

**НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ ПРОБЛЕМ КРІОБІОЛОГІЇ І КРІОМЕДИЦИНИ**

ТАРУСІН ДМИТРО МИКОЛАЙОВИЧ

УДК 611.013.395:57.086.13:615.014.41:544.77.022.542

**ГІПОТЕРМІЧНЕ ЗБЕРІГАННЯ ТА КРІОКОНСЕРВУВАННЯ
МЕЗЕНХІМАЛЬНИХ СТРОМАЛЬНИХ КЛІТИН У СКЛАДІ
АЛЬГІНАТНИХ МІКРОСФЕР**

03.00.19 – кріобіологія

АВТОРЕФЕРАТ
дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

Харків – 2018

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана в Інституті проблем кріобіології і кріомедицини НАН України.

Науковий керівник: доктор біологічних наук, професор
Петренко Олександр Юрійович,
Інститут проблем кріобіології і кріомедицини
НАН України, м. Харків
завідувач відділу кріобіохімії.

Офіційні опоненти: доктор біологічних наук, професор
Малова Наталія Георгіївна,
Державна установа «Інститут проблем ендокринної
патології ім. В.Я. Данилевського НАМН України»,
м. Харків
завідуюча лабораторії фармакології;

доктор біологічних наук, професор
Перський Євген Ефроїмович,
Харківський національний університет
ім. В.Н. Каразіна МОН України,
завідувач кафедри біохімії біологічного факультету.

Захист відбудеться «__» _____ 2018 р. о _____ годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 64.242.01 при Інституті проблем кріобіології і кріомедицини НАН України за адресою: 61015, м. Харків, вул. Переяславська, 23.

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці Інституту проблем кріобіології і кріомедицини НАН України за адресою: 61015, м. Харків, вул. Переяславська, 23.

Автореферат розісланий «__» _____ 2018 р.

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради

О. В. Фалько

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Обґрунтування вибору теми дослідження. Інтенсивний розвиток біотехнології, регенеративної медицини, клітинної терапії та тканинної інженерії виводить на перший план як предмет медико-біологічних досліджень штучно створені тривимірні структури, що містять функціонально активні клітини. Це в свою чергу підвищує актуальність розробки сучасних методологічних та технологічних підходів до утворення, тривалого та короткострокового зберігання біоінженерних конструктів.

Один із провідних напрямків біоінженерних досліджень ґрунтується на використанні гідрогелевих мікросфер. Для отримання гідрогелевих мікросфер, що містять всередині життєздатні клітини, найбільш придатним матеріалом натеper можна вважати альгінат: він не чинить негативного впливу на клітини [Paredes Juárez G.A. et al., 2014], його фізико-хімічні властивості є подібними до позаклітинного матриксу [Maia F.R. et al., 2014] і процес його гелеутворення здатний відбуватися за умов, наближених до фізіологічних. Для вміщених в альгінатні мікросфери (АМС) клітин гідрогель стає бар'єром по відношенню до молекул з масою понад 100 кДа, проте дозволяє дифундувати поживним речовинам та кисню [Nicodemus G.D. et al., 2008].

Натеper найбільш ефективним і перспективним методом формування гідрогелевих мікросфер вважається метод електророзпилення [Poncelet D. et al., 2012]. Відповідно до нього діаметр утворюваних крапель при розпиленні рідкого гелеутворювача залежить від величини прикладеного електростатичного потенціалу, що на практиці забезпечується застосуванням генератора високої напруги.

Найпоширенішою клітинною складовою біоінженерних конструктів на сьогоднішній день є мультипотентні мезенхімальні стромальні клітини (МСК), що зумовлено їхнім високим проліферативним потенціалом та здатністю до мультилінійного диференціювання [Dominici M. et al. 2006; Ghieh F. et al., 2015]. У науковій літературі широко освітлені підходи, що забезпечують надійне зберігання МСК у вигляді суспензії шляхом кріоконсервування. Для кріоконсервування суспензій МСК зазвичай застосовують повільне заморожування з кріопротектором диметилсульфоксидом (ДМСО) у концентрації 1,5 М [Marquez-Curtis L.A. et al., 2015]. Також є відомості про успішне кріоконсервування МСК у складі тривимірних носіїв, в тому числі і в АМС, з ДМСО в такій же концентрації [Pravduk A. et al., 2013, Gryshkov O. et al., 2015]. Однак, враховуючи, що ДМСО є токсичною речовиною і потребує видалення перед застосуванням, актуальною є розробка протоколів ефективного кріоконсервування з використанням меншої концентрації цього кріопротектора.

Для короткострокового зберігання або транспортування біологічних об'єктів більш доцільно, у порівнянні з досить складними в технічному плані методами кріоконсервування, застосовувати підходи зберігання при позитивних температурах, нижчих за фізіологічні. Відомо, що в умовах гіпотермії внаслідок порушення метаболічного та іонного гомеостазу спостерігається набухання клітин з подальшим накопиченням активних форм кисню, що, в свою чергу, викликає активацію

апоптозу та структурні пошкодження [Fuller V. et al., 2013]. Застосування спеціалізованих розчинів, що запобігають набухання клітин, серед яких найбільш відомим є розчин UW (University of Wisconsin solution) [Southard J.H. et al., 1995], зменшує ступінь пошкодження. Розроблений у відділі кріобіохімії ІПКіК НАН України сахарозо-сольовий розчин (ССР) також є досить ефективним для зберігання біологічних об'єктів в умовах гіпотермії та, на додаток, більш економічно вигідним [Кравченко Л.П. и др. 1997]. У той же час особливості гіпотермічного зберігання клітин, вміщених у гідрогель АМС, їхній метаболічний стан та життєздатність залишаються невивченими.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами, грантами. Дисертація виконана у відділі кріобіохімії Інституту проблем кріобіології і кріомедицини НАН України у рамках науково-дослідної теми «Вивчення впливу кріоконсервування на біологічні властивості стовбурових клітин різного походження при моношаровому й об'ємному культивуванні та експериментальній трансплантації» (шифр – 2.2.6.71, номер держреєстрації 0112U003132).

Мета і завдання дослідження. Метою даної роботи було визначити вплив кріоконсервування та зберігання за позитивних температур на властивості МСК, інкапсульованих в альгінатні мікросфери із застосуванням електророзпилення.

Для досягнення цієї мети були поставлені та вирішені наступні завдання:

1. Визначити та опрацювати умови отримання стабільних та однорідних за розміром і формою АМС, які містять життєздатні МСК, із застосуванням методу електророзпилення.

2. Вивчити вплив інкапсуляції в АМС із застосуванням електророзпилення на життєздатність, метаболічну активність та проліферативно-диференціальні властивості МСК при культивуванні в складі АМС та після вивільнення з альгінатного гелю.

3. Характеризувати осмотичну відповідь та розрахувати коефіцієнти проникності цитоплазматичних мембран МСК в АМС для води та кріопротектора ДМСО.

4. Теоретично визначити та експериментально підтвердити умови ефективного кріоконсервування МСК у складі АМС, отриманих із застосуванням електророзпилення, під захистом 1 М ДМСО.

5. Дослідити вплив зберігання МСК у суспензії та у складі АМС за позитивних температур в культуральному середовищі на життєздатність, адгезивні властивості та метаболічну активність клітин.

6. Провести дослідження загальнобіологічних та специфічних властивостей МСК у суспензії та в складі АМС за умов гіпотермічного зберігання при 4 °С у спеціалізованих розчинах (ССР, UW).

Об'єкт дослідження – кріоконсервування та зберігання за позитивних температур МСК, інкапсульованих у АМС із застосуванням електророзпилення.

Предмет дослідження – загальнобіологічні та специфічні властивості МСК, інкапсульованих в АМС, до та після кріоконсервування або зберігання за позитивних температур.

Методи дослідження. У роботі використані наступні методи досліджень: моношарове та об'ємне культивування *in vitro*; отримання АМС із застосуванням електророзпилення; програмне заморожування; волюмометрія; фізико-математичне моделювання; спектрофотометрія; флуоресцентна спектроскопія; світлова та флуоресцентна мікроскопія; морфометричний аналіз; статистичний аналіз результатів.

Наукова новизна отриманих результатів. Встановлено, що МСК, інкапсульовані у АМС із застосуванням електророзпилення, зберігають в перебігу культивування високу життєздатність та функціональну активність. Вперше встановлено, що МСК у складі АМС характеризуються зворотним зниженням метаболічної активності та мембранного потенціалу мітохондрій.

На підставі осмотичної реакції МСК у складі АМС за присутності 1 М розчину ДМСО і при використанні чисельного моделювання вперше теоретично визначені параметри ефективного режиму їх кріоконсервування, результативність якого підтверджена експериментально. Вперше прийоми фізико-математичного моделювання були залучені до аналізу процесів, що протікають у клітинах, інкапсульованих в АМС.

Новими є результати, що інкапсуляція у АМС сприяє збереженню МСК за позитивних температур 22 і 37 °С при перебуванні у культуральному середовищі на основі α -МЕМ впродовж 3-х діб. Новими є дані, що використання спеціалізованих розчинів гіпотермічного зберігання (ССР, UW) забезпечує високу життєздатність МСК у складі АМС за умови їх інкубації при 4 °С, а також дозволяє подовжити термін зберігання до 7-и діб. Отримані в роботі результати надали можливість запропонувати використання інкапсуляції клітин у альгінатний гідрогель як засобу для їхнього короткострокового зберігання та транспортування.

Практичне значення отриманих результатів. Визначені основні параметри отримання однорідних за розміром та формою АМС із застосуванням електророзпилення, які були використані для інкапсуляції клітин у мікросфери. Для цього була виготовлена система з пристроєм для генерації високої напруги, яка спрощує технологію отримання АМС певного розміру і форми. Результати щодо осмотичної реакції МСК на розчин кріопротектора та подальше чисельне моделювання дозволяють теоретично обґрунтовувати і розраховувати оптимальні режими кріоконсервування клітин у складі тривимірних носіїв, зменшуючи обсяги емпіричних досліджень. Результати щодо зберігання інкапсульованих у АМС МСК за позитивних температур з використанням різних за складом середовищ є підґрунтям для застосування даного підходу при короткостроковому зберіганні і транспортуванні клітин.

Особистий внесок здобувача. Дисертаційна робота є самостійним науковим дослідженням, основні результати якого отримані безпосередньо здобувачем. Автором було проведено патентно-інформаційне дослідження наукової проблеми, спільно із науковим керівником визначені мета та завдання роботи, а також способи їхнього вирішення. Здобувачем особисто одержані експериментальні дані, проведені їхня статистична обробка та первинний аналіз, зроблені попередні висновки. Спільно з науковим керівником здійснена інтерпретація отриманих результатів і

сформульовані остаточні висновки. У наукових працях, що опубліковані у співавторстві, відображені результати спільного планування, проведення експериментів та обговорення результатів.

Апробація матеріалів дисертації. Матеріали дисертаційної роботи доповідалися і обговорювалися на щорічних конференціях молодих вчених ІПКіК НАН України «Холод в біології та медицині» (м. Харків, 2014, 2015, 2016); XI Українському біохімічному конгресі (м. Київ, 2014); міжнародній конференції «Society for Low Temperature Biology» (м. Лондон, Великобританія, 2014); 5-му міжнародному конгресі «Cell & Stem Cell Research» (м. Чикаго, США, 2015); щорічній зустрічі кріобіологічної спільноти «Cryo-2015» (м. Острава, Чеська Республіка, 2015); 1-й конференції молодих вчених «CYS-2015» (м. Київ, 2015); міжнародній конференції «Advances in Cell Biology and Biotechnology» (м. Львів, 2015).

Публікації. За результатами дисертаційної роботи опубліковано 16 наукових праць, серед них 5 статей у наукових фахових виданнях, 4 з яких входять до міжнародної наукометричної бази Scopus, 2 патенти на корисну модель, 9 тез доповідей на конференціях.

Обсяг та структура дисертації. Дисертаційна робота викладена на 175 сторінках друкованого тексту і містить наступні розділи: анотація, вступ, огляд літератури, матеріали і методи, 3 розділи результатів власних досліджень, узагальнення, висновки, список використаних джерел та 2 додатки. Список використаних джерел включає 290 найменувань, розміщених на 36 сторінках. Робота проілюстрована 27 рисунками та 2 таблицями.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

У **вступі** подані сучасні уявлення щодо кріоконсервування та гіпотермічного зберігання МСК у складі АМС, обґрунтована актуальність теми, наведений зв'язок роботи з науковими програмами і темами, сформульовані мета і завдання дослідження, показані новизна і практична значимість одержаних результатів, особистий внесок здобувача та відомості про апробацію результатів.

У **розділі 1 «Огляд літератури»** представлений аналітичний огляд експериментальних і теоретичних даних літератури, що стосуються загальнобіологічних та специфічних властивостей МСК, вимог та перспектив застосування МСК, інкапсульованих в АМС, в медико-біологічній практиці. Висвітлені сучасні підходи до кріоконсервування та гіпотермічного зберігання МСК у складі АМС. Критичний аналіз результатів багатьох досліджень дозволив зробити висновок, що актуальним є удосконалення процесу інкапсуляції, режимів кріоконсервування та методів короткострокового зберігання МСК у складі АМС.

У **розділі 2 «Матеріали і методи дослідження»** надана загальна характеристика об'єктів, методів і матеріалів дослідження.

В експериментах використовували культури МСК людини 4–8 пасажів, отримані з біоптатів шкіри дорослих пацієнтів-волонтерів з дотриманням рекомендацій Гельсінської декларації Всесвітньої медичної асоціації з проведення

біомедичних досліджень. Усі використані у дисертаційній роботі методи досліджень були розглянуті та схвалені Комітетом з біоетики ІПКіК НАН України.

Культивування МСК проводили за стандартних умов (37 °С, 95 % вологості, 5 %-х CO₂) у культуральному середовищі (КС) на основі α -МЕМ («РАА», Австрія), доповненого 2 мМ L-глутаміну, 50 мкг/мл стрептоміцину, 50 од/мл пеніциліну та 10 % ембріональної сироватки телят (ЕС) («РАА»). При моношаровому культивуванні по досягненню 70–80 % моношару клітини пересівали за стандартною методикою з розрахунку 5000 кл/см². Кількість клітин підраховували у камері Горяєва за загальноприйнятою методикою.

Культивування клітин у складі тривимірних носіїв на основі скелету морської губки *Ianthella basta* проводили як описано у роботі [Brunner E. et al, 2009].

Для отримання АМС використовували розчини альгілату натрію концентрацією 1,2; 1,5; 1,8; 2,0 % та 2 %-й розчин CaCl₂. З метою формування крапель альгілату шляхом електророзпилення до системи для отримання гідрогелевих мікросфер, описаної раніше в роботі [Правдюк А.И. и др., 2010], під'єднували генератор з функцією регульованої подачі напруги від 0 до ≤ 7 кВ [Тарусін Д.М. та ін., 2015]. Гідрогелеві мікросфери, що утворилися, витримували у розчині CaCl₂ впродовж 10 хв, потім поетапно відмивали від надлишку іонів кальцію промивальним розчином (0,9 % NaCl, 25 мМ HEPES).

З метою формування АМС, що містять МСК, до 2 %-го розчину альгілату натрію додавали суспензію клітин до кінцевої концентрації $1,5 \times 10^6$ кл/мл і здійснювали наведену вище процедуру отримання АМС. Оцінку впливу процедури інкапсуляції на клітини проводили через 1 добу культивування АМС з МСК.

Для вивільнення клітин із АМС проводили інкубацію мікросфер протягом 5 хвилин у 50 мМ розчині цитрату натрію з інтенсивним перемішуванням. Отриману суспензію клітин двічі відмивали промивальним розчином і переводили до середовища культивування.

Життєздатність МСК визначали за допомогою комбінованого забарвлення флуоресцеїн дیاцетатом (ФДА) (2 мкг/мл, «Sigma», США) та етидіум бромідом (ЕБ) (4 мкг/мл, «Sigma») [Katsen-Globa A. et al., 2009]. Аналіз забарвлення здійснювали з використанням інвертованого мікроскопа СЕТІ з флуоресцентним модулем EpiFluor («СЕТІ», Бельгія).

Метаболічну активність та життєздатність МСК оцінювали за допомогою МТТ-тесту (МТТ, 5 мг/мл; «Sigma») [Stockert J.C. et al., 2012]. Життєздатність визначали шляхом прямого підрахунку забарвлених клітин. Метаболічну активність оцінювали по накопиченню клітинами формаза на після його розчинення 100 %-им ДМСО за допомогою спектрофотофлуориметра «Tecan GENios» (Австрія).

Для інтегральної оцінки проліферативної та метаболічної активностей МСК застосовували редокс-індикатор Alamar Blue (АВ, «Serotec», США) [O'Brien J. et al., 2000]. Вміст відновленої форми АВ визначали на спектрофотофлуориметрі «Tecan GENios» при хвилі збудження 550 нм та хвилі емісії 590 нм.

Здатність клітин адгезувати визначали шляхом підрахунку кількості клітин, що прикріпилися до культурального пластику впродовж першої доби культивування.

Мембранний потенціал мітохондрій ($\Delta\psi_m$) МСК оцінювали за допомогою флуоресцентного барвника JC-1 (НТК «Інститут монокристалів», м. Харків, Україна) відповідно до протоколів комерційних аналогів [Hunt N.C. et al., 2009]. Флуоресценцію JC-1 виявляли спектрофлуориметрично (560/595 нм; 485/535 нм) на спектрофотофлуориметрі Tecan GENios та флуоромікроскопічно (560/593 нм; 488/540 нм) за допомогою конфокального мікроскопа Zeiss LSM 510 META («Carl Zeiss», Німеччина).

Остеогенне диференціювання МСК індукували при культивуванні протягом 21 доби у КС, що містило дексаметазон (100 нМ, «Sigma»), β -гліцерофосфат (10 мМ, «Sigma») та L-аскорбінову кислоту-2-фосфат (0,2 мМ, «Sigma»). Накопичення позаклітинного кальцію виявляли шляхом забарвлення Alizarin Red S («Sigma»).

Адипогенне диференціювання МСК індукували при культивуванні протягом 21 доби у КС, що містило дексаметазон (100 нМ, «Sigma»), 3-ізобутил-1-метилксантин (0,5 мМ, «Sigma»), інсулін (10 мкг/мл, «Sigma»), індометацин (100 мкМ, «Sigma»). Накопичення ліпідів виявляли шляхом забарвлення Oil Red O («Sigma»).

Визначення коефіцієнтів проникності мембран МСК для води (L_p) та кріопротектора (K_I) проводили методом волюмометрії, зіставляючи експериментально отримані залежності відносного об'єму клітин від часу їхнього контакту з 1 М розчином ДМСО з рішеннями теоретичної моделі [Гордиенко Е.А. и др., 1994]. Відносний об'єм клітин визначали за діаметрами їхніх зображень, отриманих за допомогою мікроскопа Axio Observer Z1 («Carl Zeiss», Німеччина) та програми AxioVision 4.8 («Carl Zeiss», Німеччина).

Кріоконсервування МСК у суспензії або у складі АМС здійснювали у середовищі α -MEM, доповненому 10 % ЕС та 1 М ДМСО у кріопробірках об'ємом 1,0 мл («NUNC», США). Кількість клітин, вміщуваних у кріопробірки, становила 1×10^6 . Заморожування проводили за допомогою програмного заморозувача УОП-6 (СКТБ з ОП ІПКіК НАН України) зі швидкостями охолодження 0,5, 1, 10 та 20 °С/хв до -40 °С, після чого зразки занурювали у рідкий азот. Відігрів зразків після 1–2-х діб зберігання здійснювали на водяній бані за температури 37–40 °С.

Короткострокове зберігання суспензій та інкапсульованих у АМС МСК здійснювали за температур 4, 22 і 37 °С в щільно закритих кріопробірках об'ємом 2,0 мл. Середовищем зберігання в різних серіях експериментів були КС, ССР або розчин UW, термін зберігання – 3 або 7 діб. Кількість клітин у зразках становила 1×10^5 клітин у загальному об'ємі середовища 1 мл. Контролем слугували МСК в суспензії або інкапсульовані в АМС, що не піддавалися зберігання (нульова точка зберігання).

Отримані експериментальні дані обробляли статистично залежно від характеру їхнього розподілу: за допомогою t-критерія Ст'юдента (параметричний метод статистичного аналізу) або критерія Манна-Уїтні (непараметричний метод статистичного аналізу). Відмінності вважали статистично значущими при $p \leq 0,05$.

У розділах 3-5 представлені результати власних досліджень та їх обговорення.

Отримання АМС із застосуванням електророзпилення та властивості інкапсульованих в них МСК. Система для отримання АМС включала шприцевий інфузійний насос, шприц для гелеутворювача об'ємом 1 мл з тупокінцевою голкою

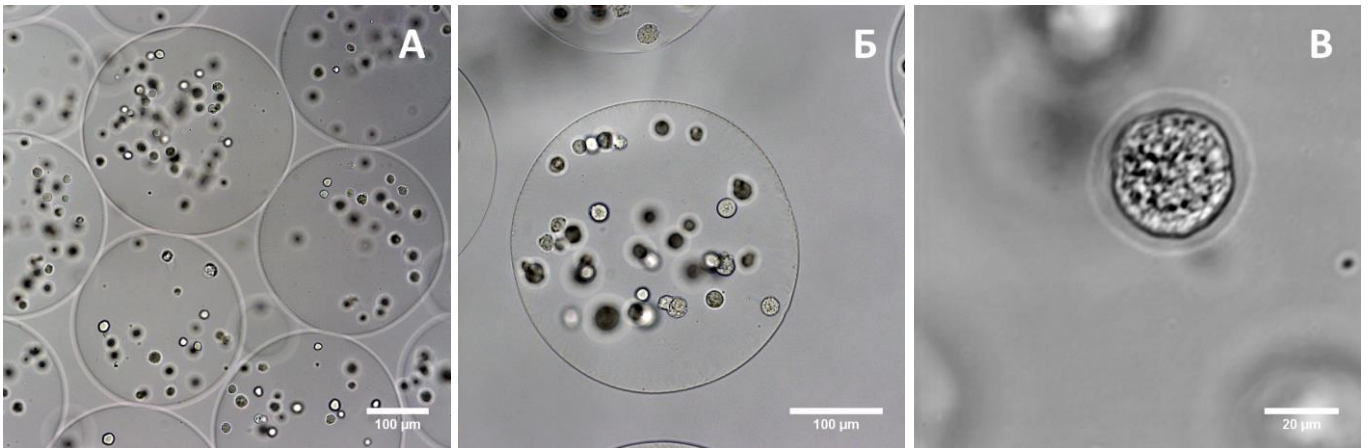


Рис. 1. МСК, інкапсульовані в АМС, 1 доба культивування *in vitro*. Прижиттєва світлова мікроскопія

діаметром 0,33 мм, ємність для гелюючого розчину і генератор з функцією регульованої подачі напруги від 0 до 7 кВ. При вільному падінні крапель альгінату у гелюючий розчин CaCl_2 формувалися мікросфери діаметром близько 2000 мкм. Подання навіть незначної напруги зменшувало розмір АМС до 1500 мкм, подальше зменшення діаметра крапель корелювало зі збільшенням напруги.

Значущими для процесу отримання мікросфер певного розміру та форми були такі параметри системи як відстань між місцем формування крапель (голкою) та гелюючим розчином, швидкість вивільнення гелеутворювача, форма кінчика голки. Основним параметром, який визначав форму одержуваних АМС, була концентрація розчинів альгінату натрію і хлористого кальцію. Найбільш стабільні мікросфери правильної сферичної форми з гладкою поверхнею утворювалися при використанні 2,0 %-го альгінату натрію за умови його полімеризації у 2,0 %-му розчині CaCl_2 .

Визначені параметри роботи системи, а саме: подана напруга ≈ 7 кВ, відстань від кінчика голки до поверхні гелюючого розчину 4 см, швидкість вивільнення альгінату зі шприца 10 мл/год, тупокінцева форма голки, концентрація розчину альгінату натрію 2,0 %; концентрація CaCl_2 2,0 % – забезпечили отримання АМС фіксованого діаметру в діапазоні від 200 до 800 мкм з відхиленням в межах 7 %.

При отриманні АМС із вміщеними МСК останні по закінченню полімеризації візуалізувалися у товщі прозорого гідрогелю як одиночні відокремлені одна від одної клітини, розташовані рівномірно по всьому об'єму АМС (рис. 1 А, Б). З рис. 1 В видно, що МСК у складі АМС мали округлу форму та не розпластувалися при культивуванні. За МТТ-тестом життєздатність МСК у складі АМС становила 94 ± 3 % при вихідній життєздатності клітин до інкапсуляції 96 ± 2 %. Культивування МСК у складі АМС протягом 7 діб не призводило до зміни їхньої морфології та достовірного зниження життєздатності. Це дозволяє зробити висновок, що визначені у даній роботі умови отримання мікросфер із застосуванням електророзпилення не чинять негативного впливу на клітини в перебігу самої процедури інкапсуляції.

Ідентифікаційними характеристиками МСК, що були визначені для моношарової культури цих клітин, є фібробластоподібна морфологія, адгезивність, специфічний імунотип та наявність проліферативного і диференціовального

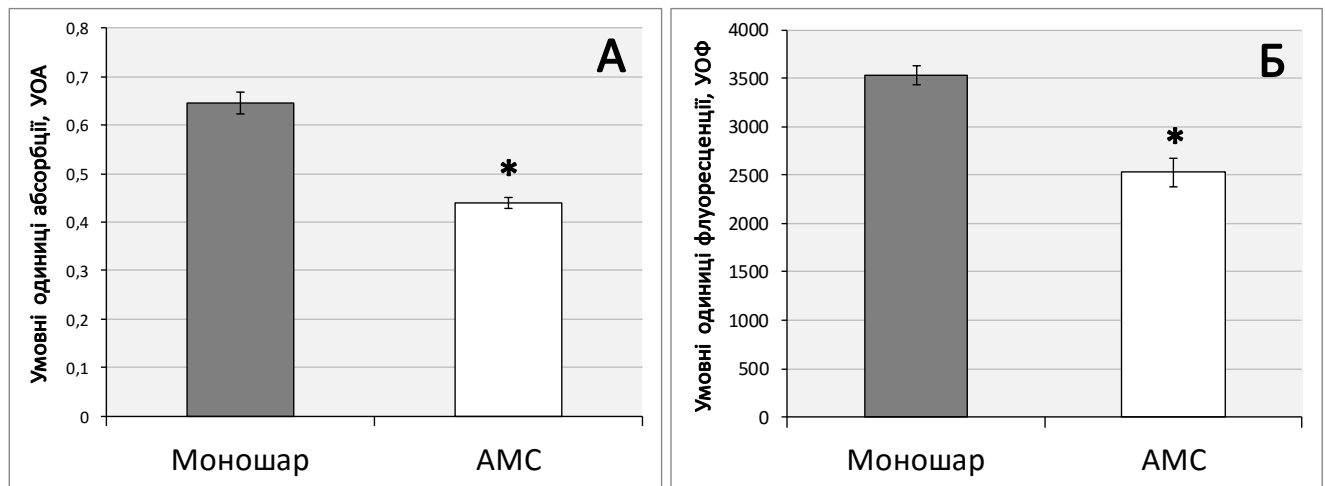


Рис. 2. Ступінь відновлення редокс-індикаторів МТТ (А) і Alamar Blue (Б) після 2 год культивування клітин у вигляді моношару і в складі АМС

Примітка: * – відмінності значущі ($p \leq 0,05$) у порівнянні з моношаром

потенціалів [Dominici M. et al. 2009]. Дослідження з об'ємними макропористими носіями, біосумісними з МСК, такими, наприклад, як обрані нами модифіковані скелети морської губки *Ianthella basta*, показали, що специфічні властивості МСК реалізуються і в умовах тривимірного культивування [Mutsenko V. et al., 2017]. Однак МСК, що проходили об'ємне культивування в товщі гідрогеля АМС, отриманих з 2 %-го альгінату натрію, не розпластувалися і не проліферували.

Порівняльне дослідження виявило, що метаболічна активність МСК у складі АМС майже на 30 % нижча за рівень метаболічної активності клітин у моношарі: рівні утворення формазану з МТТ і відновлення АВ становили для МСК у складі АМС $0,44 \pm 0,01$ умовних одиниць абсорбції (УОА) та $2530,6 \pm 151,7$ умовних одиниць флуоресценції (УОФ) відповідно, тоді як моношарові культури МСК характеризувалися показниками $0,64 \pm 0,02$ УОА та 3531 ± 96 УОФ (рис. 2).

За допомогою катіонного карбоціанінового барвника JC-1 були виявлені відмінності у мембранному потенціалі мітохондрій МСК в залежності від умов їх перебування. МСК у моношарі демонстрували більш виражену флуоресценцію у червоно-помаранчевій області (рис. 3), що притаманна клітинам з високим $\Delta\psi_m$. У складі АМС, навпаки, більшість клітин мали зелену флуоресценцію, тобто характеризувалися низьким $\Delta\psi_m$. Кількісна оцінка спектрофлуориметричним методом підтвердила мікроскопічні спостереження: для МСК у складі АМС були характерними високі показники відносних одиниць флуоресценції (ВОФ) у зеленій області – $0,566 \pm 0,051$, у той час як інтенсивність флуоресценції у червоно-помаранчевої області складала лише $0,277 \pm 0,067$ ВОФ (рис. 4). Для МСК у вигляді моношару, навпаки, в зеленій області показники флуоресценції мали нижчий рівень, ніж у червоно-помаранчевій: $0,387 \pm 0,019$ та $0,564 \pm 0,020$ ВОФ, відповідно.

Таким чином, інкапсульовані в АМС МСК характеризувалися зниженням загальної метаболічної активності та мембранного потенціалу мітохондрій, а також відсутністю адгезивної та проліферативної активностей, які є достатньо енерговитратними процесами.

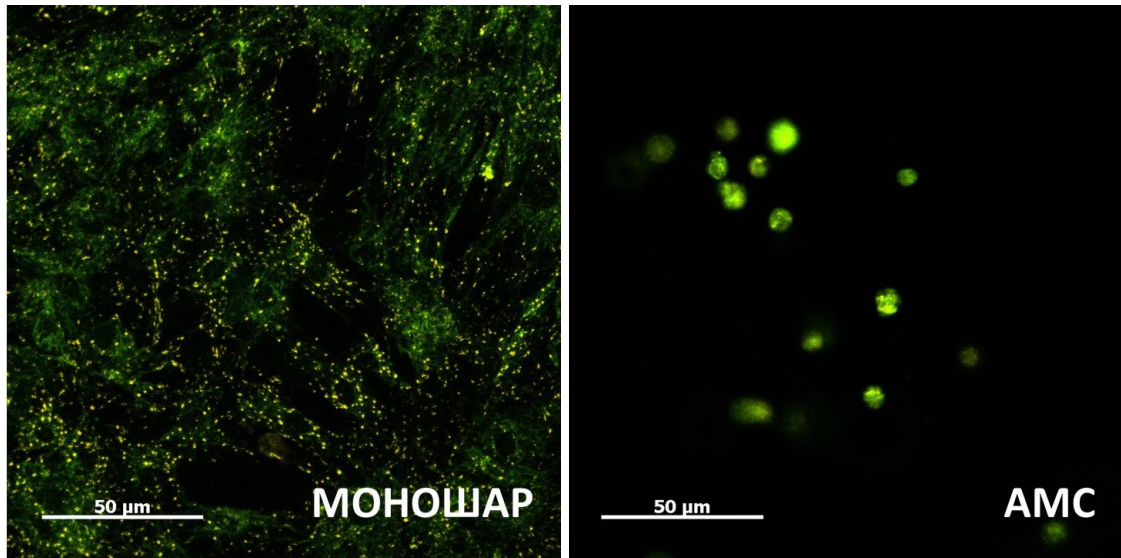


Рис. 3. Мікрофотографії моношару та інкапсульованих у АМС МСК, забарвлених JC-1 за $\lambda = 535/595$ нм. Флуоресцентна мікроскопія

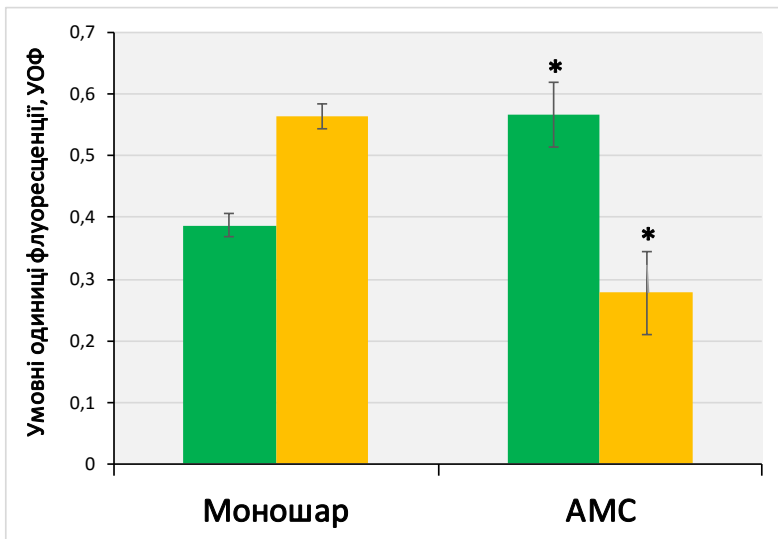


Рис. 4. Інтенсивність флуоресценції JC-1 в МСК, що культивовані у вигляді моношару або у складі АМС, при $\lambda = 535$ нм (■; низький мембранний потенціал) і $\lambda = 595$ нм (■; високий мембранний потенціал)
Примітка: * – відмінності значущі ($p \leq 0,05$) у порівнянні з моношаром при однакових довжинах хвиль

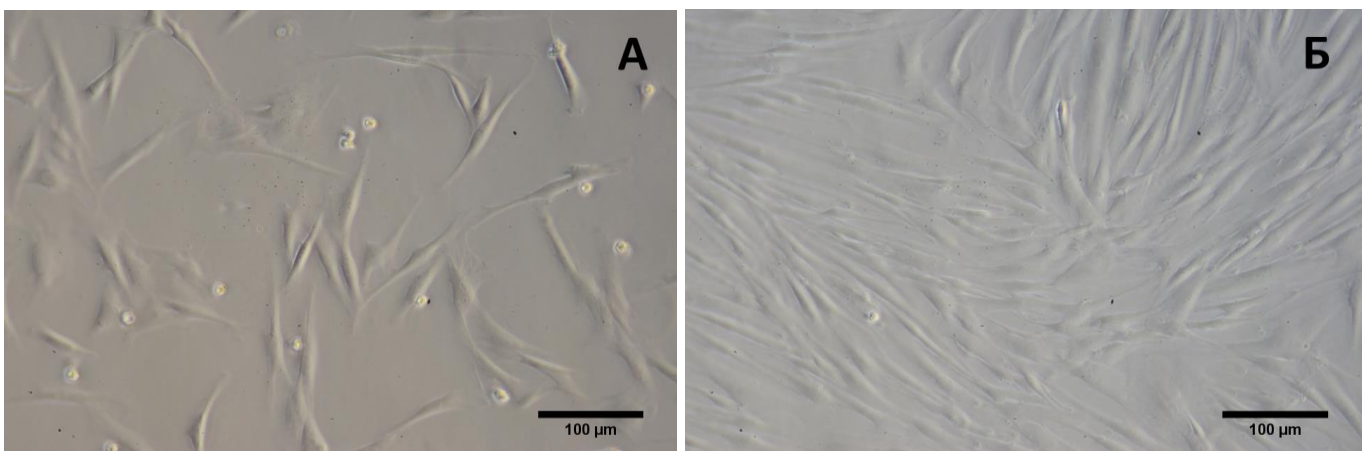


Рис. 5. Культура МСК, вивільнених з АМС і переведених в умови моношарового культивування, на 1-у (А) і 3-у (Б) добу після посіву. Прижиттєва світлова мікроскопія

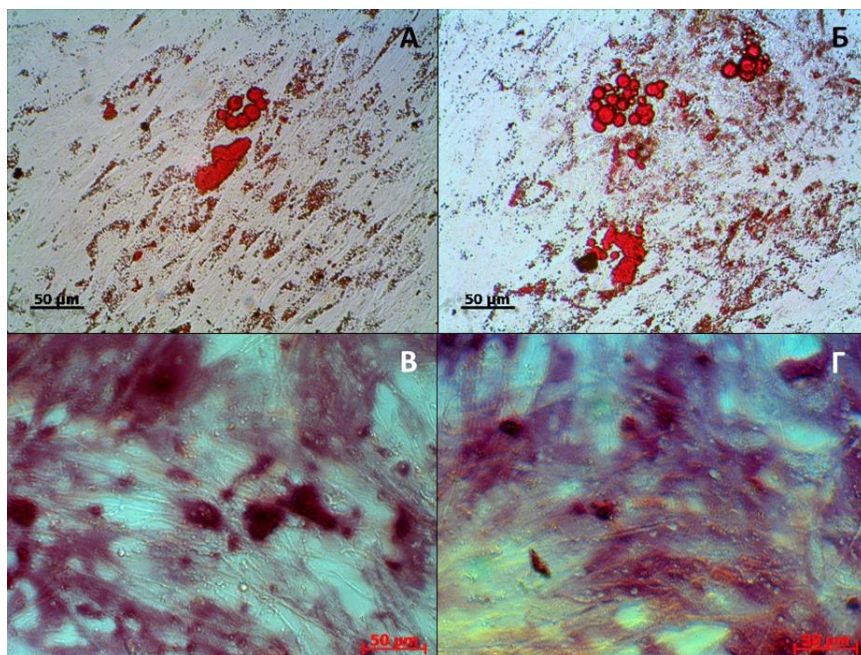


Рис. 6. Спрямоване адипогенне (А, Б) й остеогенне (В, Г) диференціювання МСК, що не проходили етапу інкапсуляції у АМС (А, В), та після їх вивільнення з АМС (Б, Г)

Примітка: А, Б – забарвлення ліпідів Oil Red O; В, Г – забарвлення мінералізованого матриксу Alizarin Red S

Означені відмінності мали оборотний характер: після вивільнення з АМС і переведення в умови моношарового культивування 85 ± 4 % клітин прикріплювалися до адгезивної поверхні і були здатні до проліферації. На третю добу культивування на культуральному пластику клітини формували суцільний рівномірний моношар (рис. 5), а показник АВ-теста зростав втричі: 5766 ± 122 УОФ порівняно з 1532 ± 160 УОФ на першу добу.

Вивільнені з АМС МСК виявляли здатність до індукованого диференціювання в адипогенному та остеогенному напрямках, що підтверджувалося накопиченням відповідних продуктів диференціювання в моношарових культурах (рис. 6). Істотних відмінностей між контрольними культурами та клітинами, що були піддані інкапсуляції в АМС, при цьому виявлено не було.

Таким чином, проведені дослідження показали, що визначена процедура отримання АМС, що містять МСК, за допомогою електророзпилення не чинить негативного впливу на ідентифікаційні характеристики МСК, а блокування проліферації і зниження метаболічної активності клітин у складі АМС мають оборотний характер і є обмеженням реалізації потенціалу МСК, а не втратою клітинами відповідних властивостей.

Кріоконсервування МСК у складі АМС. Тривале зберігання клітин та тканиноінженерних конструкцій є невід'ємним етапом сучасних технологій в медико-біологічній галузі. Раніше в нашій лабораторії було показано, що високу збереженість МСК, інкапсульованих в АМС, може забезпечити програмне повільне двоетапне заморожування у присутності ДМСО за умов залучення ініціації кристалоутворення та використання в кріозахисному розчині не менше 1,4 М (10 %) ДМСО [Pravduk A. et al., 2013]. Відмінність за розміром та технологією отримання АМС, застосованих у попередніх дослідженнях, зумовила необхідність проведення подальших досліджень щодо кріоконсервування АМС з МСК. При цьому нами була здійснена спроба залучити попереднє теоретичне обґрунтування і математичний

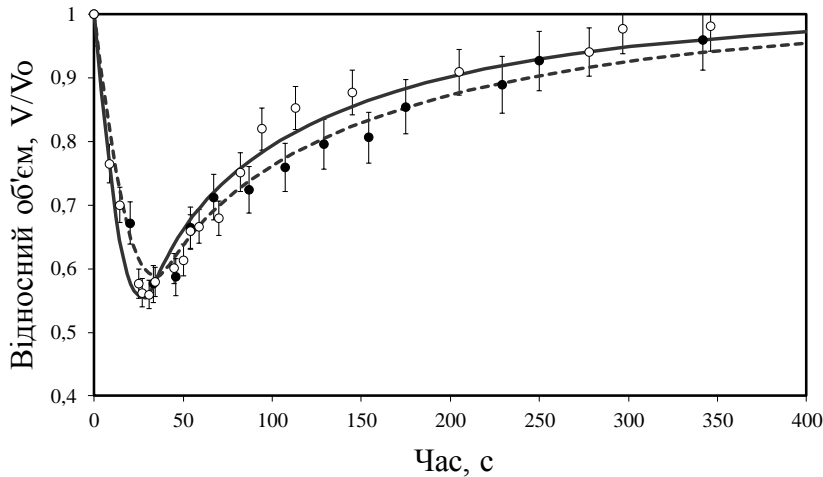


Рис. 7. Осмотична реакція МСК на контакт з 1 М розчином ДМСО: експериментальні значення (○) та теоретична крива (—) для МСК у вигляді суспензії, експериментальні значення (●) та теоретична крива (— — —) для МСК у складі АМС

розрахунок до вибору найбільш ефективного режиму заморожування для даного конкретного об'єкта. Крім того, ми намагалися отримати високі показники збереженості клітин за меншої концентрації кріопротектора.

Визначення динаміки змін об'єму МСК при експозиції їх в 1 М ДМСО показало, що осмотична реакція МСК на таку концентрацію кріопротектора (швидка дегідратація та подальша повільна регідратація) як в суспензії, так і в АМС повністю завершувалася до 5-ї хвилини експозиції і не супроводжувалася помітними порушеннями клітинної цілісності, однак дегідратація МСК у складі АМС відбувалася повільніше. На рис. 7 наведені результати експериментального визначення відносного об'єму МСК у різні моменти періоду перебування клітин в 1 М розчині ДМСО, а також отримані на їхній основі теоретичні криві залежності зміни клітинного об'єму від тривалості контакту з кріопротектором. Розрахунок з використанням фізико-математичної моделі показав, що теоретична крива коректно описує експериментальні дані для МСК у вигляді суспензії за коефіцієнтів проникності мембран для молекул води $L_p = (3,38 \pm 1,1) \times 10^{-14} \text{ м}^3/\text{Н}\cdot\text{с}$ і ДМСО $K_l = (1,60 \pm 0,21) \times 10^{-8} \text{ м/с}$, а для МСК у складі АМС – за $L_p = (2,03 \pm 1,4) \times 10^{-14} \text{ м}^3/\text{Н}\cdot\text{с}$ і $K_l = (1,07 \pm 0,18) \times 10^{-8} \text{ м/с}$. Означені відмінності цих характеристик для інкапсульованих клітин, ймовірно, є наслідком уповільнення дифузії кріопротектора у товщу альгінатного гідрогелю, і, отже, поступового зростання концентрації кріопротектора безпосередньо біля самих клітин, а також розведення за рахунок утримуваної всередині АМС води.

Використовуючи отримані коефіцієнти проникності у фізико-математичній моделі, що описує кінетику змін відносного об'єму клітин у процесі позаклітинної кристалізації за певної швидкості охолодження, можна спрогнозувати ступінь зневоднення МСК.

З рис. 8 видно, що прогнозоване зневоднення МСК, які заморожували зі швидкостями від $0,5 \text{ }^\circ\text{C}/\text{хв}$ до $20 \text{ }^\circ\text{C}/\text{хв}$ до $-40 \text{ }^\circ\text{C}$, відрізняється для клітин у суспензії та у складі АМС: за швидкості охолодження $0,5 \text{ }^\circ\text{C}/\text{хв}$ розрахований відносний об'єм МСК у суспензії дорівнював $0,49$, а у складі АМС – $0,57$; за швидкості $1 \text{ }^\circ\text{C}/\text{хв}$ – $0,62$ та $0,74$, відповідно. Слід зазначити, що більші швидкості охолодження (від $10 \text{ }^\circ\text{C}/\text{хв}$) не забезпечують достатнього зневоднення клітин, це може в результаті

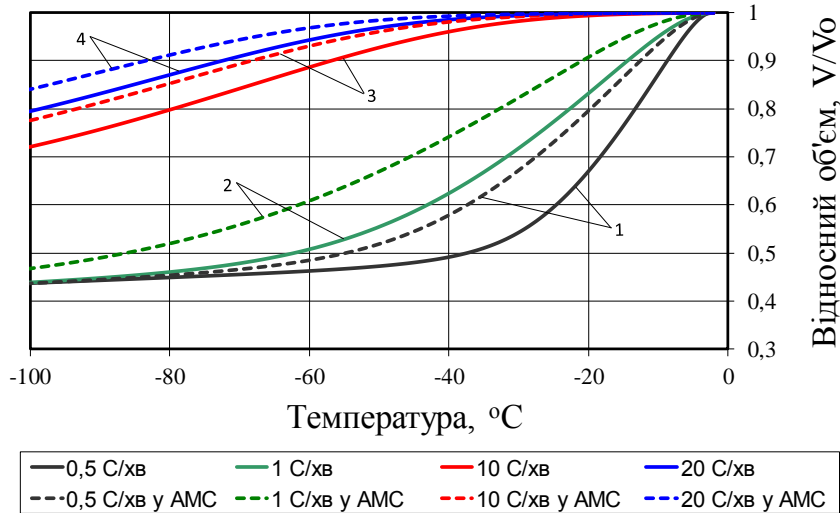


Рис. 8. Прогнозована динаміка зміни об'єму МСК у суспензії (—) і у складі АМС (---) в присутності 1 М ДМСО при швидкостях охолодження 0,5 (1), 1 (2), 10 (3) і 20 (4) °C/хв

привести до внутрішньоклітинної кристалізації і загибелі клітин у процесі заморожування.

Проведені експерименти по кріоконсервуванню суспензій МСК та АМС з МСК у кріозахисному середовищі з 1 М ДМСО показали достовірність зроблених висновків. Кріоконсервування, що включало охолодження зі швидкостями 10 та 20 °C/хв, призводило до загибелі близько 80 % клітин як у складі суспензії, так і у складі АМС. Кріоконсервування з використанням низьких швидкостей охолодження (0,5 та 1 °C/хв) не порушувало цілісність АМС, а життєздатність клітин зберігалася на рівні 75 % і вище. Найвищі значення життєздатності були отримані за швидкості охолодження 1 °C/хв: 88 ± 4 % для суспензій клітин та 81 ± 4 % для клітин у складі АМС. Однакові значення життєздатності МСК, кріоконсервованих у вигляді суспензії і у складі АМС, були отримані при зниженні швидкості охолодження до 0,5 °C/хв (рис. 9).

Зберігання МСК у складі АМС за позитивних температур. З метою оцінки можливості застосування технології інкапсуляції для короткострокового

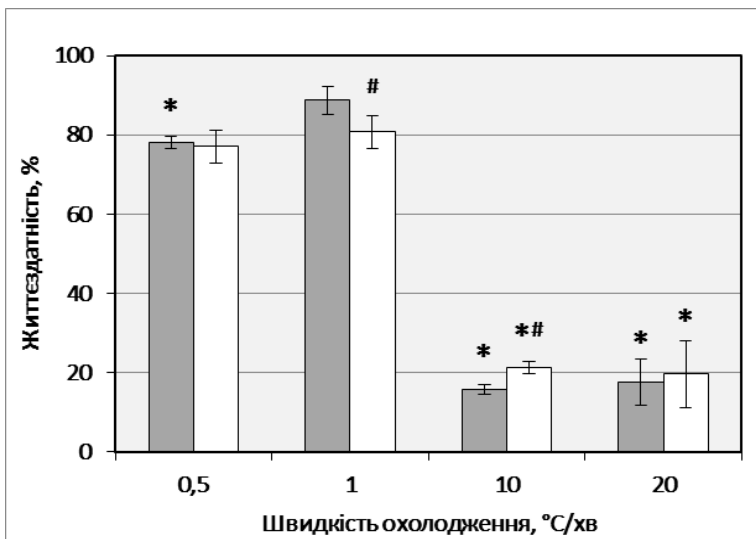


Рис. 9. Життєздатність МСК в суспензії (■) та інкапсульованих в АМС (□) після кріоконсервування в присутності 1 М ДМСО за різних швидкостей охолодження
Примітка: * – відмінності значущі ($p \leq 0,05$) у порівнянні зі швидкістю 1 °C/хв; # – відмінності значущі ($p \leq 0,05$) у порівнянні з суспензією МСК

зберігання та транспортування клітин було проведено порівняльне вивчення структурно-функціонального стану та здатності до індукованого диференціювання МСК, що перебували за позитивних температур (4, 22, 37 °С) у вигляді суспензії або у складі АМС.

Зберігання МСК у культуральному середовищі за температур 4, 22 та 37 °С. Зберігання суспензій МСК в КС за усіх обраних температур супроводжувалося поступовим зниженням їхньої життєздатності, починаючи вже з 1-ї доби, що мало наслідком значну втрату життєздатних клітин наприкінці спостереження, на 3-ю добу (табл. 1). Найбільш вираженим зниження життєздатності було в разі зберігання при 4 °С – до 30 %. Інкапсульовані в АМС МСК краще переживали короткострокове зберігання, достовірні відмінності після 1-ї доби зберігання і надалі, впродовж усього періоду спостереження, були відзначені тільки у разі зберігання за 4 °С. За температури 22 °С достовірне зниження показника відзначалося лише на кінець експерименту, а зберігання інкапсульованих МСК при 37 °С не призводило до зниження життєздатності впродовж 3-х діб (87±9 %).

Подібні зміни спостерігалися при визначенні здатності клітин до адгезії: в перебігу зберігання суспензій МСК відбувалося поступове зниження їхньої здатності адгезувати до підложки; МСК, які проходили етап зберігання за 22 та 37 °С у складі АМС, значно більшою мірою зберігали свої адгезивні властивості, ніж клітини в суспензії; переваг інкапсульованих клітин над клітинами у суспензії в разі гіпотермічного зберігання за 4 °С не виявлялося (табл. 1).

Аналіз метаболічної активності культур МСК, що були отримані після зберігання за позитивних температур у КС, виявив, що тільки культури МСК, що

Таблиця 1

Показники стану МСК після зберігання в суспензії або в складі АМС за позитивних температур в культуральному середовищі

Строк зберігання	Температура зберігання	Суспензія МСК			МСК у складі АМС		
		ЖЗ, %	АЗ, %	МА, ВОФ	ЖЗ, %	АЗ, %	МА, ВОФ
Контроль		97±2	97±2	5,28±0,69	94±5	93±4	5,4±0,79
1 доба	37 °С	76±8*	74±8*	3,64±0,54*	93±5	87±7	4,97±0,57
	22 °С	84±6*	82±7*	4,36±0,51	92±5	85±5	4,88±0,62
	4 °С	83±5*	81±7*	4,30±0,44	83±6*	75±9#	4,43±0,60
2 доба	37 °С	59±8*	41±8*	2,25±0,50*	88±8#	82±6#	4,67±0,56#
	22 °С	65±10*	64±8*	3,13±0,60*	86±7#	78±5*	4,43±0,55
	4 °С	55±7*	57±5*	2,19±0,52*	74±5#	59±7*	3,01±0,62*
3 доба	37 °С	49±10*	23±5*	1,13±0,41*	87±9#	62±10#	4,04±0,56#
	22 °С	54±7*	46±7*	2,04±0,43*	78±4#	69±7#	4,24±0,52#
	4 °С	33±10*	26±5*	0,99±0,42*	51±8*	37±6*	1,86±0,55*

Примітка: ЖЗ – життєздатність за МТТ-тестом, АЗ – здатність до адгезії, МА – метаболічна активність за АВ-тестом; Відмінності значущі ($p \leq 0,05$) у порівнянні з контролем (*) і суспензією МСК (#).

зберігалися у складі АМС за 22 і 37 °С, мали показники АВ-тесту на рівні контролю $4,04 \pm 0,56$ - $4,24 \pm 0,52$ ВОФ незалежно від терміну зберігання (табл. 1).

Дослідження диференціювальних властивостей показало, що МСК після перебування у складі АМС у КС за різних позитивних температур зберігають здатність до остео- та адипогенезу.

Таким чином, інкапсуляція у АМС дозволяє подовжити терміни безпечного зберігання МСК у КС за позитивних температур 22 і 37 °С: перебуваючи у складі АМС, клітини більшою мірою зберігають життєздатність, здатність прикріпитися до культурального пластику, метаболічну активність за АВ-тестом та диференціювальний потенціал, ніж за зберігання у вигляді суспензії.

Гіпотермічне зберігання МСК у спеціалізованих розчинах (ССР, UW) за 4 °С. Виявлене погіршення показників життєздатності та метаболічної активності МСК під час зберігання в КС при 4 °С може бути обумовлене складом обраного середовища, яке призначене забезпечувати підтримку клітинами при нормотермії свого гомеостазу шляхом реалізації власних метаболічних процесів, які при гіпотермії зазнають значних змін. Для перевірки цього припущення були проведені експерименти, в яких МСК в суспензії або у складі АМС зберігали в спеціалізованих розчинах – ССР та UW.

Гіпотермічне зберігання за 4 °С суспензії МСК у КС призводило до зниження їхньої життєздатності до 33 ± 10 % вже на 3-ю добу. Інкапсуляція у АМС частково запобігала загибелі клітин, і життєздатність становила 51 ± 9 %. Застосування розчинів ССР і UW дозволяло зберегти життєздатність на цей строк практично на контрольному рівні. Подовження терміну зберігання в КС до 7-и діб призводило до загибелі майже усіх МСК як у суспензії, так і у складі АМС. В разі використання розчинів ССР та UW життєздатність МСК як у вигляді суспензії, так і у складі АМС достовірно знижувалася, проте залишалася на досить високому рівні (від 56 ± 9 % до 76 ± 6 % для різних груп спостереження) (табл. 2).

Таблиця 2

Показники стану МСК після зберігання в суспензії або в складі АМС за 4 °С в культуральному середовищі або спеціалізованих розчинах

Строк зберігання	Розчини зберігання	Суспензія МСК			МСК у складі АМС		
		ЖЗ, %	АЗ, %	МА, ВОФ	ЖЗ, %	АЗ, %	МА, ВОФ
Контроль		97 ± 2	96 ± 4	$5,03 \pm 0,76$	96 ± 4	96 ± 3	$5,66 \pm 0,78$
3 доба	КС	$33 \pm 10^*$	$27 \pm 11^*$	$3,12 \pm 0,36^*$	$51 \pm 9^*$	$38 \pm 11^*$	$3,54 \pm 0,49^*$
	UW	83 ± 9	80 ± 11	$4,54 \pm 0,52$	88 ± 8	84 ± 11	$5,09 \pm 0,62$
	ССР	84 ± 10	80 ± 9	$4,34 \pm 0,60$	86 ± 7	84 ± 7	$4,87 \pm 0,64$
7 доба	КС	$5 \pm 4^*$	$6 \pm 5^*$	$0,82 \pm 0,46^*$	$7 \pm 5^*$	$8 \pm 4^*$	$0,91 \pm 0,52^*$
	UW	$71 \pm 6^*$	$68 \pm 9^*$	$3,59 \pm 0,52^*$	$76 \pm 6^*$	$73 \pm 11^*$	$4,12 \pm 0,59^*$
	ССР	$56 \pm 9^*$	$53 \pm 10^*$	$3,01 \pm 0,57^*$	$66 \pm 7^*$	$57 \pm 10^*$	$3,63 \pm 0,34^*$

Примітка: ЖЗ – життєздатність за МТТ-тестом, АЗ – здатність до адгезії, МА – метаболічна активність за АВ-тестом. Відмінності достовірні ($p \leq 0,05$) у порівнянні з контролем (*)

Гіпотермічне зберігання у КС призводило до значних втрат здатності МСК до адгезії. Залучення спеціалізованих розчинів істотно уповільнювало цей процес, дозволяючи зберегти даний показник на рівні не нижчому за 50 % на 7-му добу експерименту (табл. 2), причому відмінностей у досліджуваних властивостях між клітинами в суспензії та клітинами в АМС виявлено не було.

Метаболічна активність за АВ-тестом МСК, що пройшли етап гіпотермічного зберігання в КС, була істотно нижчою за контрольний рівень на обидва строки спостереження. Застосування розчинів ССР та UW значною мірою запобігало втраті метаболічної активності: після 7-ми діб зберігання показники АВ-теста зменшувалися лише на 40-30 % від рівня контролю. Різниця між показниками для клітин в суспензії і у складі АМС була відсутня (табл. 2).

МСК, що пройшли етап гіпотермічного зберігання у розчинах ССР та UW у складі АМС, мали здатність до індукованого диференціювання у остеогенному та адипогенному напрямках.

Таким чином, МСК у складі АМС після гіпотермічного зберігання впродовж 7-х діб у середовищах ССР та UW залишаються морфологічно, метаболічно та функціонально повноцінними. При поверненні клітин в умови моношарового культивування вони прикріплюються, набувають фібробластоподібного вигляду, активно проліферують та виявляють здатність до індукованого диференціювання у адипо- та остеогенному напрямках.

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі наведені теоретичне узагальнення і вирішення наукової проблеми низькотемпературного консервування та гіпотермічного зберігання МСК у складі АМС фіксованого розміру та форми, отриманих за допомогою методу електророзпилення.

1. Доведено, що процес отримання стабільних та однорідних за формою і розміром АМС, що містять МСК, із застосуванням методу електророзпилення з використанням напруги ≤ 7 кВ, не впливає на життєздатність інкапсульованих клітин.

2. МСК у складі АМС розміром близько 200 мкм, які утворені із 2 %-го розчину альгінату під дією 2 %-го розчину хлористого кальцію із залученням електророзпилення, в умовах культивування демонструють зниження на 30 % загальної метаболічної активності клітин, дослідженої за допомогою МТТ- та Alamar Blue-тестів, та зниження мембранного потенціалу мітохондрій порівняно з клітинами у моношаровій культурі. МСК в АМС демонструють сферичну форму, не мають міжклітинних контактів, не проліферують, однак здатні тривалий час підтримувати свою життєздатність на високому рівні.

3. Встановлено, що зміни метаболічно-функціонального стану МСК, інкапсульованих в АМС, носять оборотний характер. МСК, вилучені зі складу АМС, здатні до адгезії, проліферації та індукованого мультилінійного диференціювання в умовах моношарового культивування.

4. На основі експериментально визначеної осмотичної відповіді МСК в суспензії або у складі АМС з діаметром 200 мкм на 1 М розчин ДМСО з залученням

математичного моделювання були розраховані коефіцієнти проникності для води та кріопротектору. З'ясовано, що осмотична реакція МСК у складі АМС уповільнена у порівнянні з відповіддю клітин у суспензії.

5. Із залученням розрахованих коефіцієнтів проникності цитоплазматичних мембран МСК для води та ДМСО були теоретично визначені швидкості охолодження до $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ у присутності 1 М ДМСО, при яких забезпечується дегідратація клітин, достатня для запобігання ушкоджень, пов'язаних із внутрішньоклітинною кристалізацією. Експериментально доведено, що кріоконсервування МСК у складі АМС під захистом 1 М ДМСО зі швидкостями охолодження 0,5 і 1 $^{\circ}\text{C}/\text{хв}$ забезпечує високу збереженість клітин.

6. Виявлено, що інкапсуляція у АМС сприяє збереженню життєздатності, адгезивних властивостей та метаболічної активності МСК за умов короткострокового зберігання у культуральному середовищі за температур 22 та 37 $^{\circ}\text{C}$ до 3-х діб на рівні 80-90 %. Зберігання у культуральному середовищі за температури 4 $^{\circ}\text{C}$ призводить до зниження життєздатності МСК як у суспензії, так і в складі АМС.

7. Встановлено, що гіпотермічне зберігання при температурі 4 $^{\circ}\text{C}$ в розчинах ССР та UW дозволяє отримати високі показники збереження МСК як в суспензії, так і у складі АМС впродовж 7-и діб. При поверненні в умови моношарового культивування МСК, що зберігалися у середовищах ССР та UW протягом 7-и діб, були здатні до проліферації та індукованого диференціювання у адипо- та остеогенному напрямках.

ПЕРЕЛІК ПРАЦЬ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Наукові праці, в яких опубліковані основні наукові результати дисертації

1. Тарусин Д. Н. Эффективность сахарозо-содержащего раствора и раствора UW для гипотермического хранения мезенхимальных стромальных клеток человека в суспензии или в составе альгинатных микросфер / Д. Н. Тарусин, Ю. А. Петренко, О. А. Семенченко, В. В. Муценко, В. С. Зайков, А. Ю. Петренко // Проблемы криобиологии и криомедицины. – 2015. – Т. 25, №4. – С. 329–339. (Scopus) *(Внесок здобувача: культивування та інкапсуляція клітин у АМС, опрацювання підходів щодо гіпотермічного зберігання та подальшого визначення загальнобіологічних властивостей МСК у складі АМС, статистична обробка результатів, аналіз і формулювання висновків, написання статті).*
2. Тарусин Д. Н. Выбор условий криоконсервирования мезенхимальных стромальных клеток в суспензии и альгинатных микросферах на основе изучения их осмотических реакций в растворе 1 М ДМСО / Д. Н. Тарусин, В. А. Киреев, С. Е. Коваленко, И. Ф. Коваленко, Л. Ф. Розанов, А. Ю. Петренко // Проблемы криобиологии и криомедицины. – 2016. – Т. 26, №2. – С. 133–144. (Scopus) *(Внесок здобувача: культивування клітин, опрацювання підходів щодо кріоконсервування та подальшого визначення життєздатності МСК у складі АМС, статистична обробка результатів, аналіз і формулювання висновків, написання статті).*
3. Зайков В. С. Влияние инкапсуляции в альгинатные микросферы на жизнеспособность мезенхимальных стромальных клеток после экспозиции с

проникаючими криопротекторами // В. С. Зайков, Д. Н. Тарусин, А. Ю. Петренко / Проблемы криобиологии и криомедицины. – 2016. – Т. 26, №3. – С. 213–220. (Scopus) *(Внесок здобувача: культивування клітин, аналіз токсичного впливу проникаючих криопротекторів на МСК у складі АМС з використанням МТТ-тесту, обробка результатів, аналіз і формулювання висновків).*

4. Tarusin D. Encapsulation of mesenchymal stromal cells in alginate microspheres / D. Tarusin, S. Mazur, N. Volkova, Yu. Petrenko, V. Zaikov, A. Petrenko // Biotech Acta. – 2016. – V. 9, №4. – С. 58–66. *(Внесок здобувача: культивування та інкапсуляція клітин у АМС, опрацювання підходів щодо зберігання та подальшого визначення загальнобіологічних властивостей МСК у складі АМС, статистична обробка результатів, аналіз і формулювання висновків, написання статті).*

5. Mutsenko V. Novel chitin scaffolds derived from marine sponge *Ianthella basta* for tissue engineering approaches based on human mesenchymal stromal cells: Biocompatibility and cryopreservation / Gryshkov O., Lauterboeck L., Rogulska O., Tarusin D., Bazhenov V., Schütz K., Brüggemeier S., Gossila E., Akkineni A., Meißner H., Lode A., Meshke S., Fromont J., Stelling A., Tabachnik K., Gelinsky M., Nikulin S., Rodin S., Tonevitsky A., Petrenko A., Glasmacher B., Schupp P., Ehrlich H. // Int J Biol Macromol. – 2017. – 104(Pt B). – P. 1955–1965. (Scopus) *(Внесок здобувача: проведення експериментів з культивування та заселення МСК на скафолди з морських губок *Ianthella basta*, проведення флуоресцентного фарбування зразків з використанням конфокальної мікроскопії, аналіз і формулювання висновків).*

Патенти України

6. Пат. 95902 Україна, МПК А01N 1/02. Спосіб зберігання та транспортування клітин / Д. М. Тарусін, В. В. Муценко, В. С. Зайков, О. Ю. Петренко, Ю. О. Петренко ; власник ІПКіК НАН України. - № u201408225 ; заявл. 21.07.2014 ; опублік. 12.01.2015, Бюл. № 1. *(Внесок здобувача: культивування та інкапсуляція клітин у АМС, опрацювання підходів щодо зберігання та подальшого визначення загальнобіологічних властивостей МСК у складі АМС, статистична обробка результатів, аналіз і формулювання висновків, оформлення патентної заявки).*

7. Пат. 106836 Україна, МПК А61М 1/00. Пристрій для інкапсуляції біоматеріалів / Д. М. Тарусін, В. С. Зайков, О. Ю. Петренко ; власник ІПКіК НАН України. - № u201510854 ; заявл. 06.11.2015 ; опублік. 10.05.2016, Бюл. № 9. *(Внесок здобувача: розробка та конструювання приладу для генерації високої напруги та оптимізація його функціонування для отримання однорідних АМС, аналіз і формулювання висновків, оформлення патентної заявки).*

Наукові праці, які засвідчують апробацію матеріалів дисертації

8. Тарусин Д. Н. Устойчивость мезенхимальных стромальных клеток, инкапсулированных в альгинатные микросферы, к краткосрочному хранению при положительных температурах / Д. Н. Тарусин, В. С. Зайков, В. В. Муценко, Ю. А. Петренко // Проблемы криобиологии и криомедицины. — 2014. — Т. 24, № 2. — С. 183. — рос., англ.

9. Тарусин Д. Н. Инкапсуляция в альгинатные микросферы – перспективный подход для транспортировки и краткосрочного хранения клеток / Д. Н. Тарусин, В.

- С. Зайков, В. В. Муценко, Ю. А. Петренко, А. Ю. Петренко // *Ukr. Biochem. J.* — 2014. — V. 86, № 5. — С. 221. — (Suppl. 2).
10. Petrenko A. Yu. Cryopreservation of Mesenchymal Stromal Cells in Suspension and in Alginate Microspheres / A. Yu. Petrenko, V. S. Zaikov, A. I. Pravduk, N. A. Trufanova, D. N. Tarusin, Yu. A. Petrenko // *Society for Low Temperature Biology 50th Anniversary Celebration, Annual Scientific Conference & AGM in London, UK. October 2014.* P. 26.
11. Petrenko A. Low temperature preservation of mesenchymal stromal cells seeded in various scaffolds for tissue equivalent development / A. Petrenko, V. S. Zaikov, V. V. Muzenko, D. N. Tarusin, H. Erlich // *J Cell Sci Ther.* — 2015. — V.6, № 2. — P. 118.
12. Тарусин Д. Н. Влияние гипотермического хранения в различных средах на жизнеспособность и метаболическую активность мезенхимальных стромальных клеток в составе альгинатных микросфер / Д. Н. Тарусин, В. С. Зайков, В. В. Муценко, Ю. А. Петренко // *Проблемы криобиологии и криомедицины.* — 2015. — Т.25, №2. — С. 183.
13. Tarusin D. N. Encapsulation in alginate microspheres reduces mesenchymal stromal cell death during storage / D. N. Tarusin, V. S. Zajkov, Y. A. Petrenko, A. Y. Petrenko // *Cryobiology.* — 2015. — V.71, № 3. — P. 561.
14. Tarusin D. Encapsulation in alginate microspheres enhances viability of mesenchymal stromal cells for efficient transport/short-term storage // *Conference for Young Scientists (CYS-2015) in Kiev, Ukraine. September 2015.* P. 43.
15. Petrenko A. Proliferation and differentiation potential of human adult mesenchymal stromal cells in three-dimensional culture. The effect of storage at cryogenic and ambient temperatures / A. Petrenko, V. Muzenko, E. Rogulska, V. Zaikov, S. Mazur, D. Tarusin, H. Erlich, Y. Petrenko // *International Conference on Advances in Cell Biology and Biotechnology in Lviv, Ukraine. October 2015.* P.15.
16. Tarusin D. N. Cause of Encapsulated Mesenchymal Stromal Cells Tolerance to Short-Term Storage / D. N. Tarusin, V. V. Mutsenko, V. S. Zaikov // *Problems of Cryobiology and Cryomedicine.* — 2016. — V.26, № 2. — P. 164.

АНОТАЦІЯ

Тарусін Д.М. Гіпотермічне зберігання та кріоконсервування мезенхімальних стромальних клітин у складі альгінатних микросфер. — Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.19 – кріобіологія. – Інститут проблем кріобіології і криомедицини НАН України, Харків, 2018.

Дисертаційна робота присвячена визначенню впливу інкапсуляції у альгінатні микросфери (АМС) шляхом електророзпилення на загальнобіологічні та специфічні властивості мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин (МСК) дерми людини, а також їх чутливості до кріоконсервування та зберігання за позитивних температур.

Встановлено, що отримання стабільних та однорідних за формою і розміром АМС, що містять МСК, із застосуванням методу електророзпилення з використанням напруги ≤ 7 кВ не впливає на життєздатність інкапсульованих

клітин. З'ясовано, що зниження метаболічної активності, мембранного потенціалу мітохондрій, пригнічення адгезивної та проліферативної активностей МСК, інкапсульованих в АМС, які виявляються в перебігу культивування, носять оборотний характер. Із залученням чисельного моделювання визначені коефіцієнти проникності мембран МСК для молекул води та диметилсульфоксиду (ДМСО) та виявлене уповільнення осмотичної реакція МСК у складі АМС. Теоретично визначено та експериментально доведено, що кріоконсервування МСК у складі АМС під захистом 1 М ДМСО зі швидкостями охолодження 0,5 і 1 °С/хв забезпечує високу збереженість клітин. Інкапсуляція в АМС сприяє збереженню загальнобіологічних властивостей та диференціувального потенціалу МСК при утриманні у культуральному середовищі за температур 22 та 37 °С до 3-х діб. Зберігання за температури 4 °С у розчинах ССР та UW дозволяє отримати високі показники збереження МСК незалежно від інкапсуляції впродовж 7-х діб.

Ключові слова: мультипотентні мезенхімальні стромальні клітини, альгінатні мікросфери, електророзпилення, кріоконсервування, гіпотермічне зберігання, метаболічна активність, мембранний потенціал мітохондрій, адгезія, проліферація, диференціувальний потенціал.

АННОТАЦІЯ

Тарусин Д.Н. Гипотермическое хранение и кріоконсервирование мезенхимальных стромальных клеток в составе альгинатных микросфер. – Квалификационная научная работа на правах рукописи.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.19 – криобиология. – Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, Харьков, 2018.

Диссертационная работа посвящена определению влияния инкапсуляции в альгинатные микросферы (АМС) с применением электрораспыления на общебиологические и специфические свойства мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (МСК) дермы человека, а также их чувствительности к кріоконсервированию и хранению при положительных температурах.

Определены и отработаны условия получения однотипных по размеру и форме АМС с применением метода электрораспыления, что осуществлялось с помощью устройства, способного генерировать напряжение ≤ 7 кВ. Установлено, что процедура получения АМС, содержащих МСК, с использованием определенных в работе параметров не влияет на жизнеспособность инкапсулированных клеток. Снижение метаболической активности и мембранного потенциала митохондрий МСК в составе АМС, проявляющиеся в ходе культивирования, носят обратимый характер. МСК, извлеченные из АМС и помещенные в условия монослойного культивирования, способны к адгезии, пролиферации и к индуцированной мультилинейной дифференцировке.

Исследована осмотическая реакция МСК в суспензии и в составе АМС при экспозиции клеток в 1 М растворе диметилсульфоксида (ДМСО), на ее основе методами численного моделирования определены коэффициенты проницаемости мембран МСК для молекул воды и ДМСО. Используя их, удалось спрогнозировать

изменение объема клеток при различных скоростях охлаждения до $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ суспензий МСК и АМС с клетками. Выявлено, что осмотическая реакция МСК в составе АМС замедлена по сравнению с клетками в суспензии, а охлаждение со скоростями $0,5\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ и $1\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ обеспечивает достижение клетками степени дегидратации, достаточной для успешного криоконсервирования. Скорости охлаждения $10\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ и $20\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ не позволяют достигать существенной дегидратации МСК, что предполагает высокую вероятность внутриклеточной кристаллизации при криоконсервировании. Проведенные экспериментальные исследования подтвердили прогнозируемые результаты: жизнеспособность МСК в суспензии и в составе АМС после криоконсервирования с 1 M ДМСО со скоростями охлаждения $0,5\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ и $1\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ составляла не менее 75% , криоконсервирование со скоростями охлаждения $10\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ и $20\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ приводило к гибели около 80% клеток.

Проведено сравнительное изучение структурно-функционального состояния МСК, хранившихся при температурах 4 , 22 и $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ в виде суспензии или в составе АМС в культуральной среде в течение 3 суток. Показано, что хранение МСК в виде суспензии при всех указанных температурах приводит к снижению жизнеспособности клеток. МСК в составе АМС более устойчивы к условиям хранения, чем суспензия МСК. После хранения в АМС при 22 и $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ МСК демонстрировали высокую жизнеспособность (78 и 87% , соответственно), метаболическую активность (79 и 75%) способность к адгезии (62 и 70%) и индуцированным дифференцировкам в остеогенном и адипогенном направлениях.

Гипотермическое хранение при температуре $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ в специализированных растворах – растворе Университета Висконсина (UW) и сахарозо-содержащем растворе (ССР) – обеспечивает высокую степень сохранности МСК как в суспензии, так и в составе АМС на протяжении 7-ми суток: МСК в суспензии и в составе АМС сохраняют жизнеспособность на уровне 60 – 80% . При возврате клеток в условия монослойного культивирования они адгезируют, пролиферируют и проявляют способность к индуцированной дифференцировке в адипогенном и остеогенном направлениях.

Ключевые слова: мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки, альгинатные микросферы, электрораспыление, гипотермическое хранение, криоконсервирование, метаболическая активность, мембранный потенциал митохондрий, адгезия, пролиферация, дифференцировочный потенциал.

ANNOTATION

Tarusin D.M. Hypothermic storage and cryopreservation of mesenchymal stromal cells in alginate microspheres. – The qualifying research paper as a manuscript.

Dissertation for the candidate of biological sciences degree in specialty 03.00.19 – Cryobiology. – Institute for problems of cryobiology and cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkiv, 2018.

The thesis is devoted to determine the effect of encapsulation in alginate microspheres (AMS) by electrospray on general biological and specific properties of multipotent mesenchymal stromal cells (MSCs) derived from human dermis, and their sensitivity to cryopreservation and storage at positive temperatures.

It was established that obtaining of stable and homogeneous in form and size AMS containing MSC using the electrospray method with a voltage ≤ 7 kV does not affect the viability of encapsulated cells. It was found that reduction of metabolic activity, membrane potential of mitochondria, inhibition of adhesive and proliferative activity of AMS-encapsulated MSCs, which are revealed during cultivation, are reversible. With the involvement of numerical simulation, coefficients of permeability of MSCs membranes for water molecules and dimethyl sulfoxide (DMSO) were determined and the oscillatory reaction of MSCs in the AMS was found to slow down. It was theoretically determined and experimentally proved that cryopreservation of MSCs in the AMS under protection of 1 M DMSO with cooling rates of 0.5 and 1 °C/min provides high cell viability. Encapsulation in the AMS contributed to the preservation of the general biological properties and the differentiation potential of MSCs when maintained in a culture medium at temperatures of 22 and 37 °C for up to 3 days. Storage at 4 °C in solutions of the SBS and UW allows for high maintenance of MSCs regardless of encapsulation within 7 days.

Keywords: multipotent mesenchymal stromal cells, alginate microspheres, electrospray, hypothermic storage, cryopreservation, metabolic activity, mitochondrial membrane potential, adhesion, proliferation, differentiation potential.

