Metab*. 2017;102(2):478-487. Available from: <https://doi.org/10.1210/jc.2016-2256>
264. Oliveira HL, Da Rosa WLO, Cuevas-Suárez CE, Carreño NLV, da Silva AF, Guim TN, et al. Histological evaluation of bone repair with hydroxyapatite: a systematic review. *Calcif Tissue Int*. 2017;101(4):341-354. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00223-017-0294-z>
265. Oliveira MS, Barreto-Filho JB. Placental-derived stem cells: Culture, differentiation and challenges. *World J Stem Cells*. 2015;7(4):769-75. Available from: <https://doi.org/10.4252/wjsc.v7.i4.769>
266. Ooi YY, Ramasamy R, Vidyadaran S. Mouse bone marrow mesenchymal stem cells acquire CD45⁺CD106⁺ immunophenotype only at later passages. *Med J Malaysia*. 2008;63 Suppl A:65-6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19024986>
267. Oskouei BN, Lamirault G, Joseph C, Treuer AV, Landa S, Da Silva J, et al. Increased potency of cardiac stem cells compared with bone marrow mesenchymal stem cells in cardiac repair. *Stem Cells Transl Med*. 2012;1(2):116-24. Available from: <https://doi.org/10.5966/sctm.2011-0015>
268. Ou MY, Zhang H, Tan PC, Zhou SB, Li QF. Adipose tissue aging: mechanisms and therapeutic implications. *Cell Death Dis*. 2022;13(4):300. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41419-022-04752-6>
269. Pachon-Pena G, Yu G, Tucker A, Wu X, Vendrell J, Bunnell BA, et al. Stromal stem cells from adipose tissue and bone marrow of age-matched female donors display distinct immunophenotypic profiles. *J Cell Physiol*. 2010; 226:843-851. Available from: <https://doi.org/10.1002/jcp.22408>
270. Paez-Ribes M, González-Gualda E, Doherty GJ, Muñoz-Espín D. Targeting senescent cells in translational medicine. *EMBO Mol Med*. 2019; 11(12):e10234. Available from:

<http://doi.org/10.15252/emmm.201810234>

271. Park A, Hogan MV, Kesturu GS, James R, Balian G, Chhabra AB. Adipose-derived mesenchymal stem cells treated with growth differentiation factor-5 express tendon-specific markers. *Tissue Eng Part A*. 2010;16(9):2941-51. Available from: <https://doi.org/10.1089/ten.tea.2009.0710>
272. Park HS, Kim SY. Endothelial cell senescence: A machine learning-based meta-analysis of transcriptomic studies. *Ageing Res Rev*. 2020; 65:101213. Available from: <http://doi.org/10.1016/j.arr.2020.101213>
273. Park JJ, Kwon YW, Kim JW, Park GT, Yoon JW, Kim YS, et al. Coadministration of endothelial and smooth muscle cells derived from human induced pluripotent stem cells as a therapy for critical limb ischemia. *Stem Cells Transl Med*. 2021;10(3):414-426. Available from: <https://doi.org/10.1002/sctm.20-0132>
274. Parker A, Shang H, Khurgel M, Katz A. Low serum and serum-free culture of multipotential human adipose stem cells. *Cytherapy*. 2007;9(7):637-46. Available from: <https://doi.org/10.1080/14653240701508452>
275. Parra-Peralbo E, Talamillo A, Barrio R. Origin and development of the adipose tissue, a key organ in physiology and disease. *Front Cell Dev Biol*. 2021;9:786129. Available from: <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.786129>
276. Passipieri JA, Kasai-Brunswick TH, Suhett G, Martins AB, Brasil GV, Campos DB, et al. Improvement of cardiac function by placenta-derived mesenchymal stem cells does not require permanent engraftment and is independent of the insulin signaling pathway. *Stem Cell Res Ther*. 2014 Aug 21;5(4):102. Available from: <https://doi.org/10.1186/scri490>
277. Payr S, Schuseil T, Unger M, Seeliger C, Tiefenboeck T, Balmayor ER, et al. Effect of donor age and 3D-cultivation on osteogenic differentiation capacity of adipose-derived mesenchymal stem cells. *Sci Rep*. 2020; 10:10408. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-67254-5>
278. Perin EC, Sanz-Ruiz R, Sánchez PL, Lasso J, Pérez-Cano R, Alonso-Farto JC, et al. Adipose-derived regenerative cells in patients with ischemic cardiomyopathy: The PRECISE Trial. *Am Heart J*. 2014;168(1):88-95.e2. Available from: <http://doi.org/10.1016/j.ahj.2014.03.022>
279. Pleumeekers MM, Nimeskem L, Koevoet JLM, Karperien M, Stok KS, van Osch GJVM. Trophic effects of adipose-tissue-derived and bone-marrow-derived mesenchymal stem cells

- enhance cartilage generation by chondrocytes in co-culture. *PLoS One*. 2018;13(2):e0190744. Available from: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0190744>
280. Poliwoda S, Noor N, Downs E, Schaaf A, Cantwell A, Ganti L, et al. Stem cells: a comprehensive review of origins and emerging clinical roles in medical practice. *Orthop Rev (Pavia)*. 2022;14(3):37498. Available from: <https://doi.org/10.52965/001c.37498>
281. Polyachenko YB, Nikonenko OS, Salyutin RV, Komarov MP, Palyanitsya SS, Boris RM. Cell transplantation: regulatory aspects, prospects and trends in the clinical use. *Cell Organ Transpl*. 2013; 1(1):44-46. Available from: <https://doi.org/10.22494/cot.v1i1.50>
282. Prockop D, Bunnell B, Phinney D. *Mesenchymal stem cells: methods and protocols*. Humana Press; 2008. Available from: <https://doi.org/10.1007/978-1-60327-169-1>
283. Qadura M, Terenzi DC, Verma S, Al-Omran M, Hess DA. Concise review: cell therapy for critical limb ischemia: an integrated review of preclinical and clinical studies. *Stem Cells*. 2018;36(2):161-171. Available from: <https://doi.org/10.1002/stem.2751>
284. Ramezankhani R, Torabi S, Minaei N, Madani H, Rezaei S, Hassani SN, et al. Two decades of global progress in authorized advanced therapy medicinal products: an emerging revolution in therapeutic strategies. *Front Cell Dev Biol*. 2020; 8:547653. Available from: <http://doi.org/10.3389/fcell.2020.547653>
285. Regenerative medicine market size, share & trends analysis report by product (cell-based immunotherapies, gene therapies), by therapeutic category, by region, and segment forecasts, 2023-2030. Available from: <https://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/regenerative-medicine-market>
286. Reich H, Tseliou E, de Couto G, Angert D, Valle J, Kubota Y, et al. Repeated transplantation of allogeneic cardiosphere-derived cells boosts therapeutic benefits without immune sensitization in a rat model of myocardial infarction. *J Heart Lung Transplant*. 2016;35(11):1348-1357. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.healun.2016.05.008>
287. Richardson JD, Psaltis PJ, Frost L, Paton S, Carbone A, Bertaso AG, et al. Incremental benefits of repeated mesenchymal stromal cell administration compared with solitary intervention after myocardial infarction. *Cytotherapy*. 2014;16(4):460-70. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2013.07.016>
288. Rigato M, Monami M, Fadini GP. Autologous cell therapy for peripheral arterial disease:

systematic review and meta-analysis of randomized, nonrandomized, and noncontrolled studies. *Circ Res.* 2017;120(8):1326-1340. Available from: <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.116.309045>

289. Riordan NH, Ichim TE, Min WP, Wang H, Solano F, Lara F, et al. Non-expanded adipose stromal vascular fraction cell therapy for multiple sclerosis. *J Transl Med.* 2009;7:29. Available from: <https://doi.org/10.1186/1479-5876-7-29>
290. Robert AW, Marcon BH, Dallagiovanna B, Shigunov P. Adipogenesis, osteogenesis, and chondrogenesis of human mesenchymal stem/stromal cells: a comparative transcriptome approach. *Front Cell Dev Biol.* 2020; 8:561. Available from: <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.00561>
291. Rocca WA, Gazzuola-Rocca L, Smith CY, Grossardt BR, Faubion SS, Shuster LT, et al. Accelerated accumulation of multimorbidity after bilateral oophorectomy: a population-based cohort study. *Mayo Clin Proc.* 2016; 91(11):1577-1589. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.mayocp.2016.08.002>
292. Rodríguez TM, Saldías A, Irigo M, Zamora JV, Perone MJ, Dewey RA. Effect of TGF- β 1 stimulation on the secretome of human adipose-derived mesenchymal stromal cells. *Stem Cells Transl Med.* 2015; 4(8):894-898. Available from: <https://doi.org/10.5966/sctm.2015-0012>
293. Roura S, Pujal JM, Gálvez-Montón C, Bayes-Genis A. The role and potential of umbilical cord blood in an era of new therapies: a review. *Stem Cell Res Ther.* 2015; 6(1):123. Available from: <https://doi.org/10.1186/s13287-015-0113-2>
294. Rubtsov V, Govbach I, Ustymenko A, Kyryk V, Tsupykov O. The effects of adipose-derived multipotent mesenchymal stromal cells transplantation on locomotor activity and function of the sciatic nerve in mice with peripheral neuropathy. *Cell Organ Transpl.* 2020; 8(2): 159-165. Available from: <https://doi.org/10.22494/cot.v8i2.111>
295. Ruiz-Ojeda FJ, Rupérez AI, Gomez-Llorente C, Gil A, Aguilera CM. Cell models and their application for studying adipogenic differentiation in relation to obesity: a review. *Int J Mol Sci.* 2016;17(7):1040. Available from: <https://doi.org/10.3390/ijms17071040>
296. Russo V, Yu C, Belliveau P, Hamilton A, Flynn LE. Comparison of human adipose-derived stem cells isolated from subcutaneous, omental, and intrathoracic adipose tissue depots for regenerative applications. *Stem Cells Transl Med.* 2014;3(2):206-17. Available from:

<https://doi.org/10.5966/sctm.2013-0125>

297. Sabapathy V, Ravi S, Srivastava V, Srivastava A, Kumar S. Long-term cultured human term placenta-derived mesenchymal stem cells of maternal origin displays plasticity. *Stem Cells Int.* 2012;2012:174328. Available from: <https://doi.org/10.1155/2012/174328>
298. Sacchetti M, Rama P, Bruscolini A, Lambiase A. Limbal stem cell transplantation: clinical results, limits, and perspectives. *Stem Cells Int.* 2018; 2018:8086269. Available from: <https://doi.org/10.1155/2018/8086269>
299. Safitri FI, Nawangsari D, Febrina D. Overview: application of Carbopol 940 in gel. *Proceedings of the International Conference on Health and Medical Sciences.* 2020;34:80-84. Available from: <https://doi.org/10.2991/ahsr.k.210127.018>
300. Sakai Y, Fukunishi S, Takamura M, Kawaguchi K, Inoue O, Usui S, et al. Clinical trial of autologous adipose tissue-derived regenerative (stem) cells therapy for exploration of its safety and efficacy. *Regen Ther.* 2021;18:97-101. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.reth.2021.04.003>
301. Salybekov AA, Kobayashi S, Asahara T. Characterization of endothelial progenitor cell: past, present, and future. *Int J Mol Sci.* 2022;23(14):7697. Available from: <https://doi.org/10.3390/ijms23147697>
302. Sarker B, Rompf J, Silva R, Lang N, Detsch R, Kaschta J, et al. Alginate-based hydrogels with improved adhesive properties for cell encapsulation. *Int J Biol Macromol.* 2015;78:72-8. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.03.061>
303. Schafer MJ, Zhang X, Kumar A, Atkinson EJ, Zhu Y, Jachim S, et al. The senescence-associated secretome as an indicator of age and medical risk. *JCI Insight.* 2020; 5(12):e133668. Available from: <http://doi.org/10.1172/jci.insight.133668>
304. Schmehl J, Stoll H, Danalache M, Grözinger GC, Greiner TO, Leibfritz RF, Martirosian P, Nikolaou K, Elser S. Intravascular application of labelled cell spheroids: an approach for ischemic peripheral artery disease. *Int J Mol Sci.* 2021;22(13):6831. Available from: <https://doi.org/10.3390/ijms22136831>
305. Barzelay A, Levy R, Kohn E, Sella M, Shani N, Meilik B, et al. Power-assisted liposuction versus tissue resection for the isolation of adipose tissue-derived mesenchymal stem cells: phenotype, senescence, and multipotency at advanced passages. *Aesthet Surg J.* 2015;35(7):230-40. Available from: <https://doi.org/10.1093/asj/sjv055>

306. Smith RR, Barile L, Cho HC, Leppo MK, Hare JM, Messina E, et al. Regenerative potential of cardiosphere-derived cells expanded from percutaneous endomyocardial biopsy specimens. *Circulation*. 2007; 115(7):896-908. Available from: <https://doi.org/10.1161/circulationaha.106.655209>
307. Shablii V, Kuchma M, Kyryk V, Onishchenko A, Lukash L, Lobintseva G. Characteristics of hematopoietic and mesenchymal stem cells isolated from cryopreserved human placental tissue. ISSCR 10th Annual Meeting, Poster Session Abstracts. Vol. 2. Yokohama (JP). 2012:95.
308. Shablii V, Kuchma M, Kyryk V, Onishchenko G, Tsupyykov O, Klymenko P, et al. Mesenchymal stromal cells from native and cryopreserved human placenta: phenotype, multipotency and in vivo migration potential. *Problems of Cryobiology and Cryomedicine*. 2012; 22(2):157-160. Available from: <http://cryo.org.ua/journal/index.php/probl-cryobiol-cryomed/article/view/79>
309. Shablii V, Kuchma M, Kyryk V, Svitina H, Shablii Yu, Skrypkinia I, et al. Multipotent trophoblast cells derived from native and cryopreserved human placental tissue. 3rd IPLASS Meeting, Granada (ES). 2014:7.
310. Shablii V, Kuchma M, Svitina H, Skrypkinia I, Areshkov P, Kyryk V, et al. High proliferative placenta-derived multipotent cells express cytokeratin 7 at low level. *BioMed Res Int*. 2019; 2019:2098749. Available from: <https://doi.org/10.1155/2019/2098749>
311. Shablii V, Svitina H, Kuchma M, Kyryk V, I Skrypkinia, Areshkov P. Placental derived multipotent cells possess trophoblast specific features. Poster abstract book ISSCR 13th Annual Meeting, Stockholm (SE). 2015:413.
312. Shablii VA, Kuchma MD, Kyryk VM, Svitina HM, Shablii YuM, Lukash LL, et al. Mesenchymal and trophoblast immunophenotype of multipotent stromal cells from human placenta. *Biopolymers and Cell*. 2014; 30(2):118-121. Available from: <http://doi.org/10.7124/bc.000889>
313. Sharpe EJ, St Clair JR, Proenza C. Methods for the isolation, culture, and functional characterization of sinoatrial node myocytes from adult mice. *J Vis Exp*. 2016; 116:54555. Available from: <https://doi.org/10.3791/54555>
314. Shaun S Tan, Zhi Yang Ng, Weiqing Zhan. Role of adipose-derived stem cells in fat grafting and reconstructive surgery. *J Cutan Aesthet Surg*. 2016; 9(3): 152-156. Available from: <https://doi.org/10.4103/0974-2077.191672>

315. Sheng CC, Zhou L, Hao J. Current stem cell delivery methods for myocardial repair. *Biomed Res Int.* 2013;2013:547902. Available from: <https://doi.org/10.1155/2013/547902>
316. Shi C, Huang F, Gu X, Zhang M, Wen J, Wang X, et al. Adipogenic miRNA and meta-signature miRNAs involved in human adipocyte differentiation and obesity. *Oncotarget.* 2016;7(26):40830-40845. Available from: <https://doi.org/10.18632/oncotarget.8518>
317. Shin S, El-Sabbagh AS, Lukas BE, Tanneberger SJ, Jiang Y. Adipose stem cells in obesity: challenges and opportunities. *Biosci Rep.* 2020;40(6):BSR20194076. Available from: <https://doi.org/10.1042/BSR20194076>
318. Shirjang S, Mansoori B, Solali S, Hagh MF, Shamsasenjan K. Toll-like receptors as a key regulator of mesenchymal stem cell function: An up-to-date review. *Cell Immunol.* 2017;315:1-10. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2016.12.005>
319. Shu J, Santulli G. Update on peripheral artery disease: Epidemiology and evidence-based facts. *Atherosclerosis.* 2018; 275:379-381. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2018.05.033>
320. Shudo Y, Miyagawa S, Ohkura H, Fukushima S, Saito A, Kawaguchi N, et al. Adipose tissue-derived multi-lineage progenitor cells improve left ventricular dysfunction in porcine ischemic cardiomyopathy model. *J Heart Lung Transplant.* 2017; 36(2):237-239. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.healun.2016.11.012>
321. Si Z, Wang X, Sun C, Kang Y, Xu J, Wang X, et al. Adipose-derived stem cells: Sources, potency, and implications for regenerative therapies. *Biomed Pharmacother.* 2019; 114: 108765. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2019.108765>
322. Siennicka K, Piotrowski P, Olszewski W, Gajewska M, Mazur S, Pojda Z. In vivo supportive effects of mesenchymal stem cells on fat graft stabilization and local induction of angiogenesis are not dependent on the cell donor age or in vitro cell culture duration. *Rejuvenation Res.* 2021; 24(6):441-448. Available from: <http://doi.org/10.1089/rej.2021.0042>
323. Simioniu A, Campan M, Lionetti V, Marinelli M, Aquaro GD, Cavallini C, et al. Placental stem cells pre-treated with a hyaluronan mixed ester of butyric and retinoic acid to cure infarcted pig hearts: a multimodal study. *Cardiovasc Res.* 2011;90(3):546-56. Available from: <https://doi.org/10.1093/cvr/cvr018>
324. Singh M, Kakkar A, Sharma R, Kharbanda OP, Monga N, Kumar M, et al. Synergistic effect of

BDNF and FGF2 in efficient generation of functional dopaminergic neurons from human mesenchymal stem cells. *Sci Rep.* 2017;7(1):10378. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41598-017-11028-z>

325. Song K, Cai H, Zhang D, Huang R, Sun D, He Y. Effects of human adipose-derived mesenchymal stem cells combined with estrogen on regulatory T cells in patients with premature ovarian insufficiency. *Int Immunopharmacol.* 2018;55:257-262. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2017.12.026>
326. Souza VR, Mendes E, Casaro M, Antiorio ATFB, Oliveira FA, Ferreira CM. Description of ovariectomy protocol in mice. *Methods Mol Biol.* 2019;1916:303-309. Available from: https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8994-2_29
327. Spaeth EL, Labaff AM, Toole BP, Klopp A, Andreeff M, Marini FC. Mesenchymal CD44 expression contributes to the acquisition of an activated fibroblast phenotype via TWIST activation in the tumor microenvironment. *Cancer Res.* 2013;73(17):5347-59. Available from: <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-13-0087>
328. Squillaro T, Peluso G, Galderisi U. Clinical trials with mesenchymal stem cells: an update. *Cell Transplant.* 2016;25(5):829-48. Available from: <https://doi.org/10.3727/096368915X689622>
329. Stoltz JF, de Isla N, Li YP, Bensoussan D, Zhang L, Huselstein C, et al. Stem cells and regenerative medicine: myth or reality of the 21st century. *Stem Cells Int.* 2015; 2015:734731. Available from: <https://doi.org/10.1155/2015/734731>
330. Storti G, Scioli MG, Kim BS, Orlandi A, Cervelli V. Adipose-derived stem cells in bone tissue engineering: useful tools with new applications. *Stem Cells Int.* 2019; 2019:3673857. Available from: <https://doi.org/10.1155/2019/3673857>
331. Stowers RS. Advances in extracellular matrix-mimetic hydrogels to guide stem cell fate. *Cells Tissues Organs.* 2022;211(6):703-720. Available from: <https://doi.org/10.1159/000514851>
332. Stromps JP, Paul NE, Rath B, Nourbakhsh M, Bernhagen J, Pallua N. Chondrogenic differentiation of human adipose-derived stem cells: a new path in articular cartilage defect management? *Biomed Res Int.* 2014;2014:740926. Available from: <https://doi.org/10.1155/2014/740926>
333. Su Y, Denbeigh JM, Camilleri ET, Riestler SM, Parry JA, Wagner ER, et al. Extracellular matrix protein production in human adipose-derived mesenchymal stem cells on three-dimensional

- polycaprolactone (PCL) scaffolds responds to GDF5 or FGF2. *Gene Rep.* 2018; 10:149-156. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.genrep.2017.12.004>
334. Suga H, Matsumoto D, Eto H, Inoue K, Aoi N, Kato H, et al. Functional implications of CD34 expression in human adipose-derived stem/progenitor cells. *Stem Cells Dev.* 2009. 18, 8:1201-10. Available from: <http://doi.org/10.1089/scd.2009.0003>
335. Lowes LE, Hedley BD, Sutherland DR, Keeney M. Evaluation of Versalyse as an alternative red blood cell lysing agent in the evaluation of CD34 stem and progenitor cells with the ISHAGE guidelines. *Cytometry B Clin Cytom.* 2021;100(4):402-405. Available from: <http://doi.org/10.1002/cyto.b.21960>
336. Svistushkin MV, Kotova S, Shpichka A, Starostina S, Shekhter A, Bikmulina P, et al. Stem cell therapy for vocal fold regeneration after scarring: a review of experimental approaches. *Stem Cell Res Ther.* 2022;13(1):176. Available from: <http://doi.org/10.1186/s13287-022-02853-9>
337. Svitina H, Kyryk V, Skrypckina I, Kuchma M, Bukreieva T, Areshkov P, et al. Placenta-derived multipotent cells have no effect on the size and number of DMH-induced colon tumors in rats. *Exp Ther Med.* 2017; 14(3):2135-2147. Available from: <https://doi.org/10.3892/etm.2017.4792>
338. Tang HH, Han XL, Debels H, Tan B, Palmer J, Poon C, et al. Fate of free fat grafts with or without adipogenic adjuncts to enhance graft outcomes. *Plast Reconstr Surg.* 2018; 142(4):939-950. Available from: <http://doi.org/10.1097/PRS.0000000000004739>
339. Tang X, Daneshmandi L, Awale G, Nair LS, Laurencin CT. Skeletal muscle regenerative engineering. *Regen Eng Transl Med.* 2019;5(3):233-251. Available from: <https://doi.org/10.1007/s40883-019-00102-9>
340. Tarui S, Ishigami S, Ousaka D, Kasahara S, Ohtsuki S, Sano S, et al. Transcoronary infusion of cardiac progenitor cells in hypoplastic left heart syndrome: Three-year follow-up of the transcoronary infusion of cardiac progenitor cells in patients with single-ventricle physiology (TICAP) trial. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2015;150(5):1198-1207, 1208.e1-2. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jtcvs.2015.06.076>
341. Terajima Y, Shimizu T, Tsuruyama S, Sekine H, Ishii H, Yamazaki K, et al. Autologous skeletal myoblast sheet therapy for porcine myocardial infarction without increasing risk of arrhythmia. *Cell Med.* 2013; 6(3):99-109. Available from: <http://doi.org/10.3727/215517913X672254>
342. Tokita Y, Tang XL, Li Q, Wysoczynski M, Hong KU, Nakamura S, et al. Repeated

administrations of cardiac progenitor cells are markedly more effective than a single administration: a new paradigm in cell therapy. *Circ Res.* 2016;119(5):635-51. Available from: <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.116.308937>

343. Wen C, Xu L, Xu X, Wang D, Liang Y, Duan L. Insulin-like growth factor-1 in articular cartilage repair for osteoarthritis treatment. *Arthritis Res Ther.* 2021;23(1):277. Available from: <https://doi.org/10.1186/s13075-021-02662-0>
344. Tong Z, Solanki A, Hamilos A. Application of biomaterials to advance induced pluripotent stem cell research and therapy. *EMBO J.* 2015. 34(8):987-1008. Available from: <http://doi.org/10.15252/emj.201490756>
345. Toyserkani NM, Jørgensen MG, Tabatabaeifar S. Concise review: A safety assessment of adipose-derived cell therapy in clinical trials: a systematic review of reported adverse events. *Stem Cells Transl Med.* 2017;6(9):1786-1794. Available from: <https://doi.org/10.1002/sctm.17-0031>
346. Trevor LV, Riches-Suman K, Mahajan AL, Thornton MJ. Adipose tissue: a source of stem cells with potential for regenerative therapies for wound healing. *J Clin Med.* 2020;9(7):2161. Available from: <https://doi.org/10.3390/jcm9072161>
347. Trim W, Turner JE, Thompson D. Parallels in immunometabolic adipose tissue dysfunction with ageing and obesity. *Front Immunol.* 2018; 9:169. Available from: <http://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00169>
348. Trounson A, McDonald C. Stem cell therapies in clinical trials: progress and challenges. *Cell Stem Cell.* 2015; 17(1):11-22. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.stem.2015.06.007>
349. Truong NC, Bui KH, Van Pham P. Characterization of senescence of human adipose-derived stem cells after long-term expansion. *Adv Exp Med Biol.* 2019;1084:109-128. Available from: http://doi.org/10.1007/5584_2018_235
350. Tsekouras A, Mantas D, Tsilimigras D. Adipose-derived stem cells for breast reconstruction after breast surgery – preliminary results. *Case Reports Plast Surg Hand Surg.* 2017; 4(1): 35-41. Available from: <https://doi.org/10.1080/23320885.2017.1316201>
351. Tsou YH, Khoneisser J, Huang PC, Xu X. Hydrogel as a bioactive material to regulate stem cell fate. *Bioact Mater.* 2016. 1(1):39-55. Available from: <http://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2016.05.001>
352. Tsupykov O, Kyryk V, Ustymenko A, Yatsenko K, Butenko G, Skybo G. Effect of transplantation

of adipose-derived multipotent mesenchymal stromal cells on the nervous tissue and behavioral responses in a mouse model of periventricular leukomalacia. *Cell Organ Transpl.* 2015; 3(1):68-73. Available from: <https://doi.org/10.22494/COT.v3i1.22>

353. Tsupykov O, Lushnikova I, Ustymenko A, Kyryk V, Nikandrova Y, Patseva M, et al. Protective effects of adipose-derived multipotent mesenchymal stromal cells of mice on periventricular leukomalacia model in vitro. *Cell Organ Transpl.* 2017; 5(1):28-32. <https://doi.org/10.22494/cot.v5i1.66>
354. Tsupykov O, Ustymenko A, Kyryk V, Smozhanik E, Yatsenko K, Butenko G, Skibo G. Ultrastructural study of mouse adipose-derived stromal cells induced towards osteogenic direction. *Microsc Res Tech.* 2016; 79 (6), 557-564. Available from: <https://doi.org/10.1002/jemt.22670>
355. Tümpel S, Rudolph KL. The role of telomere shortening in somatic stem cells and tissue aging: lessons from telomerase model systems. *Ann NY Acad Sci.* 2012; 1266:28-39. Available from: <http://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2012.06547.x>
356. Tura O, Skinner EM, Barclay GR, Samuel K, Gallagher RC, Brittan M, et al. Late outgrowth endothelial cells resemble mature endothelial cells and are not derived from bone marrow. *Stem Cells.* 2013; 31:338-348. Available from: <https://doi.org/10.1002/stem.1280>
357. Ustymenko A, Kyryk V, Butenko G. Morphofunctional characteristics of adipose-derived multipotent mesenchymal stromal cells from CBA/Ca mice of different ages in cell culture in vitro. *Cell Organ Transpl.* 2022; 10(1):46-51. Available from: <https://doi.org/10.22494/cot.v10i1.137>
358. Ustymenko A, Kyryk V, Lutsenko T, Tsupykov O, Butenko G. Morphofunctional properties of adipose-derived multipotent mesenchymal stromal cells in vitro in ovariectomized mice of different ages. *Cell Organ Transpl.* 2019; 7(2):158-167. Available from: <https://doi.org/10.22494/cot.v7i2.102>
359. Ventura Ferreira MS, Bienert M, Müller K, Rath B, Goecke T, Opländer C, et al. Comprehensive characterization of chorionic villi-derived mesenchymal stromal cells from human placenta. *Stem Cell Res Ther.* 2018;9(1):28. Available from: <https://doi.org/10.1186/s13287-017-0757-1>
360. Wahid FSA, Ismail NA, Wan Jamaludin WF, Muhamad NA, Mohamad Idris MA, Lai NM. Efficacy and safety of autologous cell-based therapy in patients with no-option critical limb ischaemia: a meta-analysis. *Curr Stem Cell Res Ther.* 2018;13(4):265-283. Available from: <https://doi.org/10.2174/1574888X13666180313141416>

361. Walters B, Turner PA, Rolaufts B, Hart ML, Stegemann JP. Controlled growth factor delivery and cyclic stretch induces a smooth muscle cell-like phenotype in adipose-derived stem cells. *Cells*. 2021;10(11):3123. Available from: <https://doi.org/10.3390/cells10113123>
362. Wang F, Zachar V, Pennisi CP, Fink T, Maeda Y, Emmersen J. Hypoxia enhances differentiation of adipose tissue-derived stem cells toward the smooth muscle phenotype. *Int J Mol Sci*. 2018;19(2):517. Available from: <https://doi.org/10.3390/ijms19020517>
363. Wang HC, Lin TH, Hsu CC, Yeh ML. Restoring osteochondral defects through the differentiation potential of cartilage stem/progenitor cells cultivated on porous scaffolds. *Cells*. 2021;10(12):3536. Available from: <http://doi.org/10.3390/cells10123536>
364. Wang JM, Chen AF, Zhang K. Isolation and primary culture of mouse aortic endothelial cells. *J Vis Exp*. 2016;(118):52965. Available from: <https://doi.org/10.3791/52965>
365. Wang L, Deng J, Tian W, Xiang B, Yang T, Li G, et al. Adipose-derived stem cells are an effective cell candidate for treatment of heart failure: an MR imaging study of rat hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2009; 297(3):H1020-31. Available from: <http://doi.org/10.1152/ajpheart.01082.2008>
366. Wang L, Huang C, Li Q, Xu X, Liu L, Huang K, et al. Osteogenic differentiation potential of adipose-derived stem cells from ovariectomized mice. *Cell Prolif*. 2017;50(2):e12328. Available from: <https://doi.org/10.1111/cpr.12328>
367. Wang M, Pei H, Zhang L, Guan L, Zhang R, Jia Y, et al. Hepatogenesis of adipose-derived stem cells on poly-lactide-co-glycolide scaffolds: in vitro and in vivo studies. *Tissue Eng Part C Methods*. 2010;16(5):1041-50. Available from: <https://doi.org/10.1089/ten.TEC.2009.0244>
368. Wang Y, Ji X, Leak RK, Chen F, Cao G. Stem cell therapies in age-related neurodegenerative diseases and stroke. *Ageing Res Rev*. 2017;34:39-50. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.arr.2016.11.002>
369. Wankhade UD, Shen M, Kolhe R, Fulzele S. Advances in adipose-derived stem cells isolation, characterization, and application in regenerative tissue engineering. *Stem Cells Int*. 2016;2016:3206807. Available from: <https://doi.org/10.1155/2016/3206807>
370. Williams AR, Hatzistergos KE, Addicott B, McCall F, Carvalho D, Suncion V, et al. Enhanced effect of combining human cardiac stem cells and bone marrow mesenchymal stem cells to reduce infarct size and to restore cardiac function after myocardial infarction. *Circulation*. 2013;127(2):213-23. Available from: <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.112.131110>

371. Windmolders S, Willems L, Daniëls A, Linsen L, Fanton Y, Hendrikx M, et al. Clinical-scale in vitro expansion preserves biological characteristics of cardiac atrial appendage stem cells. *Cell Prolif.* 2015; 48(2):175-86. Available from: <https://doi.org/10.1111/cpr.12166>
372. Wouters K, Deleye Y, Hannou SA, Vanhoutte J, Maréchal X, Coisne A, et al. The tumour suppressor CDKN2A/p16INK4a regulates adipogenesis and bone marrow-dependent development of perivascular adipose tissue. *Diab Vasc Dis Res.* 2017; 14(6):516-524. Available from: <http://doi.org/10.1177/1479164117728012>
373. Wu M, Zhang R, Zou Q, Chen Y, Zhou M, Li X, et al. Comparison of the biological characteristics of mesenchymal stem cells derived from the human placenta and umbilical cord. *Sci Rep.* 2018 Mar 22;8(1):5014. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41598-018-23396-1>
374. Wu S, Duan B, Qin X, Butcher JT. Living nano-micro fibrous woven fabric/hydrogel composite scaffolds for heart valve engineering. *Acta Biomater.* 2017. 51:89-100. Available from: <http://doi.org/10.1016/j.actbio.2017.01.051>
375. Xiao F, Wang C, Wang C, Gao Y, Zhang X, Chen X. BMPER enhances bone formation by promoting the osteogenesis-angiogenesis coupling process in mesenchymal stem cells. *Cell Physiol Biochem.* 2018; 45(5):1927-1939. Available from: <https://doi.org/10.1159/000487969>
376. Xing Q, Qian Z, Tahtinen M, Yap AH, Yates K, Zhao F. Aligned nanofibrous cell-derived extracellular matrix for anisotropic vascular graft construction. *Adv Healthc Mater.* 2017;6(10). Available from: <http://doi.org/10.1002/adhm.201601333>
377. Xu L, Wang Y, Wang J, Zhai J, Ren L, Zhu G. Radiation-induced osteocyte senescence alters bone marrow mesenchymal stem cell differentiation potential via paracrine signaling. *Int J Mol Sci.* 2021; 22(17):9323. Available from: <http://doi.org/10.3390/ijms22179323>
378. Yacoub MH, Terrovitis J. CADUCEUS, SCIPIO, ALCADIA: Cell therapy trials using cardiac-derived cells for patients with post myocardial infarction LV dysfunction, still evolving. *Glob Cardiol Sci Pract.* 2013;2013(1):5-8. Available from: <https://doi.org/10.5339/gcsp.2013.3>
379. Yadav SK, Mishra PK. Isolation, characterization, and differentiation of cardiac stem cells from the adult mouse heart. *J Vis Exp.* 2019; 143:10.3791/58448. Available from: <https://doi.org/10.3791/58448>
380. Yamaguchi Y, Ohno J, Sato A, Kido H, Fukushima T. Mesenchymal stem cell spheroids exhibit enhanced in-vitro and in-vivo osteoregenerative potential. *BMC Biotechnol.* 2014; 14:105.

Available from: <https://doi.org/10.1186/s12896-014-0105-9>

381. Yamaguchi S, Shimizu Y, Murohara T, Shibata R. Adipose-derived regenerative cells as a promising therapy for cardiovascular diseases: an overview. *Nagoya J Med Sci.* 2022 May;84(2):208-215. Available from: <https://doi.org/10.18999/nagjms.84.2.208>
382. Yamanaka S. Strategies and new developments in the generation of patient-specific pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell.* 2007;1(1):39-49. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.stem.2007.05.012>
383. Yan B, Lv S, Tong P, Yan L, Chen Z, Zhou L, Yuan Q, Guo L, Shan L. Intra-articular injection of adipose-derived stem cells ameliorates pain and cartilage anabolism/catabolism in osteoarthritis: preclinical and clinical evidences. *Front Pharmacol.* 2022;13:854025. Available from: <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.854025>
384. Yaneselli KM, Kuhl CP, Terraciano PB, de Oliveira FS, Pizzato SB, Pazza K, et al. Comparison of the characteristics of canine adipose tissue-derived mesenchymal stem cells extracted from different sites and at different passage numbers. *J Vet Sci.* 2018;19(1):13-20. Available from: <https://doi.org/10.4142/jvs.2018.19.1.13>
385. Yang CJ, Yang J, Yang J, Fan ZX. Cardiac atrial appendage stem cells therapy: a novel and promising approach for myocardial reparation after MI. *Int J Cardiol.* 2016; 203:1153-4. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2015.10.039>
386. Yang S, Guo S, Tong S, Sun X. Promoting osteogenic differentiation of human adipose-derived stem cells by altering the expression of exosomal miRNA. *Stem Cells Int.* 2019; 2019:1351860. Available from: <https://doi.org/10.1155/2019/1351860>
387. Yang X, Li X. Nucleus pulposus tissue engineering: a brief review. *Eur Spine J.* 2009;18(11):1564-72. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00586-009-1092-8>
388. Yasmeeen R, Pham Q, Fukagawa NK, Wang TTY. Individual variabilities in adipose stem cell proliferation, gene expression and responses to lipopolysaccharide stimulation. *Int J Mol Sci.* 2022;23(20):12534. Available from: <https://doi.org/10.3390/ijms232012534>.
389. Yatsenko K, Lushnikova I, Ustymenko A, Patseva M, Govbakh I, Kyryk V, Tsupykov O. Adipose-derived stem cells reduce lipopolysaccharide-induced myelin degradation and neuroinflammatory responses of glial cells in mice. *J Pers Med.* 2020; 10(3): 66. Available from: <https://doi.org/10.3390/jpm10030066>

390. Ye H, Zhang K, Kai D, Li Z, Loh XJ. Polyester elastomers for soft tissue engineering. *Chem Soc Rev.* 2018; 47(12):4545-4580. Available from: <http://doi.org/10.1039/c8cs00161h>
391. Yee K, Malliaras K, Kanazawa H, Tseliou E, Cheng K, Luthringer DJ, et al. Allogeneic cardiospheres delivered via percutaneous transendocardial injection increase viable myocardium, decrease scar size, and attenuate cardiac dilatation in porcine ischemic cardiomyopathy. *PLoS One.* 2014;9(12):e113805. Available from: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0113805>
392. Yin Q, Xu N, Xu D, Dong M, Shi X, Wang Y, et al. Comparison of senescence-related changes between three- and two-dimensional cultured adipose-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cell Res Ther.* 2020; 11(1):226. Available from: <http://doi.org/10.1186/s13287-020-01744-1>
393. Yoon AR, Rivera-Cruz C, Gimble JM, Yun CO, Figueiredo ML. Immunotherapy by mesenchymal stromal cell delivery of oncolytic viruses for treating metastatic tumors. *Mol Ther Oncolytics.* 2022;25:78-97. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.omto.2022.03.008>
394. Yoshimura K, Sato K, Aoi N, Kurita M, Hirohi T, Harii K. Cell-assisted lipotransfer for cosmetic breast augmentation: supportive use of adipose-derived stem/stromal cells. *Aesthetic Plast Surg.* 2020;44(4):1258-1265. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00266-020-01819-7>
395. Yu J, Shi J, Zhang Y, Zhang Y, Huang Y, Chen Zh, et al. The replicative senescent mesenchymal stem / stromal cells defect in DNA damage response and anti-oxidative capacity. *Int J Med Sci.* 2018; 15(8):771-781. Available from: <https://doi.org/10.7150/ijms.24635>
396. Yu S, You X, Liang H, Li Y, Fu Y, Zhang X, et al. First trimester placental mesenchymal stem cells improve cardiac function of rat after myocardial infarction via enhanced neovascularization. *Heliyon.* 2021; 7(1):e06120. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e06120>
397. Yuan Y, Zhang S, Gao J, Lu F. Spatial structural integrity is important for adipose regeneration after transplantation. *Arch Dermatol Res.* 2015;307(8):693-704. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00403-015-1574-y>
398. Zakrzewski W, Dobrzyński M, Szymonowicz M, Rybak Z. Stem cells: past, present, and future. *Stem Cell Res Ther.* 2019; 10:68. Available from: <https://doi.org/10.1186/s13287-019-1165-5>
399. Zhang J, Tao R, Lalit P, Carvalho J, Markandeya Y, Palecek S, et al. Cardiac differentiation of human pluripotent stem cells using defined extracellular matrix proteins reveals essential role of fibronectin. *bioRxiv.* 2021. Available from: <https://doi.org/10.1101/2021.04.09.439173>
400. Zhang M, Jiang MH, Kim DW, Ahn W, Chung E, Son Y, Chi G. Comparative analysis of the cell

fates of induced Schwann cells from subcutaneous fat tissue and naïve Schwann cells in the sciatic nerve injury model. *Biomed Res Int.* 2017;2017:1252851. Available from: <https://doi.org/10.1155/2017/1252851>

401. Zhang P, Moudgill N, Hager E, Tarola N, Dimatteo C, McIlhenny S, et al. Endothelial differentiation of adipose-derived stem cells from elderly patients with cardiovascular disease. *Stem Cells Dev.* 2011;20(6):977-88. Available from: <https://doi.org/10.1089/scd.2010.0152>
402. Zhang X, Guo J, Zhou Y, Wu G. The roles of bone morphogenetic proteins and their signaling in the osteogenesis of adipose-derived stem cells. *Tissue Eng Part B Rev.* 2014;20(1):84-92. Available from: <https://doi.org/10.1089/ten.TEB.2013.0204>
403. Zhang Y, Hua F, Ding K, Chen H, Xu Ch, Ding W. Angiogenesis changes in ovariectomized rats with osteoporosis treated with estrogen replacement therapy. *Bio Res Int.* 2019. Available from: <https://doi.org/10.1155/2019/1283717>
404. Zhang Y, Ravikumar M, Ling L, Nurcombe V, Cool SM. Age-related changes in the inflammatory status of human mesenchymal stem cells: implications for cell therapy. *Stem Cell Reports.* 2021;16(4):694-707. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2021.01.021>
405. Zhang Z, Yang X, Cao X, Qin A, Zhao J. Current applications of adipose-derived mesenchymal stem cells in bone repair and regeneration: A review of cell experiments, animal models, and clinical trials. *Front Bioeng Biotechnol.* 2022;10:942128. Available from: <https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.942128>
406. Zhao L, Chen S, Yang P, Cao H, Li L. The role of mesenchymal stem cells in hematopoietic stem cell transplantation: prevention and treatment of graft-versus-host disease. *Stem Cell Res Ther.* 2019;10(1):182. Available from: <https://doi.org/10.1186/s13287-019-1287-9>
407. Zhao Q, Ren H, Han Z. Mesenchymal stem cells: Immunomodulatory capability and clinical potential in immune diseases. *J Cell Immunother.* 2016; 2(1):3-20. <https://doi.org/10.1016/j.jocit.2014.12.001>
408. Zhao X, Zhu Y, Laslett AL, Chan HF. Hepatic differentiation of stem cells in 2D and 3D biomaterial systems. *Bioengineering (Basel).* 2020;7(2):47. Available from: <https://doi.org/10.3390/bioengineering7020047>
409. Zheng S, Guan Y, Yu H, Huang G, Zheng C. Poly-l-lysine-coated PLGA/poly(amino acid)-modified hydroxyapatite porous scaffolds as efficient tissue engineering scaffolds for cell adhesion,

- proliferation, and differentiation. *New J Chem.* 2019;43:9989-10002. Available from: <https://doi.org/10.1039/C9NJ01675A>
410. Zhou W, Lin J, Zhao K, Jin K, He Q, Hu Y, et al. Single-cell profiles and clinically useful properties of human mesenchymal stem cells of adipose and bone marrow origin. *Am J Sports Med.* 2019;47(7):1722-1733. Available from: <https://doi.org/10.1177/0363546519848678>
411. Zhou Y, Hu X, Zheng X, Wu Y, Tian N, Xu H, Zhang X. Differentiation potential of mesenchymal stem cells derived from adipose tissue vs bone marrow toward annulus fibrosus cells in vitro. *Curr Stem Cell Res Ther.* 2017;12(5):432-439. Available from: <https://doi.org/10.2174/1574888X12666170214093955>
412. Zhu H, Mitsuhashi N, Klein A, Barsky LW, Weinberg K, Barr ML, et al. The role of the hyaluronan receptor CD44 in mesenchymal stem cell migration in the extracellular matrix. *Stem Cells.* 2006;24(4):928-35. Available from: <https://doi.org/10.1634/stemcells.2005-0186>
413. Zimmerlin L, Donnenberg AD, Rubin JP, Basse P, Landreneau RJ, Donnenberg VS. Regenerative therapy and cancer: in vitro and in vivo studies of the interaction between adipose-derived stem cells and breast cancer cells from clinical isolates. *Tissue Eng Part A.* 2011;17(1-2):93-106. Available from: <https://doi.org/10.1089/ten.TEA.2010.0248>
414. Zinngrebe J, Debatin KM, Fischer-Posovszky P. Adipocytes in hematopoiesis and acute leukemia: friends, enemies, or innocent bystanders? *Leukemia.* 2020;34(9):2305-2316. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41375-020-0886-x>
415. Zusso M, Moro S, Giusti P, Stokes L, eds. *Neuroinflammation and its resolution: from molecular mechanisms to therapeutic perspectives.* Lausanne: Frontiers Media SA; 2020. 280 p. Available from: <https://doi.org/10.3389/978-2-88963-854-3>
416. Zwetsloot PP, Végh AM, Jansen of Lorkeers SJ, van Hout GP, Currie GL, Sena ES, et al. Cardiac stem cell treatment in myocardial infarction: a systematic review and meta-analysis of preclinical studies. *Circ Res.* 2016;118(8):1223-32. Available from: <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.115.307676>

Список опублікованих праць за темою дисертації***в яких опубліковані основні наукові результати дисертації:***

1. Кирик ВМ, Бутенко ГМ. Стволовые клетки из жировой ткани: основные характеристики и перспективы клинического применения в регенеративной медицине. Журн АМН України. 2010; 16(4):576-604. *(Здобувачем проведено опрацювання літературних джерел, порівняльний аналіз та узагальнення матеріалів, написання статті). Фахове видання.*
2. Кучук ОВ, Цупиков ОМ, Кирик ВМ. Культивирование и направленная остеогенная дифференцировка мультипотентных стромальных клеток костного мозга в культуре микромассы. Проблемы остеологии. 2010; 13(4):36-41. *(Здобувачем проведено виділення та характеристику клітин, інтерпретацію отриманих результатів, оформлення статті). Фахове видання.*
3. Бутенко ГМ, Кирик ВМ. Регенеративная медицина и стволовые клетки – проблемы и решения. Журн АМН України. 2011; 17(1):62-66. *(Здобувачем проведено пошук та опрацювання літературних джерел, порівняльний аналіз та узагальнення матеріалів, написання статті). Фахове видання.*
4. Shablilii V, Kuchma M, Kyryk V, Onishchenko G, Tsypukov O, Klymenko P, Kuchuk O, Gabrielyan A, Domanskiy T, Onischenko V, Lukash L, Lobyntseva G. Mesenchymal stromal cells from native and cryopreserved human placenta: phenotype, multipotency and in vivo migration potential. Problems of Cryobiology and Cryomedicine. 2012; 22(2):157-160. *(Здобувачем проведено фенотипування клітин, інтерпретацію результатів, редагування статті). Фахове видання.*
5. Шаблій ВА, Кучма МД, Кирик ВМ, Онищенко ГМ, Цупиков ОМ, Клименко ПП, Арешков ПО, Кучук ОВ, Лукаш ЛЛ, Лобинцева ГС. Фенотип і міграційний потенціал мультипотентних мезенхімних стромальних клітин з нативної та кріоконсервованої плаценти людини. Biotechnologia Acta. 2012; 5(5):34-44. *(Здобувачем проведено моделювання кардіоміопатії, фенотипування та трансплантацію стовбурових клітин, статистичний аналіз, інтерпретацію результатів, редагування статті). Фахове видання.*

6. Шаблій ВА, Кучма МД, Кирик ВМ, Онищенко ГМ, Цупиков ОМ, Клименко ПП, Арешков ПО, Кучук ОВ, Салютін РВ, Лукаш ЛЛ, Лобинцева ГС. Вплив мезенхімальних стромальних клітин з нативної та кріоконсервованої плаценти людини на деякі морфо-функціональні особливості міокарда у мишей з кардіоміопатією. Вісник невідкладної і відновної медицини. 2012; 13(1):133-138. *(Здобувачем проведено моделювання кардіоміопатії, фенотипування і трансплантацію клітин, аналіз та інтерпретацію результатів, редагування статті). Фахове видання.*
7. Kuchuk OV, Kyryk VM. Stepwise differentiation of multipotent cells from murine adipose tissue in osteogenic direction. Problems of Cryobiology and Cryomedicine. 2012; 22(2):161-164. *(Здобувачем проведено виділення та характеристику клітин, інтерпретацію отриманих результатів). Фахове видання.*
8. Поляченко ЮВ, Запольська КМ, Салютін РВ, Кучук ОВ, Кирик ВМ, Клименко ПП, Онищенко ГМ, Шаблій ВА. Перспективи застосування алогенних мультипотентних мезенхімальних стовбурових клітин для захисту жирових трансплантатів від резорбції. Клінічна хірургія. 2013; 2:60-63. *(Здобувачем проведено характеристику та трансплантацію стовбурових клітин, статистичний аналіз даних). Фахове видання, індексація в Scopus.*
9. Kyryk VM. Phenotyping and sorting of murine bone marrow haematopoietic stem cells using flow cytometry. Biotechnologia Acta. 2014; 7(6):51-56. DOI: <http://dx.doi.org/10.15407/biotech7.06.051> *Фахове видання.*
10. Shablii VA, Kuchma MD, Kyryk VM, Svitina HM, Shablii YuM, Lukash LL, Lobintseva GS. Mesenchymal and trophoblast immunophenotype of multipotent stromal cells from human placenta. Biopolymers and Cell. 2014; 30(2):118-121. DOI: <http://dx.doi.org/10.7124/bc.000889> *(Здобувачем проведено фенотипування стовбурових клітин, аналіз та інтерпретацію результатів, редагування статті). Фахове видання, індексація в Scopus.*
11. Квитницкая-Ръжова ТЮ, Клименко ПП, Хаблак ГВ, Парамонова ГИ, Кирик ВМ. Структурные изменения миокарда при моделировании кардиомиопатии и ее коррекции с помощью стволовых клеток у животных разного возраста. Світ медицини та біології. 2014; 4(47):130-134. *(Здобувачем проведено моделювання кардіоміопатії, виділення, характеристику та трансплантацію стовбурових клітин). Фахове видання.*

12. Kuchma MD, Kyryk VM, Svitina HM, Shablii YuM, Lukash LL, Lobyntseva GS, Shablii VA. Comparative analysis of the hematopoietic progenitor cells from placenta, cord blood, and fetal liver, based on their immunophenotype. *BioMed Res Int*, 2015; 2015:418752. DOI: <https://doi.org/10.1155/2015/418752> (Здобувачем проведено фенотипування стовбурових клітин, оформлення та редагування статті). Індексція в Scopus та WoS, кuartиль Q2.
13. Tsupukov O, Kyryk V, Ustymenko A, Yatsenko K, Butenko G, Skybo G. Effect of transplantation of adipose-derived multipotent mesenchymal stromal cells on the nervous tissue and behavioral responses in a mouse model of periventricular leukomalacia. *Cell Organ Transpl*. 2015; 3(1):68-73. DOI: <https://doi.org/10.22494/COT.v3i1.22> (Здобувачем проведено виділення, фенотипування та трансплантацію клітин, інтерпретацію отриманих результатів). Фахове видання.
14. Tsupukov O, Ustymenko A, Kyryk V, Smozhanik E, Yatsenko K, Butenko G, Skibo G. Ultrastructural study of mouse adipose-derived stromal cells induced towards osteogenic direction. *Microsc Res Tech*. 2016; 79(6), 557-564. DOI: <https://doi.org/10.1002/jemt.22670> (Здобувачем проведено виділення та характеристику стовбурових клітин, аналіз отриманих результатів, редагування статті). Індексція в Scopus та WoS, кuartиль Q1.
15. Svitina H, Kyryk V, Skrypkina I, Kuchma M, Bukreieva T, Areshkov P, Shablii Yu, Klymenko P, Garmanchuk L, Ostapchenko L, Lobintseva G, Shablii V. Placenta-derived multipotent cells have no effect on the size and number of DMH-induced colon tumors in rats. *Experimental and Therapeutic Medicine*. 2017; 14(3):2135-2147. DOI: <https://doi.org/10.3892/etm.2017.4792> (Здобувачем проведено фенотипування стовбурових клітин, інтерпретацію отриманих результатів, редагування статті). Індексція в Scopus та WoS, кuartиль Q3.
16. Tsupukov O, Lushnikova I, Ustymenko A, Kyryk V, Nikandrova Y, Patseva M, Yatsenko K, Butenko G, Skibo G. Protective effects of adipose-derived multipotent mesenchymal stromal cells of mice on periventricular leukomalacia model in vitro. *Cell Organ Transpl*. 2017; 5(1):28-32. DOI: <https://doi.org/10.22494/cot.v5i1.66> (Здобувачем проведено виділення та фенотипування стовбурових клітин, інтерпретацію отриманих результатів, редагування статті). Фахове видання.

17. Kyryk V, Kuchuk O, Mamchur A, Ustymenko A, Lutsenko T, Tsupukov O, Yatsenko K, Skibo G, Bilko D, Bilko N. 3D culture of murine adipose-derived multipotent mesenchymal stromal cells in hydrogel based on carbomer 974P. *Cell Organ Transpl.* 2018; 6(2):195-201. DOI: <https://doi.org/10.22494/cot.v6i2.91> *(Здобувачем проведено виділення, характеристику та трансплантацію стовбурових клітин, статистичний аналіз даних, інтерпретацію отриманих результатів, оформлення статті). Фахове видання.*
18. Ustymenko A, Kyryk V, Lutsenko T, Tsupukov O, Butenko G. Morphofunctional properties of adipose-derived multipotent mesenchymal stromal cells in vitro in ovariectomized mice of different ages. *Cell Organ Transpl.* 2019; 7(2):158-167. DOI: <https://doi.org/10.22494/cot.v7i2.102> *(Здобувачем проведено моделювання овариоектомії, виділення та характеристику стовбурових клітин, аналіз та інтерпретацію отриманих результатів, оформлення статті). Фахове видання, кат. А, індексація в Scopus.*
19. Lykhmus O, Koval L, Voytenko L, Uspenska K, Komisarenko S, Deryabina O, Shuvalova N, Kordium V, Ustymenko A, Kyryk V, Skok M. Intravenously injected mesenchymal stem cells penetrate the brain and treat inflammation-induced brain damage and memory impairment in mice. *Front Pharmacol.* 2019;10:355. DOI: <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.00355> *(Здобувачем проведено виділення та характеристику клітин, аналіз та інтерпретацію результатів, редагування статті). Індексція в Scopus та WoS, квартиль Q1.*
20. Shablilii V, Kuchma M, Svitina H, Skrypkinia I, Areshkov P, Kyryk V, Bukreeva T, Nikulina V, Shablilii Iu, Lobyntseva G. High proliferative placenta-derived multipotent cells express cytokeratin 7 at low level. *BioMed Res Int.* 2019; 2019:2098749. DOI: <https://doi.org/10.1155/2019/2098749> *(Здобувачем проведено фенотипування стовбурових клітин, аналіз та інтерпретацію отриманих результатів, редагування статті). Індексція в Scopus та WoS, квартиль Q2.*
21. Golovynska I, Kalmukova O, Svitina H, Kyryk V, Shablilii V, Senchylo N, Ostrovska G, Dzerzhynskiyi M, Stepanov Yu, Golovynskiyi S, Ohulchanskyu T, Liwei Liu, Garmanchuk L, Junle Qu. Morpho-functional characteristics of bone marrow multipotent mesenchymal stromal cells after activation or inhibition of epidermal growth factor and toll-like receptors or treatment with DNA intercalator cisplatin. *Cytometry Part A.* 2019;95A:24-33. DOI: <https://doi.org/10.1002/cyto.a.23593> *(Здобувачем проведено фенотипування клітин, інтерпретацію результатів, редагування статті). Індексція в Scopus та WoS, квартиль Q2.*

22. Lykhmus O, Kalashnyk O, Koval L, Voytenko L, Uspenska K, Komisarenko S, Deryabina O, Shuvalova N, Kordium V, Ustymenko A, Kyryk V, Skok M. Mesenchymal stem cells or Interleukin-6 improve episodic memory of mice lacking $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptors. *Neuroscience*. 2019; 413:31-44. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2019.06.004> (Здобувачем проведено виділення та характеристику стовбурових клітин, аналіз та інтерпретацію отриманих результатів, редагування статті). Індексція в Scopus та WoS, квартиль Q2.
23. Ivanischev V, Ustymenko A, Kyryk V, Butenko G. Comparative morphometric study of adipose tissue in ovariectomized mice of different ages. *Cell Organ Transpl*. 2020; 8(1):64-69. DOI: <https://doi.org/10.22494/cot.v8i1.108> (Здобувачем проведено моделювання оваріоектомії, аналіз та інтерпретацію отриманих результатів, редагування статті). Фахове видання кат. А, індексція в Scopus, квартиль Q3.
24. Yatsenko K, Lushnikova I, Ustymenko A, Patseva M, Govbakh I, Kyryk V, Tsupykov O. Adipose-derived stem cells reduce lipopolysaccharide-induced myelin degradation and neuroinflammatory responses of glial cells in mice. *J Pers Med*. 2020; 10(3): 66. DOI: <https://doi.org/10.3390/jpm10030066> (Здобувачем проведено виділення та характеристику стовбурових клітин, аналіз та інтерпретацію отриманих результатів, редагування статті). Індексція в Scopus та WoS, квартиль Q1.
25. Rubtsov V, Govbakh I, Ustymenko A, Kyryk V, Tsupykov O. The effects of adipose-derived multipotent mesenchymal stromal cells transplantation on locomotor activity and function of the sciatic nerve in mice with peripheral neuropathy. *Cell Organ Transpl*. 2020; 8(2): 159-165. DOI: <https://doi.org/10.22494/cot.v8i2.111> (Здобувачем проведено виділення та характеристику стовбурових клітин, аналіз та інтерпретацію отриманих результатів, редагування статті). Фахове видання кат. А, індексція в Scopus, квартиль Q3.
26. Kyryk V, Ustymenko A. Isolation and phenotyping of cardiac-derived progenitor cells from neonatal mice. *Cell Organ Transpl*. 2021; 9(2):126-133. DOI: <https://doi.org/10.22494/cot.v9i2.125> (Здобувачем проведено виділення та фенотипування стовбурових клітин, статистичний аналіз даних, інтерпретацію отриманих результатів, оформлення статті). Фахове видання кат. А, індексція в Scopus.

27. Govbakh I, Kyryk V, Ustymenko A, Rubtsov V, Tsupykov O, Bulgakova N, Zavodovskiy D, Sokolowska I, Maznychenko A. Stem cell therapy enhances motor activity of triceps surae muscle in mice with hereditary peripheral neuropathy. *Int J Mol Sci.* 2021; 22(21):12026. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms222112026> *(Здобувачем проведено виділення та характеристику клітин, аналіз та інтерпретацію отриманих результатів, редагування статті). Індексція в Scopus та WoS, квартиль Q1.*
28. Kyryk V, Kuchuk O, Klymenko P. Regenerative effects of mouse adipose-derived multipotent stromal cells in a micromass graft for the treatment of bone injury model. *Anti-Aging Eastern Europe.* 2022; 1(1):75-86. DOI: <https://doi.org/10.56543/aaeeu.2022.1.1.11> *(Здобувачем проведено виділення та фенотипування стовбурових клітин, моделювання пошкодження та трансплантацію клітин, статистичний аналіз даних, інтерпретацію результатів, оформлення статті).*
29. Ustymenko A, Kyryk V, Butenko G. Morphofunctional characteristics of adipose-derived multipotent mesenchymal stromal cells from CBA/Ca mice of different ages in cell culture in vitro. *Cell Organ Transpl.* 2022; 10(1):46-51. DOI: <https://doi.org/10.22494/cot.v10i1.137> *(Здобувачем проведено виділення та фенотипування стовбурових клітин, інтерпретацію результатів, редагування статті). Фахове видання кат. А, індексція в Scopus, квартиль Q4.*
30. Kyryk V, Ustymenko A, Lutsenko T, Klymenko P, Tsupykov O. Regenerative effects of mouse aortic endothelial cells in a murine model of critical limb ischemia. *Cell Organ Transpl.* 2022; 10(2):90-96. DOI: <https://doi.org/10.22494/cot.v10i2.143> *(Здобувачем проведено моделювання пошкодження, фенотипування та трансплантацію стовбурових клітин, статистичний аналіз даних, інтерпретацію результатів, оформлення статті). Фахове видання кат. А, індексція в Scopus, квартиль Q4.*
31. Kyryk V, Tsupykov O, Ustymenko A, Govbakh I, Smozhanik E, Butenko G, Skibo G. Age-related ultrastructural changes in spheroids of the adipose-derived multipotent mesenchymal stromal cells from ovariectomized mice. *Front Cell Neurosci.* 2023; 17. DOI: <https://doi.org/10.3389/fncel.2023.1072750> *(Здобувачем проведено фенотипування стовбурових клітин, аналіз даних, інтерпретацію результатів, оформлення статті). Індексція в Scopus та WoS, квартиль Q1.*

які засвідчують апробацію матеріалів дисертації:

32. Кучук ОВ, Цупиков ОМ, Кирик ВМ. Культура мікромаси мультипотентних стромальних клітин кісткового мозку та можливості її застосування для регенерації кісткової тканини. Тези доп. наук. конф. мол. вчених з міжнар. уч. “Актуальні питання геронтології та геріатрії”, Київ. 2011:25-26. *(Здобувачем проведено виділення та характеристику стовбурових клітин, аналіз результатів, написання тез).*
33. Сушко ОМ, Кирик ВМ. Юридичні аспекти застосування стовбурових клітин в Україні. Тези доп. наук. конф. мол. вчених з міжнар. уч. “Актуальні питання геронтології та геріатрії”, Київ. 2011:54-55. *(Здобувачем проведено опрацювання нормативної документації, написання тез).*
34. Kuchuk O, Kyryk V. Osteogenic induction of multipotent stromal cells of mice adipose tissue. 4th International IMBG Conference for young scientists “Molecular biology: advances and perspectives”, Kyiv. 2011:166. *(Здобувачем проведено виділення та характеристику стовбурових клітин, аналіз результатів, написання тез).*
35. Kuchma M, Shablii V, Kyryk V, Onishchenko A, Lobitseva G. Cryopreserved human placental tissue as source of hematopoietic and mesenchymal stem cells. World Cord Blood Congress III "Cord blood transplantation and immunobiology of haematopoietic stem cell transplant", Rome (IT). 2011:171. *(Здобувачем проведено фенотипування стовбурових клітин, аналіз результатів, редагування тез).*
36. Kuchuk O, Tsypukov O, Kyryk V. Cultivation and osteogenic differentiation of murine bone marrow multipotent stromal cells in micromass culture. Abstracts of the World Conference on Regenerative Medicine, Leipzig (DE). 2011. Regenerative Medicine. 2011; 6(6, Suppl. 2):274-276. DOI: <https://doi.org/10.2217/rme.12.16>. *(Здобувачем проведено виділення та характеристику стовбурових клітин, аналіз результатів, написання тез).*
37. Shablii V, Kuchma M, Kyryk V, Onishchenko A, Lukash L, Lobintseva G. Characteristics of hematopoietic and mesenchymal stem cells isolated from cryopreserved human placental tissue. ISSCR 10th Annual Meeting, Poster Session Abstracts. Vol. 2. Yokohama (JP). 2012:95. *(Здобувачем проведено фенотипування стовбурових клітин, аналіз результатів, редагування тез).*

38. Безруков ВВ, Бутенко ГМ, Парамонова ГИ, Ськало НВ, Холин ВА, Олар ВВ, Лабунец ИФ, Кирик ВМ, Родниченко АЕ, Клименко ПП, Балла ИА. Влияние трансплантации стволовых клеток костного мозга на миокардиопатию, вызванную введением изопротеренола. Тези наук.-практ. конф. з міжнар. уч. "Актуальні проблеми регенеративної медицини", Київ. 2012. Журн. НАМН України. 2012; т. 18, додаток:17-18. *(Здобувачем проведено моделювання кардіоміопатії, виділення та характеристику стовбурових клітин, аналіз результатів). Фахове видання.*
39. Кирик В. Эндотелиальные прогениторные клетки и преэклампсия. Збірник тез наук.-практ. конф. з міжнар. уч. "Клітинні технології в акушерстві, гінекології, неонатології та дитячій неврології", Київ. 2013:13.
40. Shablil V, Kuchma M, Kyryk V, Svitina H, Shablil Yu, Skrypkina I, Lukash L, Lobitseva G. Multipotent trophoblast cells derived from native and cryopreserved human placental tissue. 3rd IPLASS Meeting, Granada (ES). 2014:7. *(Здобувачем проведено фенотипування стовбурових клітин, аналіз результатів, редагування тез).*
41. Кирик В, Кучук О, Клименко П. Регенераторний потенціал ММСК жирової клітковини при пошкодженні кісткової тканини у мишей. Матеріали ІІІ міжнар. мед. конгресу "Впровадження сучасних досягнень медичної науки в практику охорони здоров'я України", Київ. 2014:16. *(Здобувачем проведено виділення та характеристику стовбурових клітин, аналіз результатів, написання тез).*
42. Kyryk V, Kuchuk O, Poberezhny P, Mamchur A, Klyumenko P, Rybachuk O, Perale G. In vivo survival of murine adipose-derived stem cells in hydrogel composed of carbomer 974P. Збірник тез науково–практичної конференції з міжнародною участю "Трансплантація – сьогодні, минуле та майбутнє", Київ. 2014:39. *(Здобувачем проведено виділення та характеристику стовбурових клітин, аналіз результатів, написання тез).*
43. Shablil V, Svitina H, Kuchma M, Kyryk V, I Skrypkina, Areshkov P. Placental derived multipotent cells possess trophoblast specific features. Poster abstract book ISSCR 13th Annual Meeting, Stockholm (SE). 2015:413. *(Здобувачем проведено фенотипування стовбурових клітин, аналіз результатів, редагування тез).*
44. Кирик ВМ, Устименко АМ, Клименко ПП, Кучук ОВ. Регенеративний потенціал 3D-культури мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин жирової клітковини на

моделі критичної ішемії нижніх кінцівок. Матеріали конференції "Ендотеліальна дисфункція при вік-залежній патології – діагностика, профілактика, лікування", Київ. 2015. Кровообіг та гемостаз. 2015; 1-2:94-95. *(Здобувачем проведено виділення та характеристику стовбурових клітин, аналіз результатів, написання тез). Фахове видання.*

45. Kyryk VM. Advances in stem cells therapy for cardiovascular diseases. Conference Abstracts "Regenerative technologies in modern medicine", Odesa. 2017. Cell Organ Transpl. 2017; 5(1):133. DOI: <https://doi.org/10.22494/cot.v5i1.73> *Фахове видання.*
46. Кирик ВМ, Устименко АМ, Шаблій ВА, Немтінов ПІ, Руденко СА, Бутенко ГМ, Руденко АВ. Перспективи клітинної терапії серцево-судинних захворювань. Тези доп. наук.-практ. конф. "Інноваційні напрями в генетичній та регенеративній медицині", Київ. 2017. Cell Organ Transpl. 2017; 5(2):257. DOI: <https://doi.org/10.22494/cot.v5i2.79> *(Здобувачем проведено характеристику стовбурових клітин, аналіз результатів, написання тез). Фахове видання.*
47. Nikulina V, Kuchma M, Bukreieva T, Zahanich I, Kyryk V, Lobintseva G, et al. Cryopreservation of placenta tissue allows isolating viable mesenchymal and hematopoietic stem cells. Abstracts of ISCT 2019 Annual Meeting, Melbourne (AU). 2019. Cytotherapy. 2019; 21(5), S78–S79. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2019.03.485> *(Здобувачем проведено фенотипування стовбурових клітин, аналіз результатів, редагування тез). Індексція в Scopus та WoS, квартал Q1.*

які додатково відображають наукові результати дисертації:

48. Кучук ОВ, Кирик ВМ. Поэтапная дифференцировка в остеогенном направлении мультипотентных клеток жировой ткани мышцей. Матеріали доп. міні-симпозіума "День стовбурової клітини", Харків. 2012:23-28. *(Здобувачем проведено виділення та характеристику стовбурових клітин, аналіз результатів, редагування статті).*
49. Zusso M, Moro S, Giusti P, Stokes L, eds. Neuroinflammation and its resolution: From molecular mechanisms to therapeutic perspectives. Lausanne: Frontiers Media SA; 2020. 280 p. DOI: <https://doi.org/10.3389/978-2-88963-854-3> *(Здобувачем проведено характеристику стовбурових клітин, інтерпретацію отриманих результатів, редагування статті).*

50. Габрієлян АВ, Голюк ЄЛ, Домбровський ДБ, Кирик ВМ, Медведєв ВВ, Руденко СА, Шаблій ВА. Новітні методи застосування стовбурових клітин і біоінженерних технологій у регенеративній медицині. Реф. роботи, удостоєної Національної премії України ім. Бориса Патона, Київ, 2021 р. http://www.kdpu-nt.gov.ua/sites/default/files/work_files/4_referat_2.pdf *(Здобувачем проведено виділення і характеристику стовбурових клітин жиркової тканини, міокарда та плаценти, аналіз та інтерпретацію результатів з трансплантації, оформлення роботи).*
51. Кирик ВМ, Кучук ОВ, Тимченко АМ. Спосіб моделювання пошкодження кісткової тканини у мишей: пат. 60512 Україна. №u2010 13357; заявл. 10.11.2010; опубл. 25.06.2011, бюл. № 12. *(Здобувачем розроблено модель, оформлено заявку на патент).*
52. Кирик ВМ, Клименко ПП, Кучук ОВ, Романець ТР, Шаблій ВА. Спосіб моделювання пошкодження міокарда у мишей: пат. 66164 Україна. №u2011 07021; заявл. 03.06.2011; опубл. 26.12.2011, бюл. №24. *(Здобувачем розроблено модель, оформлено заявку на патент).*
53. Кирик ВМ, Клименко ПП, Устименко АМ, Луценко ТМ. Спосіб відновлення пошкодженої кісткової тканини у лабораторних тварин: пат. 104927 Україна. №u2015 08531; заявл. 02.09.2015; опубл. 25.02.2016, бюл. № 4. *(Здобувачем проведено характеристику та трансплантацію стовбурових клітин, аналіз результатів, оформлено заявку на патент).*
54. Кирик ВМ, Устименко АМ, Луценко ТМ, Калмикова ОО. Спосіб отримання культури експлантів аорти лабораторних тварин: пат. 127428 Україна. №u2018 03317; заявл. 29.03.2018; опубл. 25.07.2018, бюл. № 14. *(Здобувачем проведено виділення і характеристику стовбурових клітин, оформлено заявку на патент).*
55. Кирик ВМ, Устименко АМ, Бутенко ГМ. Спосіб отримання резидентних стовбурових клітин міокарда ссавців: пат. 149486 Україна. №u2021 02518; заявл. 13.05.2021; опубл. 24.11.2021, бюл. № 47. *(Здобувачем розроблено модель, оформлено заявку на патент).*

Відомості про апробацію результатів дисертації
(доповіді на конференціях, конгресах, симпозіумах)

1. Kuchuk O, Tsupukov O, Kyryk V. Cultivation and osteogenic differentiation of murine bone marrow multipotent stromal cells in micromass culture. Abstracts of the World Conference on Regenerative Medicine, Leipzig (DE). 2011. Regenerative Medicine. 2011; 6(6, Suppl. 2):274-276. DOI: <https://doi.org/10.2217/rme.12.16>. *Стендова доповідь та публікація тез.*
2. Кирик В. Ендотеліальні прогеніторні клітини та прееклампія. Збірник тез наук.-практ. конф. з міжнар. уч. "Клітинні технології в акушерстві, гінекології, неонатології та дитячій неврології", Київ. 2013:13. *Усна доповідь та публікація тез.*
3. Кирик В, Кучук О, Клименко П. Регенераторний потенціал ММСК жирової клітковини при пошкодженні кісткової тканини у мишей. Матеріали III міжнар. мед. конгресу "Впровадження сучасних досягнень медичної науки в практику охорони здоров'я України", Київ. 2014:16. *Стендова доповідь та публікація тез.*
4. Kyryk VM. Advances in stem cells therapy for cardiovascular diseases. Conference Abstracts "Regenerative technologies in modern medicine", Odesa. 2017. Cell Organ Transpl. 2017; 5(1):133. DOI: <https://doi.org/10.22494/cot.v5i1.73>. *Усна доповідь та публікація тез.*
5. Кирик ВМ, Устименко АМ, Шаблій ВА, Немтінов ПІ, Руденко СА, Бутенко ГМ, та ін. Перспективи клітинної терапії серцево-судинних захворювань. Тези доп. наук.-практ. конф. "Інноваційні напрями в генетичній та регенеративній медицині", Київ. 2017. Cell Organ Transpl. 2017; 5(2):257. DOI: <https://doi.org/10.22494/cot.v5i2.79>. *Усна доповідь та публікація тез.*
6. Kyryk V. Stem cell research for regenerative medicine. Yantai International Hi-Tech Cooperation Meeting, Yantai (CN). 2017. *Усна доповідь.*
7. Kyryk V. Study of somatic stem cells effectiveness in preclinical and clinical

- studies. Belt and Road Initiative Development Meeting of Guiyang National Hi-Tech Industrial Development Area, Guiyang (CN). 2017. *Усна доповідь*.
8. Кирик ВМ, Устименко АМ, Шаблій ВА, Немтінов ПІ, Руденко СА, Руденко АВ, та ін. Клітинні технології в лікуванні захворювань серцево-судинної системи. Наук.-практ. конф. з міжнар. уч. "Досягнення та перспективи експериментальної і клінічної ендокринології". 17-ті Данилевські читання, Харків. 2018. *Усна доповідь*.
 9. Kyryk V. Stem cell technology for regenerative medicine and drug screening in cardiology. Conference of Shandong Medical Association and Clinical Cell Therapy Professional Committee, Yantai (CN). 2018. *Усна доповідь*.
 10. Kyryk V. Innovative approaches to stem cell therapy in Ukraine. Southern University of Science and Technology Meeting, Shenzhen (CN). 2019. *Усна доповідь*.
 11. Кирик ВМ, Устименко АМ, Шаблій ВА, Немтінов ПІ, Руденко АВ. Застосування клітинних та тканинних регенеративних технологій в кардіології та кардіохірургії. XXII Національний Конгрес кардіологів України, Київ. 2021. *Усна доповідь*.
 12. Кирик ВМ. Проточна цитометрія в діагностиці клітинних маркерів ендотеліальної дисфункції. Наук.-практ. конф. "Прикладні аспекти сучасної науки в лабораторній діагностиці різних патологічних станів, а також у пацієнтів, що перенесли COVID-19", Київ. 2021. *Усна доповідь*.
 13. Кирик ВМ. Контроль якості та безпеки клітинних продуктів для регенеративної медицини. Наук.-практ. конф. "Регенеративні технології в травматології та ортопедії", Київ. 2021. *Усна доповідь*.
 14. Кирик ВМ. Критерії оцінки якості стовбурових клітин у регенеративній медицині. XXIII Національний Конгрес кардіологів України, Київ. 2022. *Усна доповідь*.
 15. Кирик ВМ. Перспективи клітинної та тканинної терапії захворювань серцево-судинної системи. XXIV Національний Конгрес кардіологів України, Київ. 2023. *Усна доповідь*.

Нововведення

1. КПКВ-6561040. Спосіб моделювання пошкодження трубчатих кісток у дрібних лабораторних тварин. Кирик В. М., Кучук О. В. Інформ. бюл. Дод. до "Журналу Національної академії медичних наук України". 2013. вип. 35: с. 9-10.
2. КПКВ-6561040. Спосіб моделювання кардіоміопатії у лабораторних мишей. Кирик В. М., Устименко А. М., Луценко Т. М. Інформ. бюл. Дод. до "Журналу Національної академії медичних наук України". 2017. вип. 43: с. 15.
3. КПКВ-6561040. Спосіб отримання культури експлантів аорти лабораторних тварин. Кирик В. М., Устименко А. М., Луценко Т. М. Інформ. бюл. Дод. до "Журналу Національної академії медичних наук України". 2019. вип. 47: с. 11.
4. КПКВ-6561040. Спосіб виділення клітин синоатріального вузла серця миші. Кирик В. М., Устименко А. М. Інформ. бюл. Дод. до "Журналу Національної академії медичних наук України". 2020. вип. 49: с. 11-12.
5. КПКВ 6561040. Спосіб оцінки критеріїв якості культур мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин жирової тканини мишей в умовах оваріоектомії. Устименко А. М., Кирик В. М., Бутенко Г. М. Інформ. бюл. Дод. до "Журналу Національної академії медичних наук України". 2021. вип. 51: с.13.
6. КПКВ 6561040. Спосіб виділення тканинспецифічних прогеніторних клітин з міокарда мишей. Кирик В. М., Устименко А. М. Інформ. бюл. Дод. до "Журналу Національної академії медичних наук України". 2022. вип. 53: с.8-9.

Технології

1. Спосіб отримання культури експлантів аорти. Реєстраційна картка технології № 0619U000112. ДУ "Інститут генетичної та регенеративної медицини НАМН України". 2018. <https://rkt.ukrintei.ua/view/rkt/02e74f10e0327ad868d138f2b4fdd6f0>
2. Спосіб отримання резидентних стовбурових клітин міокарда ссавців. Реєстраційна картка технології № 0621U000163. ДУ "Інститут генетичної та регенеративної медицини НАМН України". 2021. <https://rkt.ukrintei.ua/view/rkt/ba3e9b6a519cfddc560b5d53210df1bd>

ЗАТВЕРДЖУЮ


 Заступник директора з наукової роботи
 ДУ "Інститут геронтології
 ім. Д.Ф. Чеботарьова НАМН України"
 докт. мед. наук О.К. Кульчицький
 "03" жовтня 2014 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. Назва пропозиції для впровадження:
"Спосіб моделювання пошкодження трубчатих кісток у дрібних лабораторних тварин"
2. Установа-розробник: ДУ "Інститут генетичної та регенеративної медицини НАМН"
 м. Київ, 04114, вул. Вишгородська, 67.
 Автори - Кирик В.М., Кучук О.В.
3. Джерело інформації: Інформаційний бюлетень, вип. 35 (Додаток до "Журналу Національної академії медичних наук України").
4. Де впроваджено: ДУ "Інститут геронтології ім. Д.Ф. Чеботарьова НАМН України"
5. Термін впровадження: 12.2013-10.2014
6. Область застосування: в науково-дослідній роботі з дослідження імунологічних механізмів регенерації кісткової тканини при патології опорно-рухового апарату, пов'язаній з віком.
7. Ефективність впровадження: запропонований метод дозволяє вивчати в експерименті процеси регенерації кісткової тканини при гострих пошкодженнях у лабораторних тварин різного віку.

Дата "03" жовтня 2014 р.

Відповідальний за впровадження
 канд. біол. наук, наук. співроб.
 лабораторії патофізіології та імунології





А. М. Устименко



АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. Назва пропозиції для впровадження
«Спосіб моделювання кардіоміопатії у лабораторних мишей».
2. Установа-розробник: ДУ "Інститут генетичної та регенеративної медицини НАМН"
04114, м. Київ, вул. Вишгородська, 67
Автори: Кирик В. М., Устименко А. М., Луценко Т. М.
3. Джерело інформації: публікації в наукових виданнях, семінари
4. Де впроваджено: лабораторія морфології та цитології ДУ "Інститут геронтології ім. Д. Ф. Чеботарьова НАМН"
5. Термін впровадження: 06.2016-12.2017
6. Область застосування: в науково-дослідній роботі для розробки нових медикаментозних та біотехнологічних підходів лікування патології серцево-судинної системи
7. Ефективність впровадження: запропонований метод дозволяє вивчати процеси регенерації міокарду та оцінювати ефективність фармакологічних препаратів та клітинної трансплантації у молодих та старих лабораторних тварин з пошкодженням міокарду.

Відповідальний за впровадження

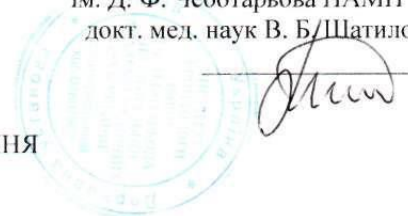
керівник лабораторії
морфології та цитології
докт. біол. наук, професор

Т. Ю. Квітницька-Рижова

Дата 01.06.2016

ЗАТВЕРДЖУЮ

Заступник директора з наукової роботи
ДУ "Інститут геронтології
ім. Д. Ф. Чеботарьова НАМН"
докт. мед. наук В. Б. Шатило



АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. Назва пропозиції для впровадження
«Спосіб отримання культури клітин з експлантів аорти лабораторних тварин».
2. Установа-розробник: ДУ "Інститут генетичної та регенеративної медицини НАМН"
04114, м. Київ, вул. Вишгородська, 67
Автори: Кирик В. М., Устименко А. М., Луценко Т. М.
3. Джерело інформації: публікації в наукових виданнях, семінари
4. Де впроваджено: лабораторія морфології та цитології
ДУ "Інститут геронтології ім. Д. Ф. Чеботарьова НАМН"
5. Термін впровадження: 06.2017-12.2018
6. Область застосування: в науково-дослідній роботі для розробки нових
медикаментозних та біотехнологічних підходів лікування патології серцево-судинної
системи.
7. Ефективність впровадження: запропонований метод може використовуватись
для дослідження регенеративного потенціалу ендотеліальних стовбурових клітин та
подальшої розробки нових методів лікування ішемічних пошкоджень тканин різного типу.

Відповідальний за впровадження

керівник лабораторії
морфології та цитології
докт. біол. наук, професор

Т. Ю. Квітницька-Рижова

Дата 05. 11. 2018


ЗАТВЕРДЖУЮ
 Заступник директора з наукової роботи
 ДУ "Інститут генетичної
 та регенеративної медицини НАМН"
 докт. мед. наук С. М. Новікова



АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Назва пропозиції для впровадження:**
 Спосіб виділення тканиноспецифічних прогеніторних клітин з міокарда мишей.
2. **Установа-розробник:** ДУ "Інститут генетичної та регенеративної медицини НАМН", 04114, м. Київ, вул. Вишгородська, 67
3. **Автори:** Кирик В. М., Устименко А. М.
4. **Джерела інформації:**
 Kyryk V, Ustymenko A. Isolation and phenotyping of cardiac-derived progenitor cells from neonatal mice. Cell Organ Transpl. 2021; 9(2):in press. <https://doi.org/10.22494/cot.v9i2.125>
 Кирик В. М., Устименко А. М., Бутенко Г.М. (2021). Патент України на корисну модель №149486и "Спосіб отримання резидентних стовбурових клітин міокарда свавців". - № u2021025; Заяв. 13.05.2021; Опубл. 24.11.2021 – Бюл. № 47.
5. **Місце впровадження:** лабораторія клітинних та тканинних культур ДУ "Інститут генетичної та регенеративної медицини НАМН"
6. **Термін впровадження:** з 06.09.2021 р.
7. **Ефективність впровадження відповідно з критеріями, викладеними в джерелах інформації:** суть способу полягає у виділенні зразків тканин серця без зовнішнього фіброзного шару перикарду та їх культивуванні методом експлантів. Ефективність полягає в отриманні чистої культури прогеніторних клітин міокарда за короткий час та у зменшенні витрат реактивів до 30 %.

Відповідальний за впровадження
 завідувач лабораторії
 клітинних та тканинних культур
 канд. мед. наук, старш. наук. співроб.

 В. М. Кирик

Перелік моноклональних антитіл, використаних для діагностичних панелей мультипараметричного імунофенотипування субпопуляцій соматичних стовбурових та прогеніторних клітин миші.

Маркер	Флуорохром	Клон	Виробник	Каталожний номер	Довжина хвилі збудження, нм	Параметри дзеркала, нм*	Параметри фільтра, нм*
CD14	PerCP-Cy TM 5.5	rmC5-3	BD Biosciences	560638	488	655	695/40
CD31	PE	MEC 13.3	BD Biosciences	553373	488	556	585/42
CD31	PE-Cy7 TM	390	Invitrogen	25-0311-82	488	735	780/60
CD34	Alexa Fluor® 647	RAM34	BD Biosciences	560230	633	-	660/20
CD38	APC	5K14	US Biological	C2390-13D	633	-	660/20
CD44	PE	IM7	BD Biosciences	553134	488	556	585/42
CD45	PE-Cy7 TM	30-F11	BD Biosciences	552848	488	735	780/60
CD45	APC-Cy7 TM	30-F11	BD Biosciences	557659	633	735	780/60
CD45	PE	EM-05	Invitrogen	MA1-10233	488	556	585/42
CD73	PE	TY/23	BD Biosciences	550741	488	556	585/42
CD90.1	PE	OX-7	BD Biosciences	551401	488	556	585/42
CD90.1	APC-Cy7	OX-7	BD Biosciences	561401	633	735	780/60
CD105	APC	MJ7/18	Invitrogen	17-1051-82	633	-	660/20
CD105	Alexa Fluor® 647	MJ7/18	BD Biosciences	562761	633	-	660/20
CD117	PE	2B8	BD Biosciences	553355	488	556	585/42
CD117	PE-Cy7 TM	2B8	BD Biosciences	558163	488	735	780/60
CD117	APC	2B8	BD Biosciences	561074	633	-	660/20
CD309	PE	Avas12a1	Invitrogen	12-5821-82	488	556	585/42
Troponin I	Alexa Fluor® 647	C5	BD Biosciences	564409	633	-	660/20
Ly-6A/E	PE	E13-161.7	BD Biosciences	561076	488	556	585/42

Перелік моноклональних антитіл, використаних для діагностичних панелей мультипараметричного імунофенотипування субпопуляцій соматичних стовбурових та прогеніторних клітин людини.

Маркер	Флуорохром	Клон	Виробник	Каталожний номер	Довжина хвилі збудження, нм	Параметри дзеркала, нм*	Параметри фільтра, нм*
CD14	Pacific Blue™	M5E2	BD Biosciences	558121	405	-	450/40
CD14	APC-Cy™7	MφP9	BD Biosciences	557831	633	735	780/60
CD19	PE-Cy™7	H1B19	BD Biosciences	560728	488	735	780/60
CD19	PE-Cy™7	SJ25C1	BD Biosciences	557835	488	735	780/60
CD19	APC	H1B19	BD Biosciences	555415	633	-	660/20
CD29	APC	MAR4	BD Biosciences	559883	633	-	660/20
CD31	PE	WM59	BD Biosciences	555446	488	556	585/42
CD31	APC-Cy™7	WM59	BD Biosciences	563653	633	735	780/60
CD34	APC	581	BD Biosciences	555824	633	-	660/20
CD34	PE	581	BD Biosciences	555822	488	556	585/42
CD38	PE-Cy™7	HIT2	BD Biosciences	560677	488	735	780/60
CD44	PE	IM7	Invitrogen	12-0441-82	488	556	585/42
CD44	PE-Cy™7	G44-26	BD Biosciences	560533	488	735	780/60
CD45	FITC	HI30	BD Biosciences	555482	488	502	530/30
CD45	APC-Cy™7	2D1	BD Biosciences	557833	633	735	780/60
CD45	PerCP-Cy™5.5	HI30	BD Biosciences	564105	488	655	695/40
CD45	PerCP	5B1	Miltenyi Biotec	130-108-020	488	655	695/40
CD73	PE	AD2	BD Biosciences	550257	488	556	585/42
CD90	FITC	5E10	BD Biosciences	555595	488	502	530/30
CD105	PerCP-Cy™5.5	266	BD Biosciences	560819	488	655	695/40
CD117	APC	YB5.B8	BD Biosciences	550412	633	-	660/20

CD117	BB700	YB5.B8	BD Biosciences	566548	488	655	695/40
CD117	PE	YB5.B8	Invitrogen	12-1179-42	488	556	585/42
CD133/1	PE	AC133	Miltenyi Biotec	130-080-801	488	556	585/42
CD133	PE	W6B3C1	BD Biosciences	566593	488	556	585/42
CD133	BV510	W6B3C1	BD Biosciences	747644	405	502	530/30
CD146	V450	P1H12	BD Biosciences	562136	405	-	450/40
CD166	BV421	3A6	BD Biosciences	562936	405	-	450/40
CD271	PE	C40-1457	BD Biosciences	557196	488	556	585/42
CD309	Alexa Fluor® 647	89106	BD Biosciences	560495	633	-	660/20
CD309	PE	Avas12a1	Invitrogen	12-5821-82	488	556	585/42
HLA-DR	APC-Cy™7	L243	BD Biosciences	335831	633	735	780/60
Troponin I	Alexa Fluor® 647	C5	BD Biosciences	564409	633	-	660/20
CD34	FITC	581	Beckman Coulter	A07718	488	502	530/30
CD117	PE	104D2D1			488	556	585/42
CD45	ECD	J33			488	610	616/23
Isotype controls							
Mouse IgG1, κ	APC	MOPC-21	BD Biosciences	550854	488		660/20
Mouse IgG1, γ	PE	X56	BD Biosciences	340270	488	556	585/42
Mouse IgG2b, κ	PE	27-35	BD Biosciences	556656	488	556	585/42

Примітка: * – параметри дзеркал та фільтрів для проточного цитометра BD FACSAria.