

МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ  
БУКОВИНСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

КИРИК ВІТАЛІЙ МИХАЙЛОВИЧ



УДК 616-092.18:612.683

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

**Реферат**

дисертації на здобуття наукового ступеня  
доктора медичних наук

Чернівці - 2023

Дисертацією є рукопис.

Роботу виконано в Інституті генетичної та регенеративної медицини ДУ "Національний науковий центр "Інститут кардіології, клінічної та регенеративної медицини імені академіка М. Д. Стражеска Національної академії медичних наук України"

**Офіційні опоненти:**

доктор медичних наук, професор **Хара Марія Романівна**, Тернопільський національний медичний університет імені І. Я. Горбачевського Міністерства охорони здоров'я України, професор кафедри патологічної фізіології

доктор медичних наук, професор, академік Національної академії медичних наук України, член-кореспондент Національної академії наук України **Тронько Микола Дмитрович**, ДУ "Інститут ендокринології та обміну речовин імені В. П. Комісаренка Національної академії медичних наук України", директор

доктор медичних наук, професор **Досенко Віктор Євгенович**, Інститут фізіології імені О. О. Богомольця Національної академії наук України, завідувач відділу загальної та молекулярної патофізіології

Захист відбудеться "14" лютого 2024 року о 10-ій годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 76.600.02 Буковинського державного медичного університету за адресою: 58002, м. Чернівці, Театральна площа, 2.

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці Буковинського державного медичного університету за адресою: 58001, м. Чернівці, вул. Богомольця, 2.

Учений секретар докторської ради 76.600.02 

Сніжана СОКОЛЬНИК

## ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

**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 (Stoltz J. et al., 2015; Ntege E. et al., 2020; Poliwoda S. et al., 2022).

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 – ММСК). 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 (Toyserkani N. et al., 2017; Sakai Y. et al., 2021; Yamaguchi S. et al., 2022).

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 (Oliveira M. et al., 2015; Wu M. et al., 2018).

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 тканиноспецифічних стовбурових клітин серця (cardiac-derived stem cells – CSCs) (Cambria E. et al., 2017).

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 (Liotta F. et al., 2018; Chambers S. et al., 2021).

Одними з головних труднощів при регенерації тканин є забезпечення виживання трансплантованих клітин у місці їх застосування та функціонування, особливо з урахуванням 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 ефективно проліферації, диференціювання та трофіки завдяки формуванню судинної мережі (Nicolas J. et al., 2020; Kouroupis D. et al., 2021).

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 (Kumari R. et al., 2021).

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 і від особливостей технологічного процесу їх виділення (Guadix J. et al., 2019).

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 лабораторії клітинних та тканинних культур відділу клітинних та тканинних технологій 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); проекту GP/F44/057 "Характеристика субпопуляцій мультипотентних клітин плаценти для потреб регенеративної медицини" по гранту Президента України для підтримки наукових досліджень молодих учених; проектів № 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; проекту № 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 мікромаси 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 мікромаси 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 мікромаси 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 та встановлено механізми таких позитивних ефектів.

Вперше встановлено, що змодельована дисфункція тканинної ніші стовбурових клітин погіршує морфофункціональні характеристики ММСК жирової тканини, збільшуючи удвічі час подвоєння популяції, знижуючи потенціал до колонієутворення та остеогенного диференціювання, а також посилюючи адипогенез в культурах *in vitro*.

Вперше продемонстровано вплив субстратів росту Matrigel та фібронектину на посилену експресію специфічних маркерів ендотеліальними прогеніторними клітинами з аорти мишей 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 одержаних результатів 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 дозволяють 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 дослідження та публікації. Дослідження тривимірних культур ММСК 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. Світін) 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 при виконанні 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 гериатрії" (Київ, 2011 р.), 4<sup>th</sup> 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 3<sup>rd</sup> Ukrainian Congress for Cell Biology (Ялта, 2012 р.), міні-симпозіум "День стовбурової клітини" (Харків, 2012 р.), ISSCR 10<sup>th</sup> 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.), 3<sup>rd</sup> 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 13<sup>th</sup> 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 кватилів Q1-Q2, та 3 – у виданнях кватилію 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.

**Структура та обсяг дисертації.** Дисертація написана українською мовою на 400 сторінках тексту, із них основного тексту – 313 сторінок, та складається із вступу, огляду літератури, матеріалів і методів дослідження, чотирьох розділів власних досліджень, аналізу та узагальнення результатів, висновків. Робота ілюстрована 120 рисунками і 11 таблицями. Список цитованої літератури налічує 416 джерел.

## ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

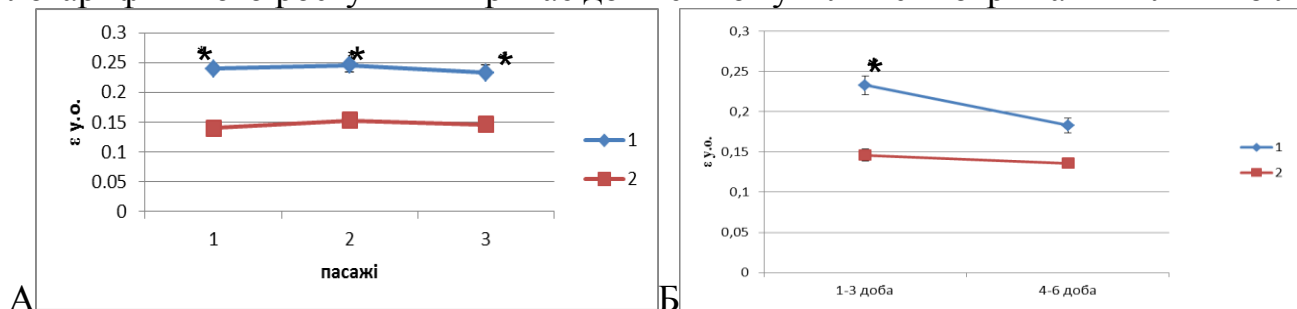
**Матеріал і методи дослідження.** Експериментальні дослідження проведено з використанням молодих (2-5 міс), старих (14 міс) і новонароджених мишей ліній FVB "дикого типу" (n = 211), CBA/Ca (n = 51) та FVB-Cg-Tg(GFP)5Nagy/J (n = 128), трансгенних за геном зеленого флуоресцентного білка GFP. Джерелом ММСК був кістковий мозок, підшкірна та вісцеральна жирова тканина, а також плацента мишей. Ендотеліальні прогенітори виділяли з аорти, кардіальні – з міокарда новонароджених та дорослих тварин. Плаценту людини (n = 8) отримували в умовах операційної після операції кесаревого розтину на 39-41 тиж. вагітності в пацієток віком 23-36 років за інформованою згодою. Тканину міокарда (n = 6) отримували в чоловіків віком 64-72 р. з фрагментів, що підлягають резекції під час операції аорто-коронарного шунтування. Усі дослідження були погоджені комісією з питань етики і проводились з дотриманням вимог вітчизняного та міжнародного законодавства.

Виділені ММСК жирової тканини та плаценти, прогенітори з аорти та міокарда культивували в поживних середовищах з оптимально підібраним складом компонентів та факторів росту. Первинні культури досліджували за потенціалом колонієутворення, проліферативною активністю, визначали питому швидкість приросту популяцій на різних пасажах. Для підтвердження мультипотентного потенціалу стовбурових клітин в остеогенному, адипогенному та хондрогенному напрямках проводили спрямоване диференціювання за допомогою факторів індукції, яке підтверджували специфічним забарвленням на продукцію солей кальцію, ліпідів або протеогліканів, відповідно. Для культивування ендотеліальних прогеніторів використовували флакони, покриті фібронектином та матриксом Matrigel; для кардіальних стовбурових клітин – фібронектином та полі-Д-лізином. Тривимірне культивування ММСК жирової тканини з додатковим спрямованим диференціюванням в остеогенному напрямі проводили в культурі мікрмаси та в гідрогелі на основі карбомеру 974Р. Мультипараметричне імунофенотипування культур проводили методом лазерної проточної цитометрії з використанням клітинного сортера BD FACSAria, а також за допомогою імуноцитохімічного дослідження з конфокальною скануючою мікроскопією. Ультраструктурні дослідження клітин проводили методом електронної мікроскопії.

Для оцінки регенеративних ефектів клітинної терапії на моделі пошкодження трубчатих кісток у мишей виконували трансплантацію культур мікрмаси ММСК жирової тканини, у порівнянні з мікрмасами, спрямовано диференційованими в остеогенному напрямі; на моделі критичної ішемії кінцівок локально вводили ММСК жирової тканини або ендотеліальні прогенітори, заселені в карбомерний гідрогель; на моделі ізопротеренол-індукованої кардіоміопатії в/в трансплантували ММСК плаценти людини. Для моделювання умов пошкодження ніші стовбурових клітин використана модель оваріоектомії у мишей різного віку та проведено порівняння морфологічних показників жирової тканини, проліферативної активності, імунофенотипу та потенціалу до спрямованого диференціювання ММСК жирової тканини. Для оцінки морфометричних показників регенерації використовували гістологічне та імуногістохімічне дослідження кісток, м'язів, серця; для функціональних показників міокарда – електрокардіографію; рівень перфузії тканин вимірювали за допомогою лазерної доплерівської флоуметрії.

У клінічному дослідженні 8 пацієнтам з ішемічною кардіоміопатією та серцевою недостатністю III-IV функціонального класу під час хірургічної ревазуляризації проводили інтраміокардіальну трансплантацію ММСК плаценти людини з оцінкою фракції викиду, кінцево-систоличного і кінцево-діастолічного об'ємів та регіонарної скоротливості міокарда методом speckle-tracking-ехокардіографії, а також якості життя за опитувальниками MLHFQ та HeartQoL. Статистичний аналіз результатів проводили за допомогою методів параметричної (t-критерій Стьюдента) та непараметричної (U-критерій Вілкоксона-Манна-Уїтні) статистики.

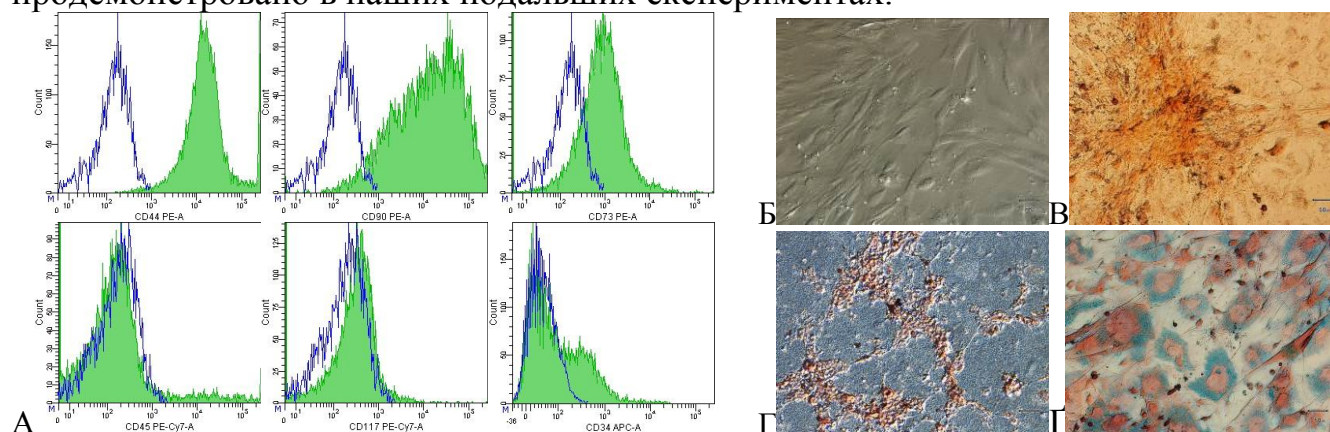
**Результати дослідження та їх обговорення.** Для підтвердження належних характеристик ММСК, які були використані в подальших дослідженнях, виділені клітини з жирової тканини було проаналізовано за параметрами росту в культурі, морфологією, імунофенотипом та потенціалом до спрямованого диференціювання. Культура ММСК жирової тканини складалась з клітин видовженої форми, які утворювали моношар. Показник ефективності клонування становив 0,0035 %, в той час як для кісткового мозку – 0,0025 %. Середня кількість колоній для підшкірної жирової тканини становила  $274,3 \pm 12,1$  CFU, а для вісцеральної –  $597,5 \pm 18,3$  в перерахунку на  $10^6$  висаджених ядровмісних клітин. 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 клітинами кісткового мозку (рис. 1). В проміжку між 4-ю та 6-ю добами в межах кожного пасажу достовірної різниці між питомою швидкістю приросту кількості ММСК різного походження не виявлено. 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.



**Рис. 1** – Питома швидкість приросту популяції на ранніх строках досягнення конфлюентності (А) та динаміка зміни питомої швидкості приросту в межах 3-го пасажу (Б) культур клітин, ум. од. Примітки: \* –  $p < 0,05$ , ММСК жирової тканини (1) в порівнянні з ММСК кісткового мозку (2).

Як обов'язковий етап підтвердження мінімальних критеріїв ММСК, було визначено імунофенотип досліджуваних культур. На відміну від кісткового мозку, для ММСК з жирової тканини за даними проточної цитометрії 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, в порівнянні з ММСК кісткового мозку, рівень експресії CD73 дещо нижчий –  $58,0 \pm 12,0$  % (рис. 2 А). В динаміці пасажування в культурах ММСК з 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. 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.



**Рис. 2** – Підтвердження критеріїв відповідності ММСК жирової тканини. А – гістограми експресії маркерів CD44, CD90, CD73, CD45, CD117 і CD34 за даними проточної цитометрії, 2-й пасаж: контур – фоновий рівень флюоресценції клітин (ізотип-контроль), заливка – рівень флюоресценції в зразку з додаванням моноклональних антитіл. Мікрофото цитопрепаратів нативної культури ММСК в моношарі (Б) та спрямовано диференційованої в остеогенному (В), адипогенному (Г) і хондрогенному (Г) напрямках. Світлова мікроскопія, забарвлення Alizarin Red S (В), Oil Red O (Г) та Alcian Blue + Safranin O (Г); масштабна шкала – 50 мкм.

Також для досліджуваних ММСК продемонстровано можливість спрямованого остеогенного, адипогенного та хондрогенного диференціювання, що було підтверджено специфічним забарвленням на солі кальцію, ліпіди та протеоглікани, відповідно (рис. 2 Б-Г). Додатково була розроблена технологія поетапного остеогенного диференціювання ММСК з попередньою хондрогенною індукцією, що частково відтворює умови закладки кісткової тканини в ембріогенезі.

Отже, на початковому етапі за морфологічними характеристиками, експресією поверхневих маркерів та потенціалом до спрямованого диференціювання було підтверджено відповідність отриманих культур стромальних клітин з жирової тканини мишей мінімальним критеріям ММСК Міжнародного товариства з клітинної терапії. На основі аналізу відносної швидкості приросту популяції на ранніх та пізніх строках досягнення конфлюентності встановлено, що клітини жирової тканини мають кращі показники експансії в динаміці, що підтверджує переваги їх використання для подальшого безпосереднього введення, спрямованого диференціювання або створення тривимірних культур. Додатковою значною перевагою цих ММСК є висока життєздатність після розморожування – у нашому дослідженні при застосуванні 10 % DMSO показник життєздатності розморожених після кріоконсервування клітин становив  $95,2 \pm 1,8$  %, що досить важливо для тривалого зберігання клітинних продуктів у кріобанках.



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. 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.

У наших дослідженнях було розроблено технології вирощування ММСК в об'ємних самоорганізованих агрегатах мікромаси та підібрано оптимальну кількість клітин для формування тривимірної мікромаси необхідного діаметра (0,8-1 мм) за 12-14 днів, що склала  $1-1,5 \times 10^6$  на пробірку, а також продемонстровано можливість її ефективного спрямованого диференціювання в остеогенному напрямі. Це було підтверджено за допомогою специфічного забарвлення отриманих мікромас на солі кальцію з використанням барвника Alizarin Red S. 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 спеціалізацію клітин.

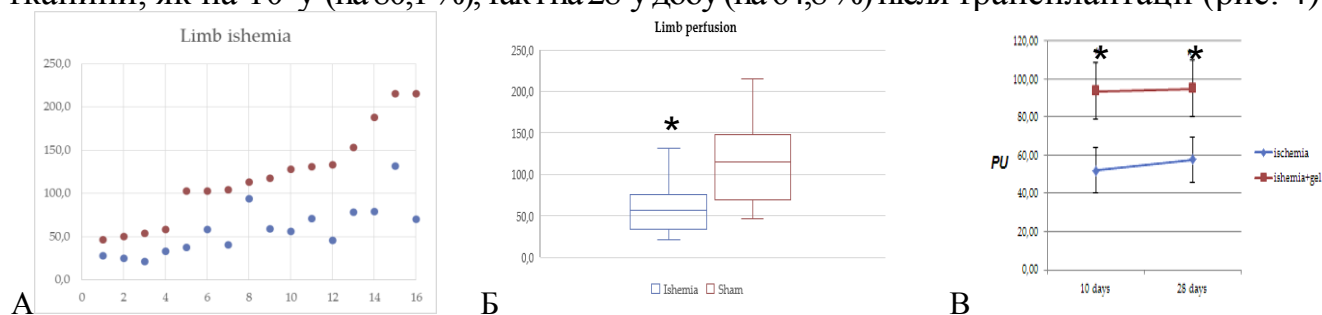
В подальших експериментах *in vivo* продемонстровано, що 3D трансплантати ММСК з жирової тканини, культивованих методом мікромаси, здатні покращувати регенерацію кісткової тканини на моделі пошкодження трубчатих кісток у мишей. При цьому трансплантати спрямовано диференційовані в остеогенному напрямі, забезпечують кращі морфологічні показники її відновлення, у порівнянні із культурою мікромаси без попереднього диференціювання (рис. 3). Зокрема, діаметр зони регенерації діяфізу 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 ( $p \leq 0,05$ ). 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.



**Рис. 3** – Фото стегнових кісток мишей через 21 добу після пошкодження (А – природна регенерація; Б – застосування культури мікромаси ММСК жирової тканини) та мікрофото гістологічного препарату стегнової кістки після трансплантації мікромаси ММСК жирової тканини, диференційованої в остеогенному напрямі (В). Світлова мікроскопія, забарвлення гематоксилін-еозином, зб.  $\times 200$ .

Окрім культури мікромаси, в якій клітини самоорганізуються в тривимірну структуру, також було досліджено ефективність заселення ММСК з жирової тканини у сформовані гідрогельні носії. 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. Було розроблено технологію виготовлення об'ємного трансплантату на основі карбомеру 974Р та агарози в оригінальних пропорціях та підібрані оптимальні умови формування 3D-культур. Встановлено, що при нанесенні  $4 \times 10^4$  клітин на гідрогель об'ємом  $400 \text{ мм}^3$  через 2 тижні культивування лише поодинокі клітини проникали на глибину до 1,5 мм від поверхні. На відміну від регідратаційного способу, при ін'єкції  $4 \times 10^4$  або  $2 \times 10^5$  клітин у гідрогель на глибину 1-2 мм через 2 тижні культивування клітини розташовувались дифузно у всій товщі гідрогелю, набували видовженої форми, але не контактували між собою. При ін'єкції  $1 \times 10^6$  клітин у гідрогель на глибину 2-3 мм через 2 тижні культивування клітини набували полігональної форми завдяки численним відросткам, якими вони контактували між собою, формуючи мережу. Як і для культур мікромаси, встановлено, що ММСК з жирової тканини зберігають потенціал спрямованого диференціювання в умовах об'ємного тривимірного культивування в гідрогелі, що також було підтверджено специфічним забарвленням Alizarin Red S на фосфати кальцію та ВСІР/NBT на лужну фосфатазу.

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. На моделі критичної ішемії кінцівок встановлено регенеративний потенціал імплантованих гідрогелів, заселених ММСК, що проявлялось покращенням перфузії м'язів за результатами лазерної доплерівської флоуметрії та відновленням морфології тканин за даними гістологічного дослідження. 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. 4).



**Рис. 4** – Рівень перфузії м'язів гомілок мишей за даними лазерної доплерівської флоуметрії (ум. од.) через 2 тижні після моделювання критичної ішемії: А – значення показника псевдооперованих (червоний колір) та ішемізованих (синій колір) кінцівок для кожної з тварин; Б – середні значення рівнів перфузії для груп порівняння; В – динаміка рівнів перфузії в мишей із змодельованою критичною ішемією та трансплантацією гідрогелів, заселених ММСК жирової тканини, на 10-у і 28-у добу в порівнянні з тваринами без трансплантації. Примітка: \* –  $p \leq 0,05$ .

Одним з перспективних підходів в реконструктивній хірургії для регенерації пошкоджень м'яких тканин та загоєння ран може бути додавання до ліпоаспірату клітин стромально-васкулярної фракції або культивованих ММСК з жирової тканини, як варіант клітинно-опосередкованого ліпотрансферу. Можна припустити, що при спільній трансплантації ММСК мають забезпечувати 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 можливості 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.

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 пересаженої тканини. 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, підбір оптимальної дози клітин під об'єм трансплантату тощо.

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. Вдосконалення технології культур мікромаси 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.

В підсумку цього етапу дослідження запропоновано новітні протоколи тривимірного культивування ММСК з жирової тканини в культурі мікромаси 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.

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 їхньої доклінічної ефективності на моделях пошкодження нервової тканини. Зокрема, у наших спільних дослідженнях з Tsurukov 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. 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 менше 2%. Експресія маркера гемопоезу та ангиогенезу CD34 на ранніх пасажах коливалась в межах 8-12%. Після стереотаксичної трансплантації 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. 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.

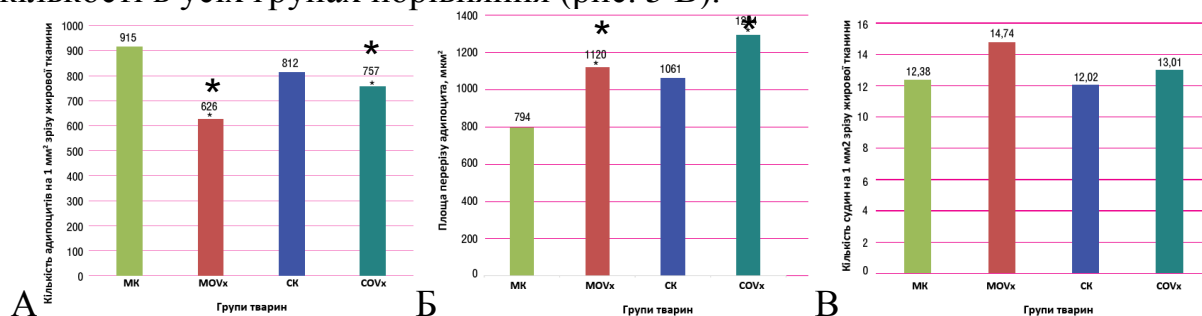
У наших спільних дослідженнях з Rubtsov V., Govbakh I. та ін. було оцінено вплив ММСК з жирової тканини з мультипотентним потенціалом та високою експресією мезенхімальних маркерів CD44, CD73, CD90, CD105, на моторну активність та функціональний стан сідничного нерва трансгенних мишей з моделлю демієлінізуючої моторно-сенсорної периферичної нейропатії. З 2-го тижня після трансплантації тварини здійснили на 20% менше зісковзувань та витратили на 11% менше часу при проходженні тесту "балансування на перекладині" в порівнянні з мишами без введення клітин. Тобто, трансплантація ММСК з жирової тканини, які відповідають належним критеріям якості та відповідності, сприяє покращенню функціональних та морфологічних показників у тварин з патологією центральної та периферичної нервової системи, що може бути пов'язано як із заміщенням ушкоджених судинних структур завдяки диференціюванню та інтеграції трансплантованих клітин, так і з виробленими гуморальними біоактивними чинниками, здатними модулювати регенерацію.

У наших спільних дослідженнях з Golovynska Iu. та ін. було оцінено характеристики культур ММСК кісткового мозку, тестованих за критеріями відповідності, під впливом на рецептори, залучені в механізми мезенхімально-епітеліального переходу. Встановлено, що активація рецептора EGF індукує появу морфологічних ознак епітеліального фенотипу. EGF і тейхоева кислота викликають посилення синтезу  $\alpha$ -Мус і глікозаміногліканів у цитоплазмі клітин, демонструючи непрямі метаболічні ознаки підвищення їхнього регенеративного потенціалу. Результати свідчать про можливість цілеспрямованої модуляції функцій стовбурових клітин під впливом певних агентів для посилення їхніх регенеративних ефектів або запобігання злякисній трансформації ще на етапі культури *in vitro*.



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. Оскільки більшість патологічних станів, при яких виникає потреба в клітинній терапії, зустрічається переважно в людей похилого віку, беззаперечною стає актуальність встановлення критеріїв біологічної безпеки аутологічних ММСК жирової тканини, отриманих в умовах менопаузи та постменопаузальному періоді, які супроводжуються дефіцитом естрогенів. Тому завданням 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.

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. 5 А). Так, у молодих оваріоектомованих мишей кількість адипоцитів на одиницю площі зрізу мікропрепарату ( $626,0 \pm 74,1$  клітин/ $\text{мм}^2$ ) достовірно була меншою ( $p < 0,05$ ) відповідно до групи порівняння без оваріоектомії ( $915,0 \pm 72,3$  клітин/ $\text{мм}^2$ ). У молодих оваріоектомованих мишей середня площа адипоцитів становила  $1112,0 \pm 51,0$   $\text{мкм}^2$  проти показника контрольної групи  $794,0 \pm 37,2$   $\text{мкм}^2$  ( $p < 0,001$ ). У старих оваріоектомованих тварин на тлі відсутності зменшення кількості адипоцитів також відмічали достовірне збільшення їхньої середньої площі, порівнюючи з контрольною групою відповідного віку (рис. 5 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/ $\text{мм}^2$ ) в порівнянні з контрольною групою ( $812,0 \pm 109,1$  клітин/ $\text{мм}^2$ ). Достовірно більшою ( $p < 0,001$ ) була середня площа адипоцитів в групі старих оваріоектомованих мишей ( $1294,0 \pm 58,7$   $\text{мкм}^2$ ) у порівнянні з показником контрольної групи відповідного віку ( $1061,0 \pm 56,1$   $\text{мкм}^2$ ). Водночас, морфометричний аналіз судин показав відсутність достовірних змін в їх кількості в усіх групах порівняння (рис. 5 В).

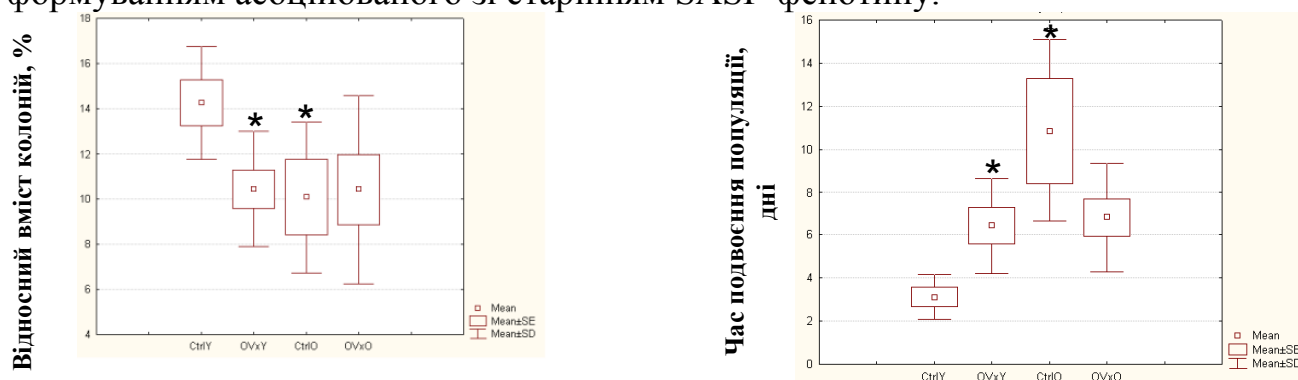


**Рис. 5** – Гістограми середньої кількості адипоцитів на 1  $\text{мм}^2$  площі зрізу жирової тканини (А), середньої площі перерізу адипоцита (Б) та кількості судин на 1  $\text{мм}^2$  зрізу (В) у гістологічних препаратах жирової тканини мишей. Столпчики за порядком: МК – молоді тварини, контрольна 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. При цьому збільшення адипоцитів у розмірах, ймовірно, спричинює збільшення маси тіла тварин. Так, маса молодих оваріоектомованих мишей ( $25,0 \pm 1,6$  г) вірогідно була більшою ( $p < 0,0001$ ), ніж маса тварин контрольної групи ( $22,5 \pm 1,2$  г). Це є додатковим підтвердженням залучення жирової тканини в патогенетичні механізми метаболічного синдрому, одним з клінічних проявів якого є ожиріння.

При дослідженні культур ММСК з жирової тканини не було виявлено статистично значущих відмінностей у експресії типових поверхневих маркерів (CD73, CD90 та CD44) між псевдооперованими та оваріоектомованими мишами обох вікових груп, а також відмінностей між оваріоектомованими молодими і старими тваринами. За допомогою імунофенотипування методом проточної цитометрії в клітин першого пасажу всіх груп 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 наростала та відповідала типовому для ММСК фенотипу. При цьому в старих мишей більший відсоток клітин експресував маркер CD44 на більш високому рівні, ніж у молодих. Виявлені факти вказують на те, що імунофенотип і, ймовірно, кількість ММСК у жировій тканині суттєво не змінюються з віком, що підтверджено в дослідженнях як у людей, так і тварин, опублікованих іншими авторами.

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 (рис. 6). 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.



**Рис. 6** – Гістограми ефективності колонієутворення (А) та часу подвоєння популяції ММСК жирової тканини в піддослідних мишей. Блоки за порядком: CtrlY – контроль, молоді; OVxY – оваріоектомія, молоді; CtrlO – контроль, старі; OVxO – оваріоектомія, старі. \* –  $p < 0,05$ , 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. У культурах ММСК від тварин з оваріоектомією спостерігали посилення адипогенного диференціювання *in vitro* в порівнянні з контрольною групою відповідного віку, що може бути причиною активації адипогенезу *in vivo* та зафіксованого збільшення маси тіла після оваріоектомії в молодих мишей. Водночас, оваріоектомія в молодому віці призводить до зниження остеогенного потенціалу ММСК з жирової тканини в мишей, у порівнянні з ММСК з жирової тканини контрольних тварин відповідного віку, що цілком підтверджує провідну роль естрогенів у остеогенному комітуванні ММСК (табл. 1).

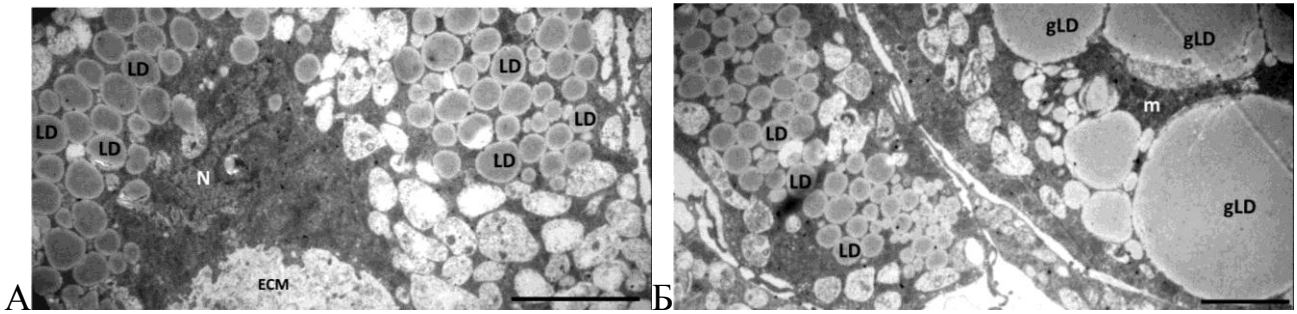
**Таблиця 1** – Показники оптичного поглинання середовища після фарбування барвником Oil Red O (А) або Alizarin Red S (О) культури ММСК жирової тканини, спрямовано диференційованих в адипогенному (А) або остеогенному (О) напрямках, від нормальних (К) або оваріоектомованих (OVx) молодих і старих мишей, ум. од.

	Молоді				Старі			
	К		OVx		К		OVx	
	PC	PC+ФД	PC	PC+ФД	PC	PC+ФД	PC	PC+ФД
<b>А</b>	0,096 ± 0,10 (n = 6)	0,148 ± 0,10* (n = 6)	0,128 ± 0,12 (n=14)	0,287 ± 0,10* <sup>#</sup> (n = 8)	0,132 ± 0,04 (n = 8)	0,232 ± 0,10* (n = 8)	0,114 ± 0,01 (n=8)	0,183 ± 0,01* (n = 12)
<b>О</b>	0,35 ± 0,10 (n = 4)	0,59 ± 0,14* (n = 4)	0,29 ± 0,06 (n = 8)	0,37 ± 0,09* <sup>#</sup> (n = 8)	0,26 ± 0,07 (n = 7)	0,38 ± 0,07* <sup>α</sup> (n = 7)	0,28 ± 0,09 (n = 8)	0,39 ± 0,09* <sup>α</sup> (n = 8)

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

Ми можемо 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 спостерігали в цитоплазмі ММСК з жирової тканини з групи старих тварин, що вказує на їхню низьку білково-синтетичну активність. Також відмічали збільшення кількості крапель ліпідів у цитоплазмі як у групі молодих, так і в старих оваріоектомованих мишей, порівнюючи з контрольними тваринами того ж віку (рис. 7).

Результати дослідження дозволяють припустити, що вік донора суттєво впливає на деякі характеристики ММСК з жирової тканини *in vitro*. Оваріоектомія та пов'язаний з нею дефіцит естрогену змінює диференційовальний потенціал ММСК з жирової тканини *in vitro* в молодих мишей, а в процесі старіння активуються певні механізми зниження клоногенної та проліферативної активності стовбурових клітин, що робить їх менш залежними від яєчників.



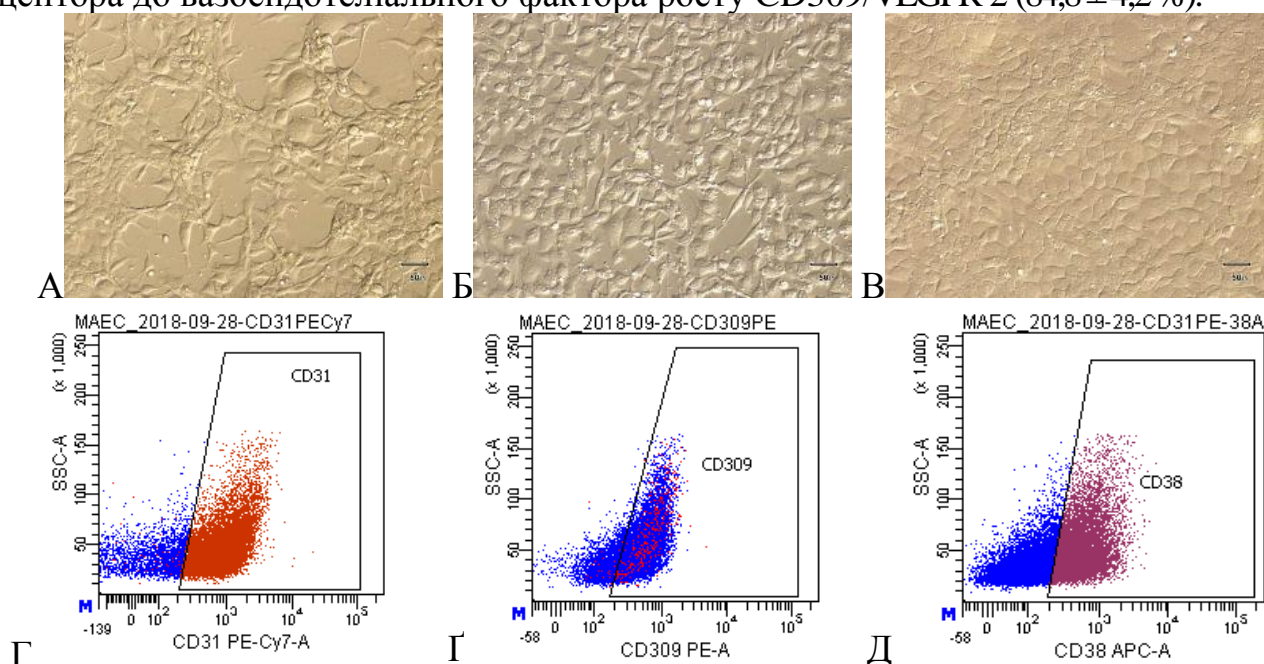
**Рис. 7** – Мікрофото ультраструктури сфероїдів із ММСК жирової тканини молодих (А) і старих (Б) мишей після оваріоектомії (опис в тексті). Електронна мікроскопія, масштабні шкали – 2 мкм. Примітки: LD – ліпідні краплі, gLD – гігантські ліпідні краплі, ECM – позаклітинний матрикс, m – мітохондрії, N – ядра.

Моделювання дисфункції ніші дозволило 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.

Виявлені у 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. Можна стверджувати, що вік донора суттєво впливає 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.

Отже, наукова новизна цього фрагменту роботи полягає в комплексній доклінічній оцінці критеріїв якості, безпеки та ефективності ММСК жирової тканини в умовах фізіологічного та індукованого старіння, які можуть відрізнитись за здатністю до проліферації та мультилінійного диференціювання *in vitro* і реалізовувати цей атипичний потенціал вже *in vivo*. Практичне значення полягає в тому, що встановлення на доклінічному етапі ключових маркерів можливої зміни проліферативних та диференціальних властивостей культивованих клітин стане підґрунтям для розробки стандартизованих протоколів оцінки якості клітинних препаратів, призначених для клінічного застосування. Отримані нові дані щодо ідентифікації ключових маркерів фізіологічного та індукованого старіння стовбурових клітин та їхніх ніш на етапі доклінічної оцінки якості біотехнологічних препаратів матимуть важливе прикладне значення для обґрунтування доцільності їх зберігання в криобанках, можливого їх використання для скринінгу сенотерапевтиків та для перспектив подальшого клінічного застосування з позицій персоналізованої терапії багатьох вік-асоційованих захворювань.

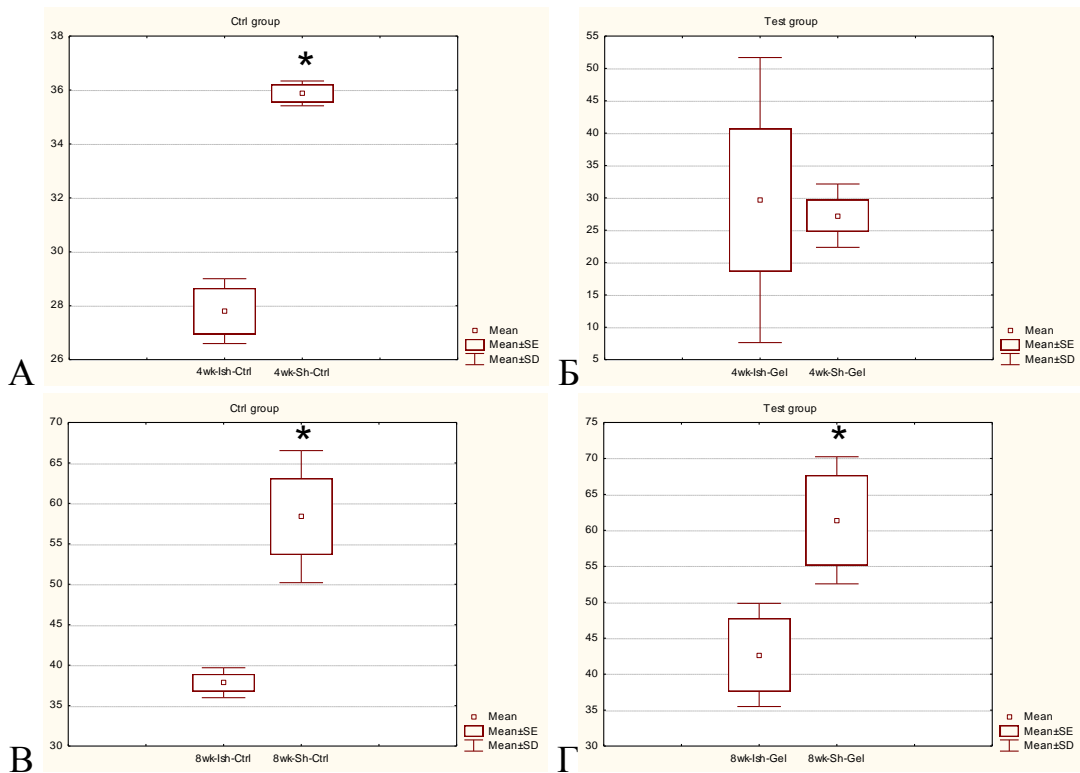
На наступному етапі було розроблено методи виділення ендотеліальних прогеніторних клітин з аорти миші (mouse aortic endothelial cell – MAEC), які мають переваги над відомими раніше, зокрема, додатково видаляли зовнішні шари аорти та готували лише очищену інтиму для перенесення на покриту фібронектином культуральну поверхню, що дозволяє зменшити контамінацію стромальними елементами. За морфологічними характеристиками та експресією специфічних поверхневих маркерів отримані культури клітин з аорти миші відповідали ендотеліальному фенотипу (рис. 8). При імунофенотипуванні методом проточної цитометрії культур MAEC 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/VEGFR-2 ( $84,8 \pm 4,2 \%$ ).



**Рис. 8** – Мікрофото культур ендотеліальних прогеніторних клітин з аорти миші на пасажі 1: А – на флаконах з підвищеною адгезією Cell+; Б – на матриці Matrigel; В – на фібронектині. Світлова мікроскопія, фазовий контраст, масштабна шкала – 50 мкм. Гістограми експресії маркерів CD31 (Г), CD309 (І), CD38 (Д) у культурі MAEC за даними проточної цитометрії, пасаж 3. Програмне забезпечення BD FACSDiva 6.1.2.

За допомогою інструментальних та гістологічних методів 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 через 2 та 4 тижні (рис. 9). У біоптатах трансплантованих гідрогелів, заселених MAEC, в ранні періоди після трансплантації процеси васкуляризації характеризуються активним утворенням нових судин, що за своєю будовою нагадують артерії і вени. Також в гелі присутні клітини з базофільними округлими ядрами без проявів апоптозу, які мають ознаки високої функціональної активності, що характеризується еухроматинізацією і наявністю декількох ядерць у ядрі.





**Рис. 9** – Гістограми рівнів перфузії м'язів гомілок за даними лазерної доплерівської флоуметрії ішемізованої (ліві блоки) та псеудооперованої (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 псеудооперованою кінцівкою,  $p < 0,05$ .

Проте, через 8 тижнів після трансплантації гідрогелів, заселених МАЕС, ця тенденція не зберігалась, що може свідчити про лімітований в часі регенеративний потенціал застосованої терапевтичної дози клітин. У більшості ядер міоцитів відмічено збільшення кількості еухроматину з появою аномально гіпертрофованих ядер. При цьому в ендомізії присутні поодинокі волокна сполучної тканини, що свідчить про стабілізацію фіброзу. 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.

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. 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.

Для оцінки перспектив застосування тканинспецифічних стовбурових клітин було розроблено методики отримання резидентних прогеніторів міокарда – cardiac-derived stem cells (CSCs). Додатково розроблено протокол виділення з синоатріального вузла серця мишей прогеніторів, які можуть бути використані для дослідження механізмів збудливості та провідності міокарда. Продемонстровано, що для формування кардіосфер з первинних культур експлантів біоптатів серця необхідною умовою є наявність кардіотрофіну, як ростового фактора, та послідовна зміна полі-D-лізину і фібронектину, як субстратів росту. 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 додаткове культивування на поверхні з фібронектином. Про високий потенціал інтеграції клітин та збереження їхньої збудливості свідчить поява ритмічної скоротливої активності як у кардіосферах, так і в моношарових культурах під час термінального диференціювання.

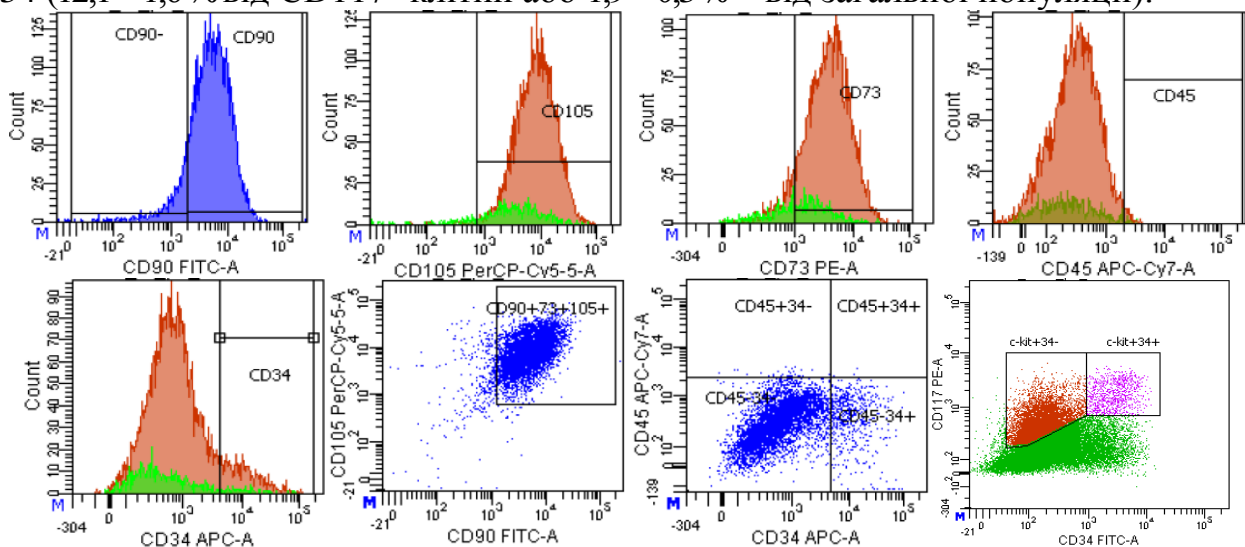
Було порівняно культури кардіальних прогеніторів з міокарда новонароджених та дорослих мишей, у яких відмічено наявність популяції клітин з відносно високими рівнями експресії маркерів CD34 та CD309, причому в прогеніторів зі шлуночків експресія рецептора судинного фактора росту була суттєво вищою ( $12,9 \pm 1,1$  %), ніж з передсердь ( $4,9 \pm 0,6$  %). Окрім того, було відмічено присутність мінорної популяції клітин ( $3,7 \pm 1,3$  %), які за фенотипом CD44<sup>+</sup>117<sup>+</sup> можуть належати до кардіальних клітин-попередників. При цьому встановлено досить високу експресію в культурі маркера CD34 (до 47,6 %), хоча спочатку популяція клітин з фенотипом ендотеліальних попередників CD34<sup>+</sup>31<sup>+</sup> на першому пасажі залишалась низькою (до 2,4 %). 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 –  $69,8 \pm 5,2$  %.

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<sup>+</sup>117<sup>+</sup> 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.

Важливо відмітити, 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 відносний вміст таких клітин є більшим у передсердях, ніж у шлуночках. Окрім того, культура клітин від дорослих мишей досягала конфлуентного стану суттєво повільніше та мала гіршу скоротливу активність, у порівнянні з культурою прогеніторів від новонароджених мишей. Тобто, використання прогеніторних клітин міокарда з ділянки вушок передсердь, отриманих від донорів більш раннього віку, буде мати кращу ефективність.

Експерименти на мишах були успішно трансльовані на біоптатах серця від людини, унаслідок чого розроблено технології виділення та культивування тканинспецифічних прогеніторних клітин з міокарда, які експресували специфічні маркери CD90, CD105, CD117, 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.

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. 10). Як і для клітин з міокарда мишей, виявлено присутність популяції CD34<sup>+</sup> клітин ( $10,6 \pm 2,8$  %). Водночас, відмічали  $16,6 \pm 6,2$  % клітин з експресією кардіального стовбурового маркера CD117 (c-kit), частина з яких одночасно ко-експресували CD34 ( $12,1 \pm 1,6$  % від CD117<sup>+</sup> клітин або  $1,9 \pm 0,3$  % – від загальної популяції).



**Рис. 10** – Гістограми експресії маркерів CD90, CD105, CD73, CD45, CD34, субпопуляцій CD90/CD105/CD73, CD34/CD45 та CD34/CD117 у культурі клітин з кардіосфер людини за даними проточної цитометрії.

За результатами імуноцитохімічного дослідження в отриманих культурах термінально диференційованих кардіальних стовбурових клітин з вухка передсердя, стінки лівого шлуночка та трабекулярної зони серця людини продемонстровано присутність експресії ключового маркера кардіоміоцитів Тропонін I, а також високий рівень експресії ендотеліального маркера CD31.

Отже, встановлено, що за імунофенотипічними характеристиками експресії низки маркерів отримані культури клітин з міокарда відповідають фенотипу тканинспецифічних CSCs. 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. Враховуючи імунофенотип, реалізація регенеративного потенціалу такого типу клітин може відбуватися завдяки заміщенню втрачених кардіоміоцитів та відновленню васкуляризації міокарда.



Для оцінки перспектив клітинної терапії захворювань серця у подальших дослідженнях було розроблено технологію отримання культури стромальних клітин з плаценти мишей та людини, які за імунофенотипічними характеристиками та потенціалом спрямованого диференціювання відповідали мінімальним критеріям ММСК. Важливим виявився факт присутності серед них популяції з експресією ендотеліального маркера CD31, а також рецептора фактору росту стовбурових клітин CD117, що може вказувати на перспективи застосування цих 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<sup>+</sup>CD73<sup>+</sup>CD105<sup>+</sup>HLA-ABC<sup>low</sup>CD34<sup>-</sup>CD45<sup>-</sup>CD133<sup>-</sup>CD14<sup>-</sup>, експресують при цьому віментин, а також містять мінорну популяцію клітин, позитивних на цитокератин 7. Культури були гетерогенними за експресією мезенхімального гладком'язового  $\alpha$ -актину  $\alpha$ SMA (65 %) та епітеліальних цитокератинів СК18 (38 %) і СК19 (31 %). Частка клітин, одночасно позитивних на СК7 та віментин, достовірно зменшувалась з 37,6 % (26,6-49,4 %) на першому до 13,4 % (2,5-31,1 %) на третьому пасажі ( $p < 0,05$ ). 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. При цьому також було розроблено протоколи сортування субпопуляцій гемопоетичних прогеніторів з плаценти та пуповинної крові людини методом проточної цитометрії.

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. У суспензії дисоційованих зразків з тканини міокарда мишей за допомогою проточної цитометрії через 48 год. після трансплантації 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. Це додатково підтверджує виражені імуносупресивні властивості ММСК плаценти, які запобігають маніфестації реакцій відторгнення трансплантата.

Після внутрішньовенної трансплантації плацентарних ММСК мишам з кардіоміопатією спостерігали підвищення метаболічної активності окремих кардіоміоцитів (гіпертрофія ядер), послаблення запального процесу за даними гістологічного дослідження та нормалізацію електрофізіологічної збудливості міокарда. Проте, іноді відмічали посилення синтезу елементів екстрацелюлярного матриксу в інтерстиції міокарда. Через 48 год. після трансплантації кріоконсервованих ММСК плаценти не виявлено периваскулярного набряку,

геморагій і вираженої лімфоцитарної інфільтрації тканини, проте ще зберігались ознаки пошкодження, типові для змодельованої кардіоміопатії. 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. На функціональному рівні за допомогою аналізу електрокардіограм у тварин із змодельованою кардіоміопатією після трансплантації ММСК з плаценти встановлено нормалізацію ритму серця, покращення провідності та зменшення частоти екстрасистол (табл. 2).

**Таблиця 2** – Аналіз параметрів ЕКГ у мишей із змодельованим пошкодженням міокарда, яким трансплантовано ММСК плаценти (n = 6, \* – p < 0,05).

	На початку експерименту	Через 3 тиж після пошкодження	Через 4 тиж після трансплантації клітин
Частота скорочень, уд./хв	411 ± 31	452 ± 41*	433 ± 58
Ширина QRS, сек	0,043 ± 0,006	0,053 ± 0,006*	0,051 ± 0,009

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 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 імунофенотипу ММСК, а також реалізовували мультипотентний потенціал при спрямованому диференціюванні. При цьому використання плацентарних ММСК, мічених GFP, дозволило виявити трансплантовані внутрішньовенно донорські клітини в кровоносних судинах головного мозку мишей, як це було показано і для серця. 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 аlogenні мишачі.

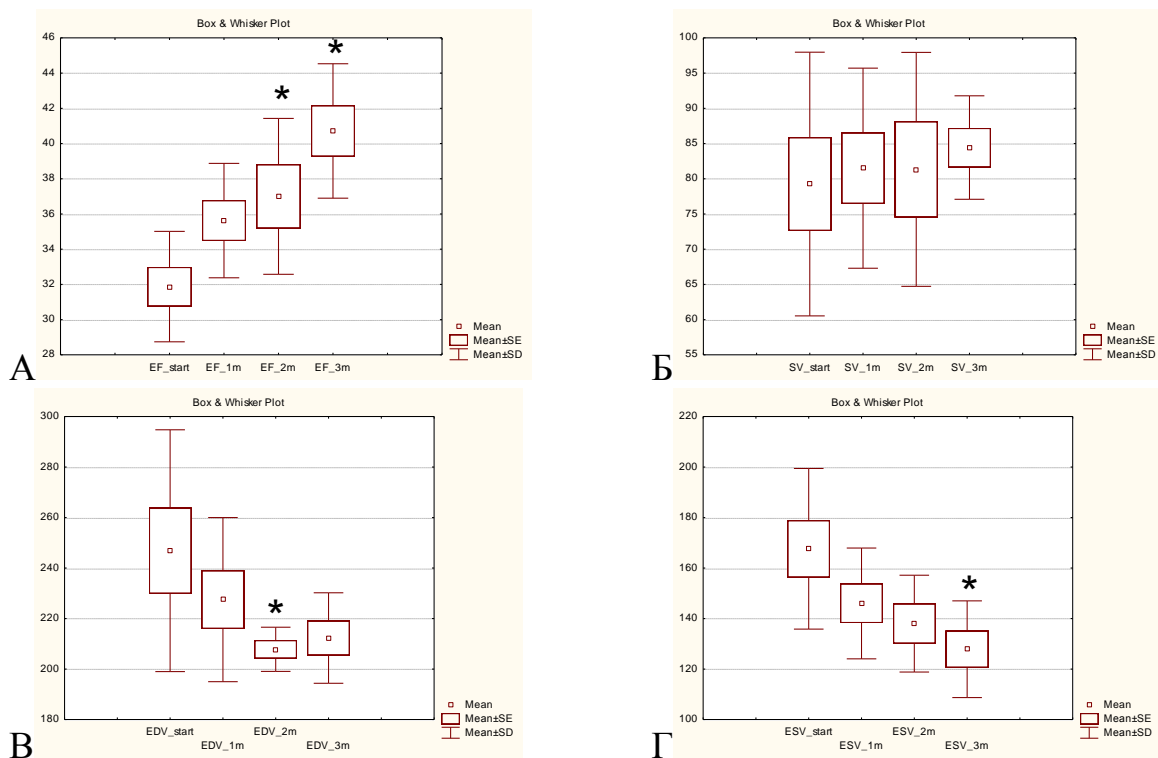
Подібні результати було отримано і на нокаутних мишах  $\alpha 7^{-/-}$ , нейрони яких у головному мозку не експресують нікотинових рецепторів ацетилхоліну nAChR субтипу  $\alpha 7$  та демонструють прозапальний фенотип. Введені внутрішньовенно ММСК з плаценти мишей або пуповини людини з визначеним імунофенотипом 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.

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.

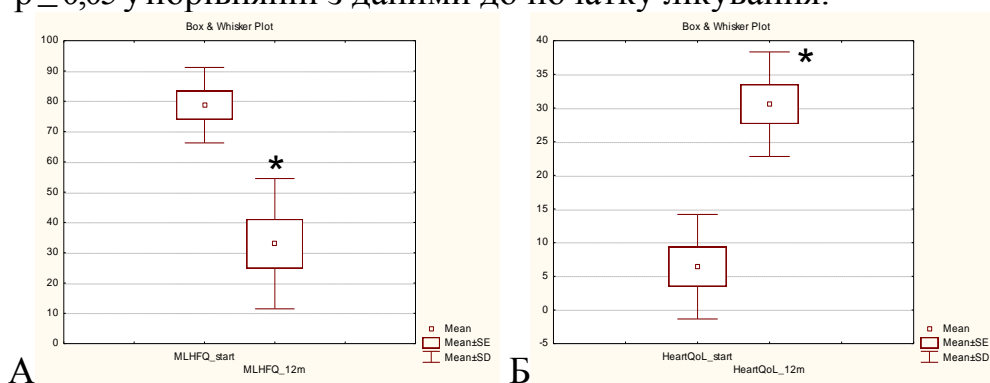
Ще одним з важливих аспектів контролю безпеки новітніх препаратів прогресивної терапії є оцінка онкогенного потенціалу клітинних та тканинних трансплантатів, який, теоретично, може реалізовуватись через злякисну трансформацію клітин донора, або ж їхній вплив на ракові клітини, присутні в організмі реципієнта. 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. 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.

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 випробуваннях на людях. В 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. 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-сistolічним та кінцево-діастолічним об'ємами (рис. 11). 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-сistolічного об'єму ( $130 \pm 8,6$  мл). Також через 12 міс після трансплантації продемонстровано значне покращення якості життя за результатами аналізу даних опитувальників MLHFQ та HeartQoL (рис. 12).

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.



**Рис. 11** – Гістограми динаміки показників фракції викиду лівого шлуночка (А), ударного об'єму (Б), кінцево-діастолічного (В) та кінцево-систолічного (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.



**Рис. 12** – 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.

Механізм терапевтичного впливу досліджуваних стовбурових клітин плаценти залишається суперечливим і, ймовірно, численні їхні ефекти (протизапальні, проангіогенні, трофічні, антифібротичні) комбінуються та потенціюються для відновлення структури та функції серця після ішемічного пошкодження міокарда. Отримані нами результати дозволяють припустити, що застосування стовбурових клітин плаценти може слугувати новою пріоритетною стратегією при клінічних дослідженнях ефективності та безпеки клітинної терапії ішемічної хвороби серця особливо з огляду на парадигму багаторазового проведення клітинної трансплантації.

З огляду на результати власних досліджень можна структурувати наявні доклінічні критерії якості клітинних препаратів, які мають враховуватись на етапі виготовлення цих засобів прогресивної терапії: відповідність, чистота, безпека, життєздатність та ефективність (табл. 3). Відповідність, як ключовий критерій, передбачає детальну характеристику отриманих клітин на належність до певного типу за джерелом, морфофункціональними параметрами, імунофенотипом, біохімічними та/або генотиповими маркерами, потенціалом спрямованого диференціювання.

**Таблиця 3** – Критерії якості соматичних стовбурових клітин та методи їх оцінки.

<b>Критерій</b>	<b>Параметри аналізу</b>	<b>Метод дослідження</b>
<b>Відповідність</b>	Морфологія	Мікроскопія
	Фенотипові маркери	Проточна цитометрія, імуноцитохімія
	Потенціал диференціювання	Цитохімічне забарвлення, імуноцитохімія
	Експресія генів	qPCR
<b>Чистота</b>	Ендотоксини	LAL-тест
	Хімічні домішки	Рідинна хроматографія
<b>Життєздатність</b>	Підрахунок життєздатних клітин	Мікроскопія (Трупан Blue, PI) Проточна цитометрія (7-AAD)
<b>Безпека</b>	Стабільність геному	Каріотипування, FISH, CGH, SNP
	Стерильність	Мікробіологічний аналіз
	Мікоплазма	PCR
	Додаткові віруси	PCR
	Маркери старіння	SA- $\beta$ -gal, AFU, p16INK4a/CDKN2A, SAHF, CBMN cyt, qPCR
	Імуногенність	HLA-типування
	Туморогенність	Трансплантація імунодефіцитним тваринам
<b>Ефективність</b>	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>

Вибір оптимального способу доставки клітин у зону пошкодження та необхідної кратності їх введення є одними з ключових факторів в успішності клітинної терапії. У наших дослідженнях на моделі ізопротеренол-індукованої кардіоміопатії ми використовували системне внутрішньовенне введення ММСК плаценти, з огляду на розмір тварин та технічні обмеження інтраміокардіального введення. 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. Цілком очевидно, що й у лікуванні дефектів м'яких тканин, кісток, суглобів, периферичних нервів саме локальне застосування клітинних та біоінженерних тканинних трансплантатів є пріоритетним.

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. 13).

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; антиапоптогенні 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 їхньої 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 з дотриманням стандартів належної виробничої практики GMP, контролювати морфофункціональні характеристики, життєздатність, імунофенотип та потенціал спрямованого диференціювання культур стовбурових клітин для гарантування належної їх якості.

Зрештою, 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

**Рис. 13** – Вплив параметрів якості та ефективності стовбурових клітин на реалізацію їхнього регенеративного потенціалу.

Успішні багатообіцяючі результати, отримані в доклінічних дослідженнях, мають бути обов'язково підтверджені з позицій безпеки та ефективності за співвідношенням "користь/ризик" у подальших клінічних випробуваннях. Важливо, що клінічні дослідження повинні проводитися відповідно до етичних принципів, які базуються на Гельсінській декларації й відповідають вимогам чинного законодавства. 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. Очікувана ефективність клітинної терапії на пряму 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 (GCP), специфічних для сучасних методів клітинної терапії.

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 їх 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.

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 даних [clinicaltrials.gov](http://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 існуючих методів терапевтичного застосування стовбурових клітин має ґрунтуватися на глибокому розумінні їх 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 їх безпеки та регенеративних ефектів на доклінічному етапі *in vivo*, залежно від типу, походження та диференціовального 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 мікромаси, забезпечують регенерацію пошкодженої кісткової тканини завдяки заміщенню втрачених структур кістки та мають суттєво кращі морфологічні показники її відновлення, в порівнянні із трансплантатами мікромаси 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 сигналінгу 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 псевдооперованою 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 їх 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 ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

### Наукові праці, 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 остеології. 2010; 13(4):36-41. *(Здобувачем проведени виділення та характеристика клітин, інтерпретація 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. Shablii 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 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 та 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 характеристику клітин, інтерпретацію 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 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 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, характеристики та трансплантацію клітин). 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> (Здобувачем проведено фенотипування клітин, оформлення та редагування статті). Індексація в Scopus та WoS, квартиль Q2.
13. Tsupikov O, Kyryk V, Ustylenko 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 результатів). Фахове видання.
14. Tsupikov O, Ustylenko 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 клітин, аналіз отриманих результатів, редагування статті). Індексація в Scopus та WoS, квартиль 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 клітин, інтерпретацію отриманих результатів, редагування статті). Індексація в Scopus та WoS, квартиль Q3.
16. Tsupikov O, Lushnikova I, Ustylenko 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 клітин, інтерпретацію результатів, редагування статті). Фахове видання.
17. Kyryk V, Kuchuk O, Mamchur A, Ustylenko A, Lutsenko T, Tsupikov 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 клітин, статистичний аналіз даних, інтерпретацію отриманих результатів, оформлення статті). Фахове видання.
18. Ustylenko A, Kyryk V, Lutsenko T, Tsupikov 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 оваріоектомії, виділення та характеристику клітин, аналіз 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. 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> *(Здобувачем проведено фенотипування клітин, аналіз та інтерпретацію отриманих результатів, редагування статті). Індексція в Scopus та WoS, квартиль Q2.*
  21. Golovynska I, Kalmukova O, Svitina H, Kyryk V, Shablii V, Senchylo N, Ostrovska G, Dzerzhynskiyi M, Stepanov Yu, Golovynskiyi S, Ohulchanskyi 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 клітин, аналіз та інтерпретацію отриманих результатів, редагування статті). Індексція в Scopus та WoS, квартиль Q2.*
  23. Ivanishev 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 результатів, редагування статті). Фахове видання кат. А, індексація в Scopus, квартиль Q3.*
  24. Yatsenko K, Lushnikova I, Ustymenko A, Patseva M, Govbakh I, Kyryk V, Tsypukov 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 клітин, аналіз та інтерпретацію отриманих результатів, редагування статті). Індексція в Scopus та WoS, квартиль Q1.*
  25. Rubtsov V, Govbach I, Ustymenko A, Kyryk V, Tsypukov 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 клітин, аналіз та інтерпретацію отриманих результатів, редагування статті). Фахове видання кат. А, індексація 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 клітин, аналіз даних, інтерпретацію результатів, оформлення статті). Фахове видання кат. А, індексація 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, кuartиль 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 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 клітин, інтерпретацію результатів, редагування статті). Фахове видання кат. А, індексція в Scopus, кuartиль 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 клітин, статистичний аналіз даних, інтерпретацію результатів, оформлення статті). Фахове видання кат. А, індексція в Scopus, кuartиль 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 клітин, аналіз даних, інтерпретацію результатів, оформлення статті). Індексція в Scopus та WoS, кuartиль Q1.

#### **Наукові праці, 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 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. 4<sup>th</sup> International IMBG Conference for young scientists “Molecular biology: advances and perspectives”, Kyiv. 2011:166. (Здобувачем проведено виділення та характеристику 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 клітин, аналіз результатів, редагування тез).

36. 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. DOI: <https://doi.org/10.2217/rme.12.16>. *(Здобувачем проведено виділення та характеристику 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 10<sup>th</sup> Annual Meeting, Poster Session Abstracts. Vol. 2. Yokohama (JP). 2012:95. *(Здобувачем проведено фенотипування клітин, аналіз результатів, редагування тез)*.
38. Безруков ВВ, Бутенко ГМ, Парамонова ГИ, Сыкало 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 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. 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. 3<sup>rd</sup> IPLASS Meeting, Granada (ES). 2014:7. *(Здобувачем проведено фенотипування 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 клітин, аналіз результатів, написання тез)*.
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. *(Здобувачем проведено виділення та характеристику клітин, аналіз результатів, написання тез)*.
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 13<sup>th</sup> Annual Meeting, Stockholm (SE). 2015:413. *(Здобувачем проведено фенотипування 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 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, Немцінов 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 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 клітин, аналіз результатів, редагування тез). Індексация в Scopus та WoS, квартиль Q1.

**Наукові праці, 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. (Здобувачем проведено виділення та характеристику 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 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](http://www.kdpu-nt.gov.ua/sites/default/files/work_files/4_referat_2.pdf) (Здобувачем проведено виділення і характеристику клітин з жирової 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 ПІ, 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 ПІ, 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 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 клітин, оформлено заявку на патент).
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. (Здобувачем розроблено модель, оформлено заявку на патент).



## 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" – Буковинський державний медичний університет МОЗ України, Чернівці, 2024.

У дисертаційному дослідженні встановлено механізми реалізації регенеративних ефектів соматичних стовбурових клітин з жирової тканини, плаценти, тканиноспецифічних ендотеліальних та кардіальних прогеніторів на моделях пошкодження серцево-судинної системи та кісткової тканини у мишей з врахуванням комплексних критеріїв їх якості та доклінічної ефективності. Продемонстровано переваги тривимірних трансплантатів із спрямовано диференційованими стовбуровими клітинами для покращення регенерації тканин різних типів. Вперше встановлено вплив вікової дисфункції ніші стовбурових клітин на їхні морфофункціональні властивості. При трансляції результатів експериментальних досліджень у клініку вперше підтверджено безпеку та ефективність інтраміокардіальної трансплантації стовбурових клітин плаценти у пацієнтів з ішемічною кардіоміопатією. Розроблена концепція оцінки критеріїв якості соматичних стовбурових клітин дозволить підвищити безпеку та ефективність клітинної терапії при пошкодженнях різних типів тканин та органів.

**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". – Bukovinian State Medical University, the Ministry of Health of Ukraine, Chernivtsi, 2024.

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 study found that adipose-derived MMSCs exhibit a greater proliferative potential and population growth rate in comparison to those derived from bone marrow. However, when modelling adipose-derived stem cell niche dysfunction through ovariectomy, an increase in the population doubling time and a decrease in the potential for colony formation were observed, alongside an enhancement of adipogenesis in MMSC cultures *in vitro*.

Transplants of adipose-derived MMSCs, differentiated in the osteogenic direction in three-dimensional micromass cultures, facilitate the regeneration of damaged bone tissue by replacing lost bone structures. These transplants exhibit improved morphological indicators of tissue restoration compared to transplants without prior differentiation. In a mouse model of critical limb ischemia, hydrogel with carbomer 974P, engrafted with adipose-derived MMSCs, supported the survival of transplanted cells and significantly enhanced perfusion, as well as improved the morpho-functional state of the damaged muscle tissue.

The regenerative potential of endothelial progenitor cells was demonstrated through the restoration of perfusion in ischemic limbs and the improvement of histological indicators in muscle tissue in a model of critical limb ischemia. The use of Matrigel matrix and fibronectin as growth substrates was observed to promote the proliferation of endothelial progenitor cells and enhance their expression of endothelial markers, thereby facilitating their further implementation for therapeutic effects.

It has been established that the proliferative potential and contractile activity of cardiac-derived progenitor cells *in vitro* decrease with an increasing age of the myocardial tissue donor. However, tissue-specific myocardial stem cells obtained from the atrial appendage exhibit superior proliferative potential and demonstrate distinct morphological and immunophenotypic characteristics when compared to cell cultures isolated from the ventricles. The study determined that the formation of cardiospheres of appropriate quality, exhibiting contractile activity *in vitro* and expressing troponin I, VEGFR-2, and CD31, requires the presence of cardiotrophin as a growth factor, along with a sequential change of poly-D-lysine and fibronectin as growth substrates.

In a model of ischemic cardiomyopathy in mice, it was demonstrated that transplanted human placental MMSCs successfully engrafted the myocardium and exerted morphological and functional regenerative effects. 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 practical significance of the obtained results lies in the introduction of the latest high-tech cell therapy approaches, whose safety and effectiveness have been confirmed through experimental studies, and their translation into clinical practice. This advancement is expected to enhance the quality of complex treatment for patients with various serious diseases.

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