

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ ПРОБЛЕМ КРІОБІОЛОГІЇ І КРІОМЕДИЦИНИ

ТИХВИНСЬКА ОЛЬГА ОЛЕКСАНДРІВНА

УДК 57.086.13:601.2:611.013.395:615.382

**КРІОКОНСЕРВУВАННЯ, ТРИВИМІРНЕ КУЛЬТИВУВАННЯ І
РАНОЗАГОЮВАЛЬНА ДІЯ МЕЗЕНХІМАЛЬНИХ СТРОМАЛЬНИХ КЛІТИН
У СЕРЕДОВИЩАХ НА ОСНОВІ ПЛАЗМИ КРОВІ**

03.00.19 – кріобіологія

АВТОРЕФЕРАТ

дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

Харків – 2020

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,
Інститут проблем ендокринної патології імені
В. Я. Данилевського НАМН України, завідувач
лабораторії фармакології;

кандидат біологічних наук
Скоробогатова Наталія Григорівна,
Інститут медичної радіології та онкології
імені С.П. Григор'єва НАМН України, старший
науковий співробітник.

Захист відбудеться «___» _____ 2020 р. о _____ годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 64.242.01 Інституту 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 «___» _____ 2020 р.

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради

О. В. Фалько

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Обґрунтування вибору теми дослідження. Безальтернативною передумовою широкого використання мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин (МСК) в експериментальній біології та регенеративній медицині є застосування технологій кріоконсервування, що забезпечує збереження достатньої кількості біологічно активного матеріалу, невідкладного надання його за вимогою, можливість багаторазового залучення ідентичного біоматеріалу.

Чисельні роботи в цій галузі показали ефективність кріоконсервування суспензій МСК з використанням двоступеневого заморожування у присутності проникаючого кріопротектора ДМСО (у концентрації 10%) та 20% ембріональної сироватки (ЕС) телят (Thirumala S. et al., 2013). Наявність у кріозахисному середовищі (КЗС) компонентів ксеногенного походження та відома токсична дія ДМСО потребує видалення цих компонентів перед застосуванням (Galvao J. et al., 2014, Madsen B.K. et al., 2019). Це ускладнює, здорожчує, робить тривалішою процедуру деконсервування і призводить до втрати частини клітин. У зв'язку з цим є актуальною розробка підходів, які дозволяють зменшити у КЗС концентрацію ДМСО та замінити ксеногенну сироватку безпечними та доступними компонентами аналогічної дії. Раніше було показано, що обробка культивованих МСК сахаридами перед кріоконсервуванням без залучення до кріозахисного середовища ДМСО та ЕС дозволяє значно збільшити життєздатність та метаболічну активність деконсервованих клітин (Petrenko Y.A. et al., 2014). Модифікація складу КЗС може стати подальшим кроком удосконалення цього методу кріоконсервування МСК.

Як потенціальна складова КЗС увагу до себе привертає плазма крові людини. Її природна біосумісність, висока доступність та існуюча нормативна політика в медичній сфері сприяють розробці біотехнологічних протоколів з її застосуванням. Залучення плазми отримує додаткову актуальність у світлі розвитку персоналізованої медицини, яка передбачає використання матеріалів, розроблених на основі власних клітин і тканин пацієнта. Особливістю плазми крові є здатність утворювати гідрогелі у присутності протеолітичного ферменту тромбіну та іонів Ca^{2+} , що надає певні переваги з огляду на створення носіїв для підтримки МСК в умовах тривимірного культивування та задля адресної доставки клітин у місце пошкодження. Сучасні вимоги до носіїв, що повинні при цьому задовольнятися: наявність тривимірної просторової структури, забезпечення адгезії клітин, сприяння їхній проліферації та розвитку, а також біосумісність, неімуногенність і біодеградуємість (Miguel L. et al, 2014).

Для оцінки ефективності кріоконсервування МСК та їхньої взаємодії з тривимірними носіями поряд з класичними методами оцінювання морфофункціональних властивостей клітин *in vitro* необхідно проводити аналіз їхньої дії в умовах *in vivo* після імплантації. На теперішній час повноцінне загоєння шкірних ран різної етіології є значною медико-біологічною та соціальною проблемою, що потребує розробки нових та удосконалення існуючих методів лікування (Rodgers K. et al., 2018). В межах сучасної біотехнології постає задача

створення підходів, які, окрім пасивного покриття і захисту ранової поверхні, забезпечували б адресну доставку лікарських засобів, біологічно активних речовин або клітин із залученням матриць-носіїв.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами, грантами.

Робота виконана у відділі кріобіохімії Інституту проблем кріобіології і кріомедицини НАН України в рамках науково-дослідної теми «Низькотемпературне консервування стовбурових клітин у складі тривимірних структур» (шифр – 2.2.6.112, номер державної реєстрації 0112U003132).

Мета і завдання дослідження. Метою даної роботи було визначення окремих умов кріоконсервування МСК та формування тривимірних носіїв клітин, придатних для застосування *in vitro* та *in vivo*, з використанням середовищ на основі плазми крові людини.

Для досягнення цієї мети були поставлені наступні завдання:

1. Оцінити можливість використання гідрогелю з плазми крові для створення тривимірних носіїв МСК.
2. Розробити спосіб формування моделі повношарової ексцизійної рани шкіри у мишей та визначити вплив МСК у складі гідрогелю з плазми крові на процес ранозагоєння.
3. Модифікувати метод кріоконсервування МСК, який включає попередню обробку сахарозою, шляхом введення до кріозахисного середовища плазми крові людини.
4. Визначити метаболічну активність МСК до і після кріоконсервування модифікованим методом при культивуванні в моношарі та у складі гідрогелю на основі плазми крові.
5. Встановити особливості загоєння повношарових ексцизійних ран шкіри у мишей після нанесення на рану кріоконсервованих та летально пошкоджених МСК у гідрогелі на основі плазми крові.
6. Оцінити тривалість перебування кріоконсервованих клітин на поверхні ексцизійних ран шкіри за допомогою МСК мишей, трансгенних за зеленим флуоресцентним білком.

Об'єкт дослідження – збереженість, метаболічна активність та репаративний потенціал МСК у тривимірному гелевому носії в умовах *in vitro* та *in vivo* до і після кріоконсервування.

Предмет дослідження – мультипотентні мезенхімальні стромальні клітини, кріоконсервовані з використанням плазми крові, при моношаровому та тривимірному культивуванні та застосуванні на експериментальних ранах у мишей.

Методи дослідження. В роботі використані сучасні методи кріобіології, клітинної біології та біохімії: культивування *in vitro*, програмне заморожування, цитохімія, світлова та флуоресцентна мікроскопія, моделювання повношарових ексцизійних шкірних ран, планіметрія, гістологічні дослідження, статистичний аналіз результатів.

Наукова новизна отриманих результатів. У дисертаційній роботі вперше доведена ефективність застосування плазми крові як основного компонента КЗС для

кріоконсервування попередньо оброблених сахарозою МСК із залученням мінімальних концентрацій ДМСО. Показано, що кріоконсервування МСК в плазмі крові за відсутності ДМСО з додаванням 0,2 М сахарози дозволяє зберегти до 60% життєздатних клітин, а внесення лише 1% ДМСО забезпечує отримання суспензії кріоконсервованих МСК зі збереженістю 77% і метаболічною активністю на рівні клітин, кріоконсервованих у присутності 10% ДМСО.

У роботі вперше показана можливість використання плазми крові для створення біоінженерної конструкції з кріоконсервованими клітинами безпосередньо після відігріву без етапу відмивання від кріопротекторів. Новими є результати дослідження метаболічної активності МСК при культивуванні у складі таких біоінженерних конструкцій.

Вперше проведено дослідження репаративного потенціалу кріоконсервованих (к/к) у плазмі крові із сахарозою, а також летально пошкоджених (л/п) МСК на моделі ексцизійної рани шкіри у мишей. Показано, що к/к-МСК сприяють процесу ранозагоєння на рівні некріоконсервованих (н/к) МСК, а л/п-МСК демонструють короткостроковий ефект.

У дисертаційній роботі вперше здійснена візуалізація на поверхні ексцизійної рани шкіри МСК, позитивних за зеленим флуоресцентним білком (ЗФБ⁺-МСК), після кріоконсервування запропонованим способом.

Практичне значення отриманих результатів. Експериментальне обґрунтування окремих умов кріоконсервування МСК може бути використане для вдосконалення технологічного процесу отримання на їхній основі біоінженерних конструкцій, готових до застосування *in vitro* та *in vivo*, а також створення низькотемпературних банків цих клітин. Розроблений спосіб формування моделі повношарових ексцизійних шкірних ран у мишей (Патент України № 116408) з мінімізацією контракції країв ураженої ділянки шкіри може знайти широке застосування в експериментальній медицині. Отримані результати щодо скорочення терміну загоєння ексцизійних шкірних ран під дією кріоконсервованих МСК може бути підґрунтям для розробки нових методів корекції травматичних ушкоджень шкіри.

Особистий внесок здобувача. Дисертаційна робота є самостійним науковим дослідженням. Автором дисертаційної роботи проведений патентно-інформаційний пошук, аналітичний огляд літератури, отримані результати експериментальних досліджень, проведений їхній аналіз та статистична обробка. Разом з науковим керівником визначені мета, завдання дослідження і шляхи їх вирішення, обговорені й узагальнені отримані результати, а також 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 конференції молодих вчених ІПКіК НАН України «Холод в біології та медицині» (Харків, 2017); міжнародній конференції «Сьогодні біологічної науки» (Україна, Суми, 2018); 2-й Всеукраїнській науково-практичній конференції «Теорія та практика сучасної морфології» (Дніпро, 2018); 3-

й міжнародній конференції «Smart Bio» (Литва, Каунас, 2019); міжнародній конференції «SLTB2019» (Spain, Seville, 2019).

Публікації. За результатами дисертаційної роботи опубліковано 11 наукових праць, серед них 5 статей у фахових наукових виданнях, дві з яких входять до міжнародної наукометричної бази Scopus, 1 патент України на корисну модель, 5 тез доповідей на конференціях.

Об'єм та структура дисертації. Дисертаційна робота викладена на 156 сторінках друкованого тексту (з яких 101 сторінка основної частини) і містить наступні розділи: анотація, вступ, огляд літератури, матеріали і методи, 2 розділи результатів власних досліджень, узагальнення, висновки, список літератури. Список літератури, розміщений на 27 сторінках, включає 219 джерел, у тому числі 203 зарубіжних. Робота проілюстрована 40 рисунками та 4 таблицями.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Огляд літератури. У розділі представлений аналіз експериментальних та теоретичних даних літератури, що стосуються структурно-функціональних характеристик МСК досліджень їхнього терапевтичного потенціалу при застосуванні у складі тривимірних носіїв, та перспектив розвитку напрямів біоінженерії та клітинної терапії на основі МСК. Розглянуті сучасні підходи до кріоконсервування МСК.

Матеріали і методи дослідження. У розділі надана характеристика об'єктів, методів і матеріалів дослідження.

Дослідження проведено на базі наукових підрозділів Інституту проблем кріобіології і кріомедицини НАН України (м. Харків), відповідно до принципів роботи на тваринах, схвалених Комітетом з біоетики ІПКіК НАН України (протокол № 5 від 26.11.2019 р.).

В експериментах використовували культури МСК людини, отримані з жирової тканини дорослих пацієнтів-волонтерів 23–54 років. Культури були заготовлені з дотриманням рекомендацій Гельсінської декларації Всесвітньої медичної асоціації з проведення біомедичних досліджень, зберігались у кріобанку ІПКіК НАН України і за імунофенотипичними властивостями та диференціувальним потенціалом відповідають критеріям МСК (Rogulska O.Yu. et al., 2017). Окремі дослідження були виконані з використанням МСК, отриманих з жирової тканини мишей лінії FVB-Cg-Tg (GFPU) 5Nagy, трансгенних за зеленим флуоресцентним білком, які були надані співробітниками ДУ «Інститут генетичної та регенеративної медицини НАМН України», м. Київ, Україна.

Культивування МСК проводили при 37°C, 95% вологості і 5% CO₂ у культуральному середовищі (КС) на базі α -MEM («Sigma-Aldrich», США) з 10% ЕС («Biowest», Франція), 2 мМ L-глутаміну («Sigma-Aldrich», США), 50 мкг/мл стрептоміцину та 50 од/мл пеніциліну. При моношаровому культивуванні по досягненню 80% конфлюенту клітини пересівали за стандартною методикою. Для

експериментів використовували клітини 4 пасажу. Кількість клітин підраховували у камері Горяєва за загальноприйнятою методикою.

Для отримання плазми, збідненої на тромбоцити (ПЗТ), цільну обстежену кров дорослих донорів ($n=5$), надану Харківським обласним центром служби крові, піддавали двоетапному центрифугуванню (Obata S. et al., 2012.). Фракція ПЗТ містила менше 5×10^4 тромбоцитів/мкл.

Сироватку крові, яка слугувала джерелом тромбіну, отримували з коагульованої крові шляхом центрифугування.

Для приготування гелю з плазми крові (ГП) фракцію ПЗТ з'єднували в об'ємному співвідношенні 9:1 із сумішшю сироватки крові та 10% CaCl_2 , що були взяті у співвідношенні 3:1 (загальне об'ємне співвідношення компонентів 9:0,75:0,25).

Для отримання біоінженерної конструкції – МСК у складі гелю – процедури гелювання піддавали ПЗТ із суспендованими в ній МСК (5×10^6 клітин/мл).

Для оцінки метаболічної активності МСК використовували редокс-індикатор Alamar Blue (AB, «Serotec», США) (Rampersad S. et al., 2012). Вміст відновленої форми AB визначали на спектрофлуориметрі Tecan GENios (Австрія) при хвилі збудження 550 нм та хвилі емісії 590 нм і виражали в умовних одиницях флуоресценції (УОФ).

Кріоконсервування суспензій МСК здійснювали на основі методу, що включає етап попередньої обробки сахаридами (Petrenko Y.A. et al., 2014; Rogulska O. et al., 2017), з певними модифікаціями. Коротко, перед кріоконсервуванням проводили попередню обробку МСК шляхом культивування протягом 24 год у КС з 0,1 М сахарозою. Заморожування суспензій МСК здійснювали у КЗС на базі α -МЕМ або ПЗТ, з додаванням 0,2 М сахарози і ДМСО в концентраціях від 0% до 10%. Після 5-хвилинної експозиції при 4-8°C у КЗС проводили програмне заморожування зі швидкістю 1 град/хв до -80°C, після чого зразки занурювали в рідкий азот. Відігрівання здійснювали на водяній бані при 37-40°C.

Для отримання летально пошкоджених МСК клітини піддавали триразовому швидкому заморожуванню (занурення в рідкий азот) – відігріванню.

Збереженість клітин безпосередньо після відігрівання визначали за забарвленням трипановим синім (0,4%; Selgen P.O., 1976). Оцінку метаболічної активності кріоконсервованих МСК за АВ-тестом проводили через 24 години рекультивування.

Розташування та стан клітин у складі тривимірних гідрогелів досліджували за допомогою забарвлення флуоресцеїн діацетатом (ФДА) (2 мкг/мл; «Sigma-Aldrich», США) та етидія бромідом (ЕБ) (4 мкг/мл, «Sigma-Aldrich», США) з використанням флуоресцентного мікроскопа Inverso EpiFluor («СЕТІ», Бельгія).

Моделювання ексцизійних повношарових ран шкіри проводили на мишах-самцях лінії Balb/C ($n = 94$). Рани наносили після здійснення загальної анестезії (2% р-н седазину в/м і 1% р-н пропофолу в/ч) на спині, з дотриманням правил асептики і антисептики за допомогою дермопанча діаметром 6 мм (Galiano R. D. et al., 2004).

Для запобігання контракції ран застосовували модифікований нами метод (Патент України № 116408, 2017).

Рани, що загоювалися самостійно, виступали як контроль. На рани експериментальних груп наносили 50 мкл приготованого *ex tempore* ГП або гелю з клітинами, кількість клітин на рану становила $0,25-0,3 \times 10^6$. Після завершення процесу полімеризації всі рани накривали напівпроникною плівкою («Tegaderm Film», Німеччина) і накладали зовнішню пов'язку за допомогою еластичного бинта.

Оцінку загоєння повношарових ран шкіри здійснювали на 3-ю, 7-у, 14-у та 28-у добу. Планіметричні виміри проводили на фотографіях за допомогою програми ImageJ 1.5b. Гістологічні зрізи товщиною 5-6 мкм отримували на кріотомі Slee Cryostat MEV («Slee Medical GmbH», Німеччина), зневоднювали та фарбували гематоксилином та еозином за стандартною методикою. Гістологічне дослідження отриманих препаратів проводили з використанням світлового мікроскопа, обладнаного цифровою камерою DCM300 («JNOEC», Японія). Морфометричне визначення кількості новоутворених судин проводили в 10-ти довільно обраних стандартизованих полях зору площею 140 мкм^2 на гістологічних зрізах з використанням програми ImageJ 1.5b.

ЗФБ⁺-МСК культивували, кріоконсервували та вміщували у гель, як описано вище. Флуоресцентне виявлення ЗФБ⁺-МСК на поверхні ран шкіри проводили через 30 хв, на 1-у, 3-ю та 5-у добу після нанесення за допомогою конфокального мікроскопа Zeiss LSM 510 META («Carl Zeiss», Німеччина).

Отримані в роботі експериментальні дані обробляли статистично. Оцінку нормальності розподілу отриманих результатів проводили за допомогою критерію Шапіро-Уїлка. Для кількісної оцінки відмінностей між декількома групами використовувався критерій Крускала-Уолліса. Відмінності вважали достовірними при значеннях $p \leq 0,05$. Отримані результати були оброблені з використанням програми Past v. 3.0.

Результати власних досліджень та їх обговорення

Тривимірний гідрогель з плазми крові як носій для МСК. Як матеріал задля отримання гелевого носія для МСК була обрана фракція плазми крові, збіднена на тромбоцити, з метою нівелювати дію біологічно активних речовин, що входять до складу тромбоцитів і можуть самостійно впливати на процес загоєння ран.

В результаті поєднання ПЗТ, яка містить фібриноген, з сироваткою крові (джерелом тромбіну) та 10% CaCl_2 утворювався гідрогель, який підтримував свою просторову структуру в стандартних умовах культивування щонайменше протягом 5-ти діб. Внесення МСК в ПЗТ перед ініціюванням гелеутворення дозволило отримати тривимірну біоінженерну конструкцію, в якій клітини розташовувалися рівномірно по об'єму носія (рис. 1). При культивуванні в ГП МСК набували фібробластоподібного вигляду, розмножувались і формували просторові міжклітинні контакти.

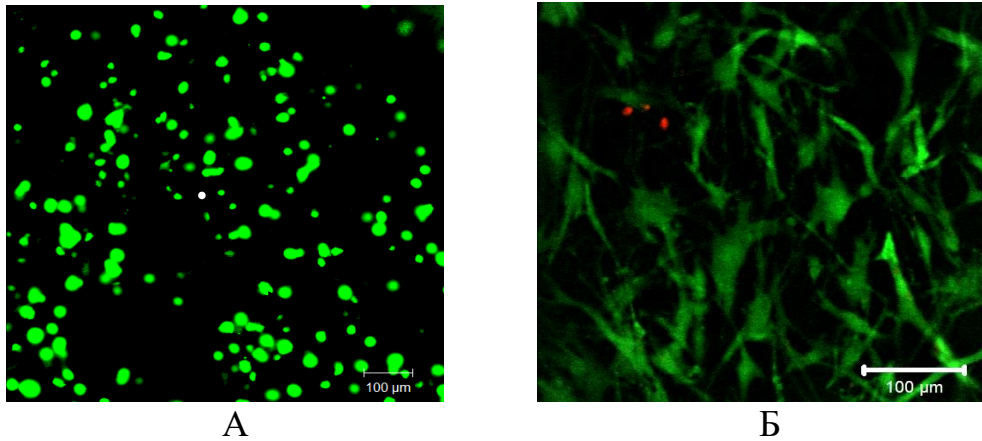


Рис. 1. МСК у гідрогелі з плазми крові на 4-у годину (А) і 3-ю добу (Б) тривимірного культивування.

Флуоресцентна мікроскопія, забарвлення FDA/EB.

Метаболічна активність МСК за результатами АВ-тесту зростала в перебігу культивування (рис. 2).

Таким чином, ГП є біосумісним з МСК, створює їм умови життєдіяльності, наближені до фізіологічних, враховуючи просторове розташування клітин, та забезпечує реалізацію МСК загальних морфофункціональних властивостей *in vitro*.

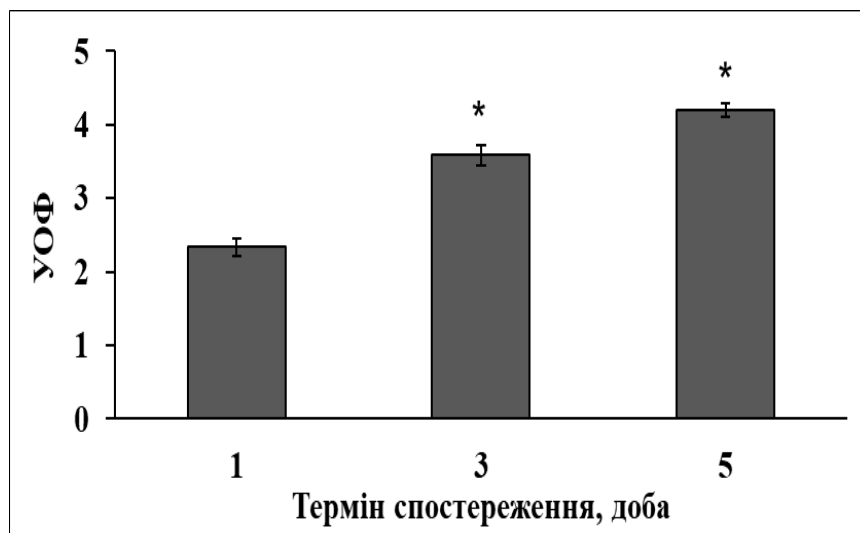


Рис. 2. Метаболічна активність МСК за АВ-тестом в умовах тривимірного культивування в гідрогелі з плазми крові.

Примітка: * – відмінності значущі ($p \leq 0,05$) у порівнянні із попереднім терміном спостереження.

З метою виявлення репаративного потенціалу *in vivo* МСК у ГП наносили на поверхню повношарових ексцизійних ран мишей. Фізико-хімічні властивості ГП відповідають характеристикам натурального матрикса (Bensaid W. et al., 2003), а

його здатність гелюватися протягом кількох хвилин після змішування основних компонентів забезпечує рівномірне заповнення шкірних дефектів.

Проведені планіметричні дослідження показали, що швидкість закриття ран з нанесеним ГП суттєво не відрізнялася від швидкості самостійного закриття ранових дефектів (контролю) протягом всього періоду спостереження (рис. 3). В разі нанесення на рану ГП з МСК зменшення площі відкритої поверхні рани значуще відрізнялося від показників інших груп протягом перших 7-и діб спостереження: відсоток закриття ранової поверхні для цієї групи на 3-ю добу після травми складав $29,5 \pm 6,9\%$, на 7-му добу – $52,2 \pm 5,1\%$. На 14-ту добу спостерігалася повна епітелізація ран усіх експериментальних груп.

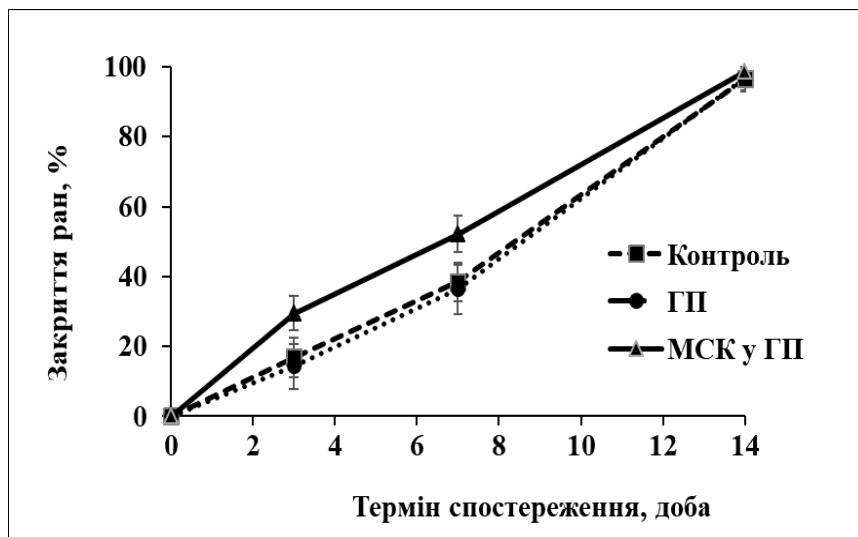


Рис. 3. Закриття поверхні ексцизійних ран шкіри у мишей при самостійному загоєнні (контроль), з нанесенням на рану ГП та МСК у ГП.

Примітка: * - відмінності значущі ($p \leq 0,05$) у порівнянні з контролем і групою ГП.

Особливості відновлення епідермісу та підлягаючих тканин вивчалися надалі на гістологічних зрізах (рис. 4). На 3-ю добу після ексцизії в ранах із самостійним загоєнням спостерігалася заповнення дефекту фібрином, у прилеглих тканинах виявлялася інтенсивна дифузна інфільтрація поліморфноядерними лейкоцитами, судини були розширені та повнокровні, що в цілому є характерним для протікання ранового процесу у фазі запалення. Гістологічна картина на 7-у добу спостереження відповідала ранньому періоду розвитку грануляційної тканини, основу якої складали новоутворені судини капілярного типу. Також спостерігалася формування крайового епітеліального пласта, що підростав під струп. На 14-у добу у дозріваючій грануляційній тканині відмічалася збільшення числа сполучнотканинних клітин. На фоні повної епітелізації ранової поверхні спостерігались ділянки з частковою десквамацією неповношарового епітеліального пласта, що було ознакою незрілості грануляційної тканини. На 28-у добу новоутворена сполучна тканина являла собою достатньо щільну рубцеву тканину з

грубими, хаотично розташованими пучками колагенових волокон, в дермі формувалися волосяні фолікули та сальні залози, повношаровий епідерміс був потовщений і мав згладжений мікрорельєф, що можна вважати ознакою незавершеності фази ремоделювання.

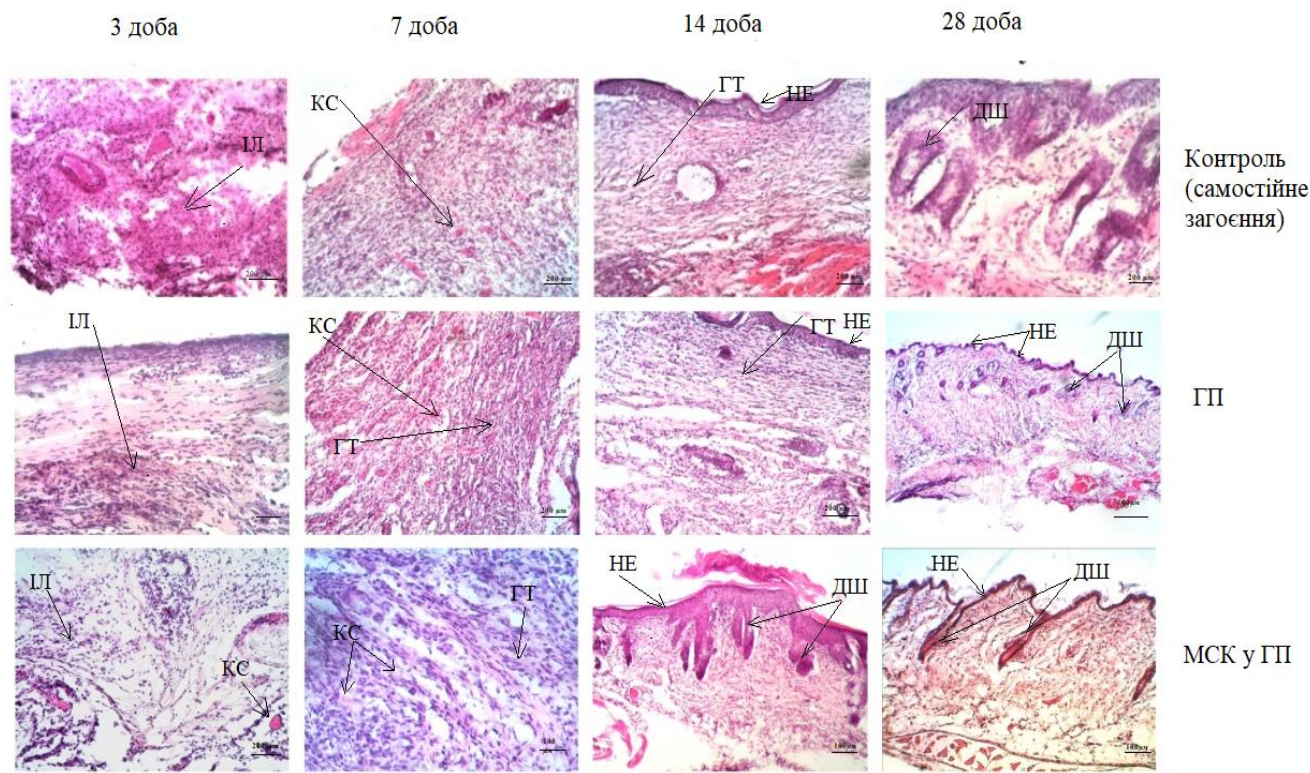


Рис. 4. Гістологічна картина загоєння ексцизійних ран шкіри у мишей при самостійному загоєнні та після нанесення на рану ГП і МСК у ГП. Забарвлення гематоксиліном та еозином.

Примітки: ІЛ – інфільтрація лейкоцитами; ГТ – грануляційна тканина; НЕ – новоутворений епітелій; ДШ – деривати шкіри; КС – капілярні судини.

Процес ранозагоєння в експериментальній групі з нанесенням ГП мав деякі відмінності. Так, на 3-ю добу посилена лейкоцитарно-макрофагальна інфільтрація свідчила про більш інтенсивне запалення, можливо, зумовлене додатковою кількістю фібринових тяжів в рані, але число мікросудин не відрізнялося від контролю (табл. 1). Гістологічна картина на 7-у добу свідчила про дозрівання грануляційної тканини. На 14-у добу виявлялася зріла грануляційна тканина з ознаками трансформації в молоду рубцеву з великою кількістю фібробластів у стадії активного колагеноутворення. До кінця експерименту, 28 діб, дефекти ран із нанесенням ГП заповнювалися менш щільною, ніж в контролі, рубцевою тканиною із впорядковано орієнтованими нижніми колагеновими волокнами, а товщина та мікрорельєф епідерміса відповідали нормальній шкірі.

У ранах із застосуванням МСК у ГП на 3-ю добу спостереження виявлялися тонкостінні судини капілярного типу, що можна розцінювати як початок утворення

грануляційної тканини. На 7-у добу грануляційна тканина цих ран мала ознаки більш зрілої, у порівнянні із попередніми групами, із множинними судинами капілярного типу. На 14-у добу в дермі спостерігалось формування дериватів шкіри. На 28-у добу відновлена частина дерми являла собою нещільну рубцеву тканину, а сформований повношаровий епідерміс мав нормальну товщину і типовий мікрорельєф.

Таким чином, у групі ран з нанесенням МСК у ГП відмічалось прискорення дозрівання грануляційної тканини при більш інтенсивному ангиогенезі (табл. 1) та більш раннє відновлення дермального і епідермального шарів шкіри.

Таблиця 1.

Кількість мікросудин в зоні дефекту при самостійному загоєнні ран (контроль) та після нанесення на рану ГП і МСК у ГП, одиниці в полі зору

Групи	Термін спостереження, доба			
	3	7	14	28
Контроль	1,7 ± 0,2	3,6 ± 0,3	5,8 ± 0,4	7,3 ± 0,4
ГП	1,5 ± 0,4	7,7 ± 0,4*	8,6 ± 0,5*	3,7 ± 0,4
МСК у ГП	2,2 ± 0,5	11,2 ± 1,1*^	13,6 ± 1,2*^	10,5 ± 0,9*^

Примітки: * - відмінності значущі ($p \leq 0,05$) у порівнянні з контролем;

^ - відмінності значущі ($p \leq 0,05$) у порівнянні з групою ГП.

Проведені дослідження дозволили зробити висновок про спроможність гелю на основі плазми крові виступати як адекватний тривимірний носій для МСК, здатний підтримувати реалізацію їхніх властивостей в системах *in vitro* та *in vivo*.

Модифікація методу кріоконсервування МСК із використанням плазми крові. Видалення ксеногенної складової, зниження токсичності з боку кріопротектора, максимальне наближення складу середовища до природного оточення клітин були обрані як провідні напрямки роботи по модифікації методу кріоконсервування МСК.

За основу був обраний метод (Rogulska O., et al 2017), який включає етап культивування МСК протягом 24 год в присутності 0,1 М сахарози, що передуює безпосередньому процесу кріоконсервування у КЗС, яке також містить сахарозу (0,2 М). Такий підхід дозволив авторам отримати деконсервовані МСК зі збереженістю $47,3 \pm 5,9\%$ без залучення ДМСО та ЕС. Нами була здійснена модифікація методу: заміна базового компонента КЗС, поживного середовища α -МЕМ, на ПЗТ. Це покращило результати кріоконсервування до значень збереженості відігрітих клітин на рівні $60,4 \pm 3,9\%$ (рис. 5).

Введення до складу КЗС кріопротектору ДМСО значуще підвищувало життєздатність к/к-МСК: при використанні 10% ДМСО, що є загальноживаною концентрацією при заморожуванні клітинних суспензій, або 5% ДМСО збереженість к/к-МСК сягала більш ніж 80% незалежно від базового компоненту КЗС (α -МЕМ або ПЗТ) (рис. 5). При використанні менших концентрацій ДМСО (1% або 2%) виявлялася значуща перевага застосування КЗС на базі ПЗТ: МСК, кріоконсервовані обраним методом у присутності лише 1% ДМСО в ПЗТ, доповненій 0,2 М сахарози, мали високу збереженість ($77,0 \pm 2,9\%$) безпосередньо після розморожування, порівняно із клітинами, що кріоконсервувалися в КЗС на базі α -МЕМ ($60,8 \pm 3,9\%$).

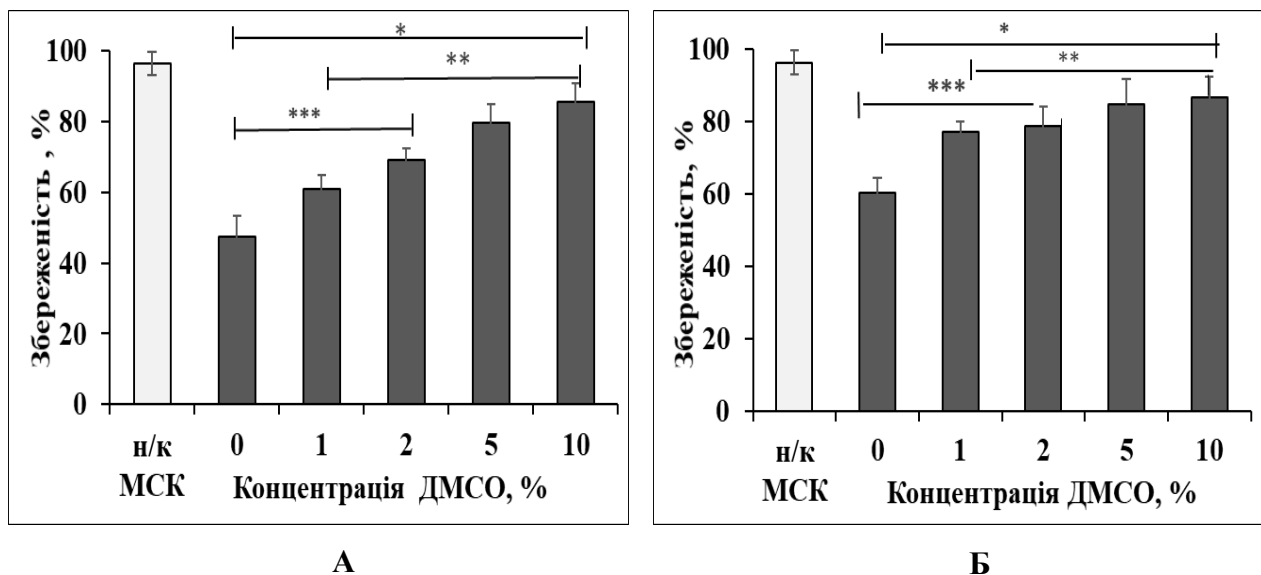


Рис. 5. Збереженість МСК після кріоконсервування в КЗС на базі α -МЕМ (А) та ПЗТ (Б), що містять 0,2 М сахарозу та ДМСО в концентраціях 0–10%.

Примітки: * – відмінності значущі ($p \leq 0,05$) у порівнянні з н/к-МСК;

** – відмінності значущі ($p \leq 0,05$) у порівнянні з 0% ДМСО;

*** – відмінності значущі ($p \leq 0,05$) у порівнянні з 10% ДМСО

Ця перевага підтверджувалася і в подальших дослідженнях к/к-МСК після перенесення їх в моношарову культуру, що моделює повернення в фізіологічні умови: метаболічна активність МСК, кріоконсервованих в середовищі складом ПЗТ + 0,2 М сахарози + 1% ДМСО (ПС1Д), за АВ-тестом після 24 годин рекультивування перевищувала на 27% метаболічну активність МСК, кріоконсервованих у середовищі α -МЕМ + 0,2 М сахарози + 1% ДМСО (рис. 6). Досягнутий рівень метаболічної активності ($1,67 \pm 0,13$ УОФ) не мав значущих відмінностей від показників для МСК, що були кріоконсервовані у присутності більших концентрацій ДМСО і становив 73% від рівня, властивого н/к-МСК. Слід зазначити, що при моношаровому культивуванні к/к-МСК прикріплювалися до пластику, розпластувалися, проліферували і формували типові «поточки» клітин, як це притаманне н/к-МСК.

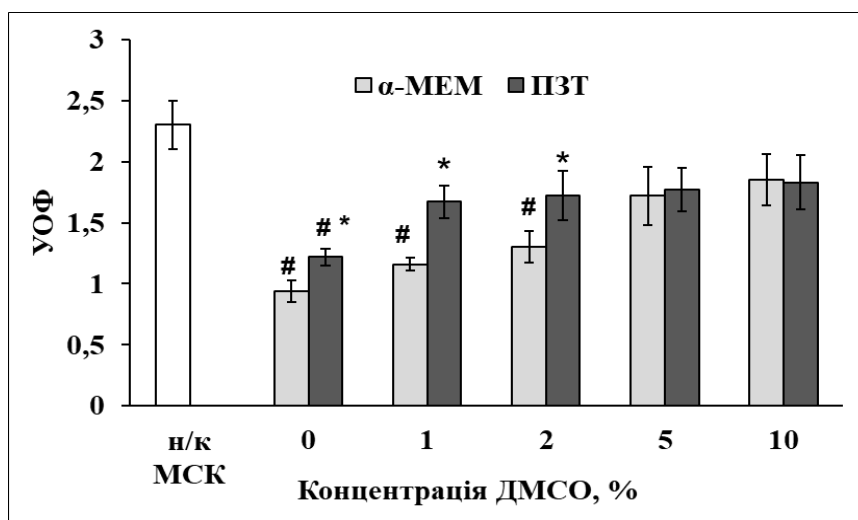


Рис. 6. Метаболічна активність МСК після кріоконсервування в КЗС на базі α -МЕМ або ПЗТ, що містять 0,2 М сахарозу та 0-10% ДМСО.

Примітки: * – відмінності значущі ($p \leq 0,05$) у порівнянні з відповідною групою α -МЕМ;

– відмінності значущі ($p \leq 0,05$) у порівнянні з 10% ДМСО.

Базуючись на отриманих результатах, для подальших досліджень середовище ПС1Д було обране як оптимальна композиція КЗС. Враховуючи, що ПЗТ за обсягом є найбільшою складовою ПС1Д, була перевірена його спроможність до гелеутворення. Було з'ясовано, що після поєднання з сироваткою та CaCl_2 , ПС1Д, як і ПЗТ, утворює стабільні гідрогелеві структури, а гелювання ПС1Д із кріоконсервованими в ньому МСК дозволяє отримувати біоінженерні конструкції одразу після відігрівання.

При тривимірному культивуванні к/к-МСК в гелі ПС1Д клітини набували типового фібробластоподібного вигляду, проліферували і формували характерну тривимірну структуру (рис. 7). У порівнянні з н/к-МСК спостерігалася певна затримка розвитку культури: прикріплення та розпластування МСК в гідрогелі спостерігалися лише на другу добу культивування (рис. 7).

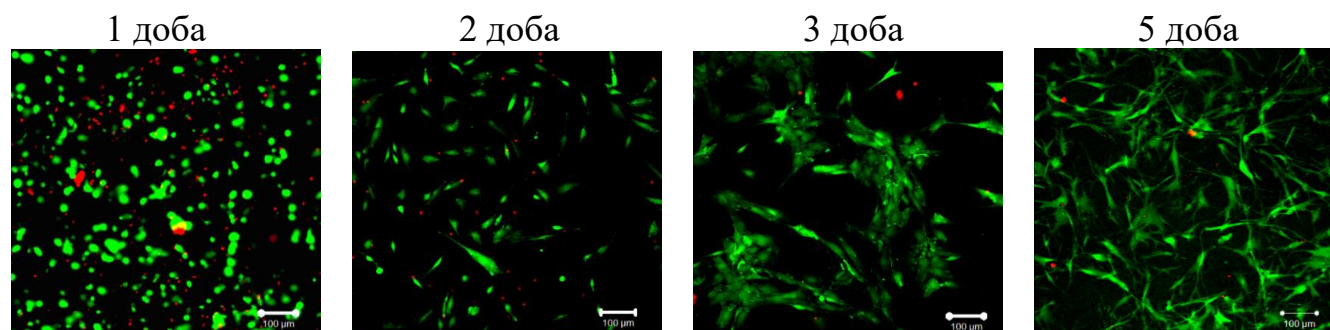


Рис. 7. МСК, кріоконсервовані в КЗС ПС1Д, при тривимірному культивуванні в гелі ПС1Д.

Флуоресцентна мікроскопія, забарвлення ФДА/ЕБ.

Це вносило свій вклад у зниження рівня метаболічної активності к/к-МСК порівняно з н/к-МСК у перші доби тривимірного культивування (рис. 8). Але надалі підвищення метаболічної активності к/к-МСК нівелювало затримку розвитку, що свідчить про збереження проліферативно-метаболічного потенціалу МСК після кріоконсервування обраним методом.

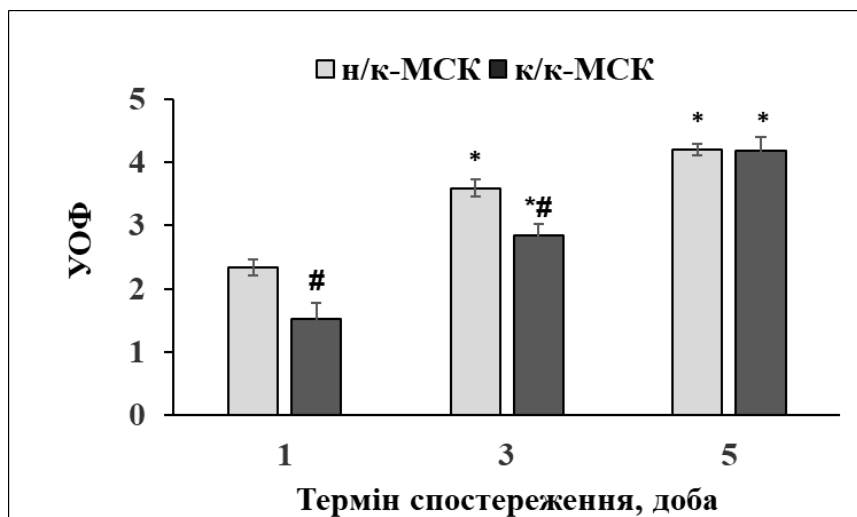


Рис. 8. Метаболічна активність МСК при тривимірному культивуванні у гелі ПС1Д до і після кріоконсервування.

Примітки: * – відмінності значущі ($p \leq 0,05$) у порівнянні з 1-ю добою культивування;

– відмінності значущі ($p \leq 0,05$) у порівнянні з н/к-МСК.

Сучасне уявлення про дію екзогенних МСК в системах *in vivo* спирається в першу чергу на визнання ролі їхньої паракринної дії. Виходячи з цього та враховуючи різницю в поведінці к/к та н/к МСК в перші доби рекультивування, а також факт впливу МСК на процес ранозагоєння вже на ранніх строках спостереження, було визнано доцільним в дослідженнях *in vivo* провести порівняльний аналіз репаративного потенціалу н/к-МСК, к/к-МСК та летально пошкоджених МСК, виходячи з того, що дія останніх реалізується лише через наявні на момент введення клітин біологічні сполуки.

При огляді ран на 3-ю добу експеримента виявлялася візуальна різниця між контрольною групою та ранами усіх трьох груп з нанесенням МСК в ПС1Д, в яких чітко виявлялася кайма крайової епітелізації. Планіметричні дослідження підтвердили ці спостереження: відсоток закриття площі ран з нанесеними н/к-, к/к- та л/п-МСК на 3-ю добу був значно більшим у порівнянні як з контрольними ранами, так і ранами з самим гелем (табл. 2). При цьому, показники для груп н/к-МСК та к/к-МСК значуще не відрізнялися між собою і перевищували рівень контролю в 1,8-1,9 разів, тоді як л/п-МСК забезпечували збільшення площі закриття рани лише в 1,2 рази. Переваги нанесення на рану життєздатних МСК виявлялися і

на наступний строк спостереження. На 14-у добу рани усіх груп були практично повністю епітелізовані.

Слід зазначити, що проведені планіметричні та подальші гістологічні дослідження не виявили різниці в перебігу процесу ранозагоєння після нанесення гелю ПС1Д та ГП.

Таблиця 2.

Закриття ексцизійних ран у мишей при самостійному загоєнні (контроль), після нанесення гелю ПС1Д некріоконсервованих, кріоконсервованих і летально пошкоджених МСК в ПС1Д, %

Термін спостереження, доба	Групи				
	Контроль	Гель ПС1Д	н/к-МСК	к/к-МСК	л/п-МСК
3	16,9±5,6	14,35±6,45	30,1±5,1*#	31,8±4,8*#	21,1±5,9*#^
7	38,5±5,5	33,3±7,6	52,5±5,6*#	51,8±3,6*#	40,6±5,7^
14	96,6±3,2	97,2±3,95	98,65±3,9	98,95±1,1	98,7±1,2

Примітки: * – відмінності значущі ($p \leq 0,05$) у порівнянні з контролем на відповідну добу;

– відмінності значущі ($p \leq 0,05$) у порівнянні з гелем на відповідну добу;

^ – відмінності значущі ($p \leq 0,05$) у порівнянні з к/к-МСК і н/к-МСК на відповідну добу.

На гістологічних препаратах на 3-ю добу експеримента ознаки початку утворення грануляційної тканини окрім групи з н/к-МСК спостерігалися лише в групі з к/к-МСК (рис. 9). На 7-у добу в групах н/к-МСК та к/к-МСК виявлялася практично зріла грануляційна тканина, яка мала ознаки трансформації в рубцеву тканину зі значною кількістю судин капілярного типу, заповнених еритроцитами: $11,2 \pm 1,0$ та $11,9 \pm 1,4$ одиниць в полі зору, відповідно. В групі ран з л/п-МСК на цей же строк спостереження кількість судин була значно меншою ($7,8 \pm 0,8$ одиниць полі зору) і практично не відрізнялась від цього показника для ран з гелем ПС1Д. На гістологічних препаратах ран цих двох груп спостерігалась активна проліферація сполучнотканинних клітин, що може свідчити про продовження формування грануляційної тканини.

Зріла грануляційна тканина з великою кількістю фібробластів в групах ран з гелем ПС1Д та л/п-МСК виявлялась на 14-у добу експеримента. На цей же строк в групах ран з н/к-МСК та к/к-МСК виявлялися повношаровий епідерміс з характерним мікрорельєфом, а у власне дермі спостерігалися деривати шкіри на різних стадіях формування. Кількість мікросудин в зоні дефекту таких ран в 2,1-2,2 рази перевищувала цей показник для ран із самостійним загоєнням і в 1,6 рази для ран з нанесенням л/п-МСК.

На 28-у добу в групі ран з нанесенням ПС1Д та з л/п-МСК визначалася нещільна рубцева тканина з упорядковано орієнтованими ніжними волокнами дерми та проліферацією клітин, що формували деривати шкіри. У групах із нанесенням н/к-МСК та к/к-МСК на тлі упорядкованих колагенових волокон спостерігалися сформовані деривати шкіри та повношаровий нормальний епідерміс.

Таким чином, нанесення МСК, кріоконсервованих модифікованим методом, прискорювало процес ранозагоєння практично так, як і н/к-МСК. В той же час застосування л/п-МСК мало чітко виражений ефект сприяння ранозагоєнню переважно до 3-ї доби. Отримані результати дозволили виявити залежність реалізації репаративного потенціалу МСК в нашій модельній системі від збереженості клітин та зробити висновок про ефективність обраного нами метода кріоконсервування.

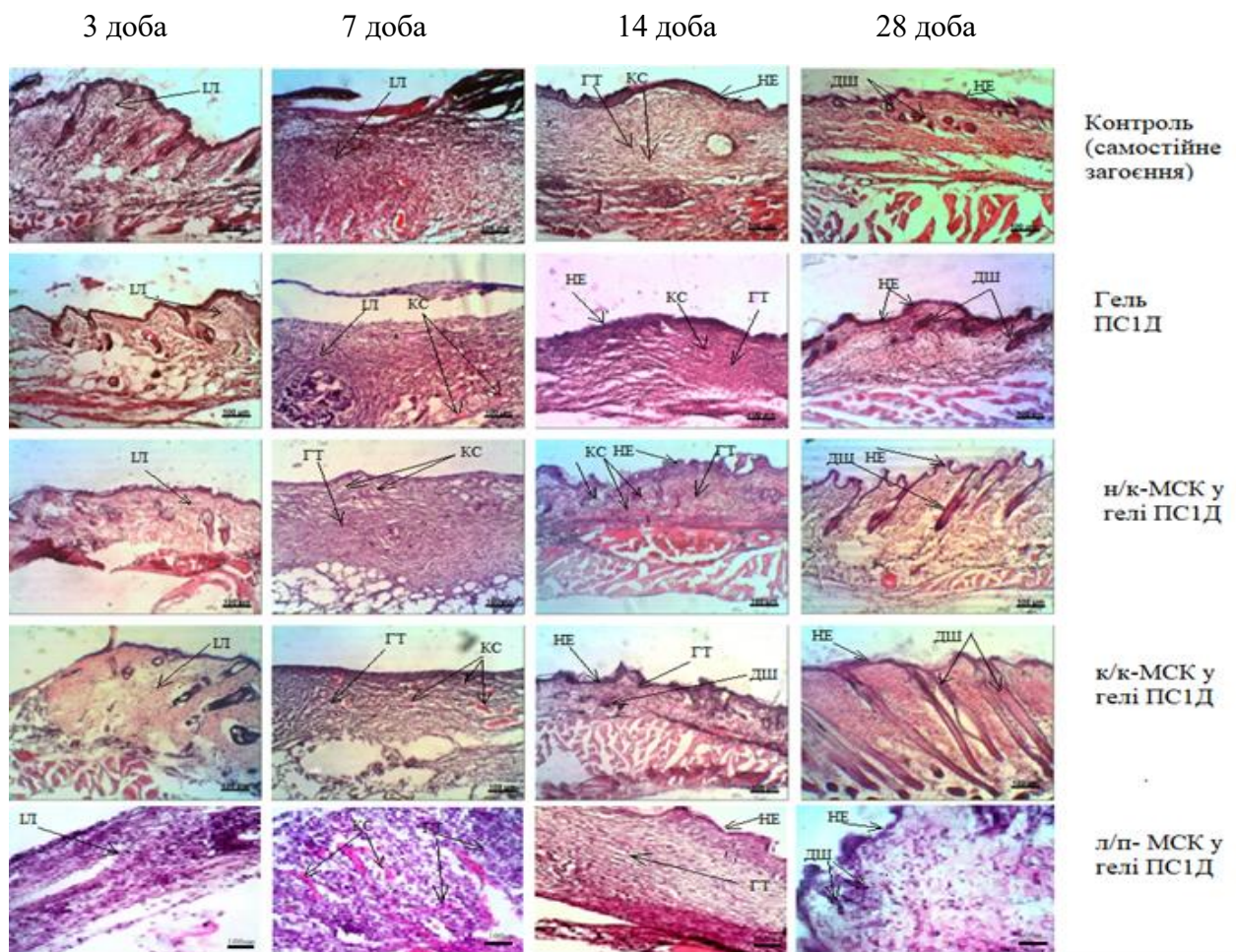


Рис. 9. Гістологічна картина загоєння ексцизійних ран шкіри у мишей після нанесення некріоконсервованих, кріоконсервованих і летально пошкоджених МСК у гелі ПС1Д. Забарвлення гематоксиліном та еозином.

Примітки: ІЛ – інфільтрація лейкоцитами; ГТ – грануляційна тканина; НЕ – новоутворений епітелій; ДШ – деривати шкіри; КС – капілярні судини.

Тривалість перебування кріоконсерваних МСК на поверхні ексцизійних ран шкіри оцінювали за допомогою ЗФБ⁺-МСК мишей. Було встановлено, що летальне пошкодження ЗФБ⁺-МСК призводить до втрати ними здатності до флуоресценції, тому її наявність є свідченням присутності живих клітин на рані.

ЗФБ⁺-МСК кріоконсервували удосконаленим нами методом і наносили на рани в гелі ПС1Д. Через 30 хвилин після нанесення в товщі гелю виявлялись рівномірно розташовані сферичні клітини, які яскраво флуоресціювали (рис. 10).

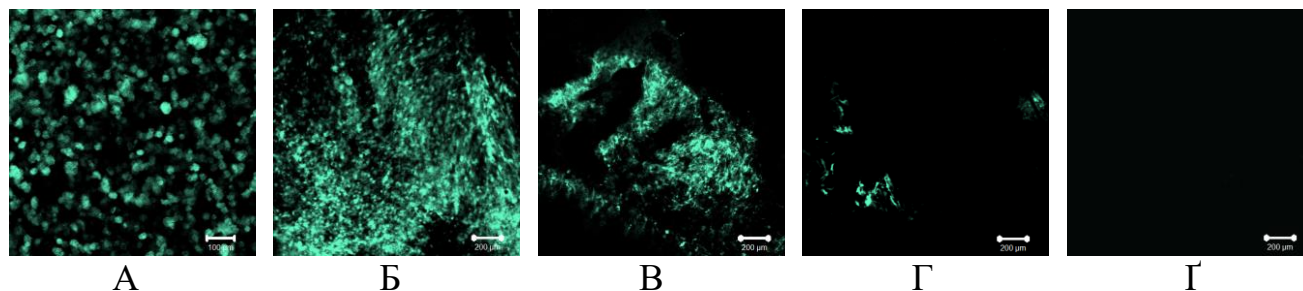


Рис. 10. Візуалізація кріоконсервованих (А-Д) та летально пошкоджених (Е) ЗФБ⁺-МСК на поверхні ексцизійних ран шкіри: А, Е – через 30 хвилин; Б – через 1 добу; В – через 3 доби; Д – через 5 діб після нанесення.

На 2-у добу ЗФБ⁺-МСК спостерігались у вигляді скупчень клітин. Починаючи з 3-ї доби на поверхні рани виявлялися ділянки без флуоресценції, і на 5-у добу експеримента флуоресціюючі клітини практично не спостерігались. Отримані дані свідчать, що алогенні кріоконсервовані ЗФБ⁺-МСК можуть виявлятися на рані у життєздатному стані протягом щонайменше 5-и діб.

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі наведено теоретичне узагальнення і вирішення наукової задачі визначення окремих умов кріоконсервування МСК та формування тривимірних носіїв для підтримки МСК *in vitro* та *in vivo* із застосуванням середовищ на основі плазми крові, які забезпечують отримання функціонально спроможної біоінженерної конструкції, придатної для використання у експериментальній біології та регенеративній медицині.

1. Гідрогелі на основі плазми крові забезпечують адгезію і проліферацію МСК *in vitro* і можуть застосовуватися для тривимірного культивування, а також для доставки та іммобілізації клітин на поверхні ексцизійних ран у мишей.

2. Розроблено спосіб формування моделі повношарових ексцизійних шкірних ран у мишей з мінімізацією контракції країв ураженої ділянки шкіри.

3. Встановлено, що МСК у гідрогелі з плазми крові, нанесені на повношаровий ексцизійний дефект шкіри у мишей, прискорюють епітелізацію рани: за перші 3-и доби площа ранової поверхні скорочувалась при нанесенні клітин в гелі на 29,5% у порівнянні з 14,3% в разі нанесення гелю без МСК. Одночасно виявлені більш раннє у порівнянні із самостійним закриттям рани дозрівання грануляційної

тканини та відновлення дермального і епідермального шарів шкіри на тлі більш інтенсивного ангиогенезу.

4. Модифікація методу кріоконсервування МСК, який включає попередню обробку сахарозою і заморожування у її присутності, шляхом використання плазми крові як базового компонента кріозахисного середовища, дозволило підвищити збереженість кріоконсервованих МСК без застосування інших кріопротекторів з $47,3 \pm 5,9\%$ до $60,4 \pm 3,9\%$.

5. Кріоконсервування в середовищі на основі плазми крові з 0,2 М сахарозою та 1% ДМСО (ПС1Д) дозволяє отримати МСК зі збереженістю $77,0 \pm 2,9\%$. Метаболічна активність цих клітин після 24 годин рекультивування в моношарі відповідає рівню 73% цього показника для некріоконсервованих МСК і не відрізняється від метаболічної активності клітин, кріоконсервованих з 5% та 10% ДМСО.

6. Кріозахисне середовище ПС1Д здатне утворювати стабільний гідрогель у присутності джерела тромбіну та CaCl_2 , що дозволяє отримувати одразу після відігрівання клітин біоінженерні конструкції, придатні для застосування *in vitro* та *in vivo*. Тривимірне культивування кріоконсервованих МСК у складі таких конструкцій супроводжується ростом метаболічної активності клітин.

7. МСК, кріоконсервовані у ПС1Д і нанесені на рану у складі гідрогелю ПС1Д, сприяють процесу ранозагоєння повношарового ексцизійного дефекту шкіри у мишей на рівні некріоконсервованих МСК. Летально пошкоджені МСК демонструють короткостроковий ефект сприяння ранозагоєнню – переважно до 3-ї доби спостереження.

8. За допомогою МСК мишей, трансгенних за зеленим флуоресцентним білком, встановлена тривалість перебування клітин на поверхні ексцизійних ран шкіри. Доведено, що ЗФБ⁺-МСК, кріоконсервовані модифікованим методом, виявляються в межах ранового дефекту протягом 5-и діб після нанесення у складі гідрогелю.

ПЕРЕЛІК НАУКОВИХ ПРАЦЬ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Статті у наукових фахових виданнях України

1. Тихвинская О.А. Влияние мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток из жировой ткани человека в фибриновом геле на заживление полнослойных эксцизионных ран кожи у мышей / Тихвинская О.А., Рогульская Е.Ю., Волкова Н.А., Ревенко Е.Б., Мазур С.П., Волина В.В., Грищук В.П., Петренко А.Ю., Петренко Ю.А. Клеточная и органная трансплантология. 2017. Т. 5, №1. С. 6–13. (Внесок здобувача: моделювання ексцизійних шкірних ран у мишей, проведення планіметричного вимірювання площі ран, забір тканин, виготовлення та фарбування гістологічних зрізів, аналіз мікрофотографій гістологічних препаратів, аналіз та узагальнення отриманих даних, підготовка матеріалів до друку.)
2. Тихвинская О.А. Макропористые носители на основе плазмы крови как биосовместимые покрытия для восстановления полнослойных эксцизионных

ран / Тихвинская О.А., Рогульская Е.Ю., Волкова Н.А., Грищук В.П., Ревенко Е.Б., Мазур С.П., Лозинский В.И., Петренко А.Ю., Петренко Ю.А. Проблемы криобиологии и криомедицины. 2018. Т. 28, №1. С. 44–48. Doi.org/10.15407/cryo28.01.044 (Scopus) *(Внесок здобувача: моделювання ексцизійних шкірних ран у мишей, проведення планіметричного вимірювання площі ран, забір тканин, виготовлення та фарбування гістологічних зрізів, аналіз мікрофотографій гістологічних препаратів шкіри, підготовка носіїв на основі плазми крові до експерименту, аналіз та узагальнення отриманих даних, підготовка матеріалів до друку.)*

3. Тихвинская О.А. Заживление эксцизионных кожных ран у мышей в присутствии матриц из плазмы крови / Тихвинская О.А., Волкова Н.А., Рогульская Е.Ю., Ревенко Е.Б., Мазур С.П. Вісник проблем біології і медицини. 2018. Т. 2, № 4. С. 307–312. *(Внесок здобувача: моделювання ексцизійних шкірних ран у мишей, проведення планіметричного вимірювання площі ран, забір тканин, виготовлення та фарбування гістологічних зрізів, аналіз мікрофотографій гістологічних препаратів шкіри, підготовка носіїв на основі плазми крові до експерименту, аналіз та узагальнення отриманих даних, підготовка матеріалів до друку.)*

4. Тихвинская О.А. Флуоресцентная визуализация мезенхимальных стромальных клеток на поверхности полнослойных эксцизионных кожных ран у мышей / Тихвинская О.А., Рогульская Е.Ю., Васильев Р.Г., Петренко Ю.А. Український журнал медицини, біології та спорту. 2019.Т.4, № 4. С. 280–285. *(Внесок здобувача: моделювання ексцизійних шкірних ран у мишей, аналіз мікрофотографій, отриманих за допомогою конфокального мікроскопу, узагальнення отриманих даних, підготовка матеріалів до друку.)*

Статті в наукових періодичних виданнях інших країн

5. Rogulska O. Novel Cryopreservation Approach Providing Off-the-Shelf Availability of Human Multipotent Mesenchymal Stromal Cells for Clinical Applications / Rogulska O., Tykhvynska O., Revenko O., Grischuk V., Mazur S., Volkova N., Vasyliiev R., Petrenko A., Petrenko Y. Stem Cells International. 2019. V. 2019. P. 1-11. doi.org/10.1155/2019/4150690 (Scopus) *(Внесок здобувача: моделювання ексцизійних шкірних ран у мишей, проведення планіметричного вимірювання площі ран, забір тканин, виготовлення та фарбування гістологічних зрізів, аналіз мікрофотографій гістологічних препаратів шкіри, аналіз та узагальнення отриманих даних, підготовка матеріалів до друку.)*

Тези наукових доповідей конференцій

6. Тихвинская О.А., Рогульская Е.Ю., Петренко Ю.А. Мезенхимальные стромальные клетки в фибриновом геле стимулируют заживление полнослойных ран у мышей. *Холод в біології та медицині: мат. міжнар. наук.-практ. конф. м. Харків, Україна, 24-25.05. 2017 м. Харків, 2017. С. 171.*

7. Тихвинская О.А. Перспективы применения культивированных и криоконсервированных мезенхимальных стромальных клеток для лечения

- полнослойных кожных ран. *Сьогоднішня біологічна наука: мат. міжнар. наук. - практ. конф. м. Суми, Україна, 14-15.06. 2018 м. Суми, 2018. С. 53-55.*
8. Тихвинская О.А., Рогульская Е.Ю. Влияние покрытий на основе плазмы крови на заживление эксцизионных кожных ран у мышей. *Теорія та практика сучасної морфології: мат. міжнар. наук.-практ. конф. м. Дніпро, Україна, 10-12.10.2018 м. Дніпро, 2018. С. 160-161.*
 9. Tykhvynska O., Rogulska O., Petrenko Y. Cryoprotective solution as a vehicle for local cell delivery. *3rd International Conference «Smart Bio»: poster present. с. Kaunas, Lithuania, 2-4.05.2019 с. Kaunas, 2019. P. 108.*
 10. Petrenko Y., Vaskova I., Rogulska O., Tykhvynska O., Chudicova M., Petrenko A., Kubinova S. Different aspects of clinical-grade processing of multipotent mesenchymal stromal cells: focusing the therapeutic properties depending on the cell source, hypothermic storage and cryopreservation conditions. *SLTB2019: с. Seville, Spain, 2-4.10. 2019 с. Seville, 2019. P. 25.*

Патенти України на корисну модель

11. Спосіб формування эксцизійних ран шкіри мишей: пат. 116408 Україна, МПК G09B 23/28116408 / О.О. Тихвинська, Н.О. Волкова, Ю.О. Петренко; заявник та патентовласник ІПКіК НАН України. № u201609699, заяв. 20.09.2016. Опубл. 25.05.2017. Бюл. № 10.

АНОТАЦІЯ

Тихвинська О.О. Кріоконсервування, тривимірне культивування і ранозагоювальна дія мезенхімальних стромальних клітин у середовищах на основі плазми крові. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук (доктора філософії) за спеціальністю 03.00.19 – «Кріобіологія». – Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, Харків, 2020.

Дисертаційна робота присвячена визначенню окремих умов кріоконсервування МСК та формування тривимірних носіїв клітин з використанням середовищ на основі плазми крові.

Встановлено, що гідрогелі на основі плазми крові забезпечують адгезію і проліферацію МСК і можуть застосовуватися як тривимірні носії МСК *in vitro* та *in vivo*. Удосконалений метод кріоконсервування МСК, що включає попередню обробку сахарозою та використання плазми крові. Кріоконсервування в середовищі на основі плазми крові з 0,2 М сахарозою та 1% ДМСО (ПС1Д) дозволяє отримати МСК з високими рівнями збереженості та метаболічної активності. Середовище ПС1Д здатне утворювати гідрогель, що дозволяє отримувати біоінженерні конструкції. МСК, кріоконсервовані у ПС1Д, сприяють ранозагоєнню эксцизійного дефекту шкіри у мишей на рівні некріоконсервованих. ЗФБ⁺-МСК візуалізуються в межах ранового дефекту протягом 5 діб після нанесення.

Ключові слова: мультипотентні мезенхімальні стромальні клітини, кріоконсервування, плазма крові, тривимірне культивування, эксцизійні рани шкіри, ранозагоєння.

АННОТАЦИЯ

Тихвинская О.А. Криво консервирование, трехмерное культивирование и ранозаживляющее действие мезенхимальных стромальных клеток в средах на основе плазмы крови. – Квалификационная научная работа на правах рукописи.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук (доктора философии) по специальности 03.00.19 – «Криобиология». – Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, Харьков, 2020.

Диссертационная работа посвящена определению отдельных условий криоконсервирования МСК и формирования трехмерных носителей клеток, пригодных для применения *in vitro* и *in vivo*, с использованием сред на основе плазмы крови человека.

Гидрогели на основе плазмы крови (ГП), образованные при участии тромбина и ионов Са, обеспечивают адгезию и пролиферацию МСК и могут использоваться как для трехмерного культивирования, так и в качестве носителей клеток *in vivo*. Применение ГП с МСК на модели полнослойных эксцизионных ран кожи у мышей осуществляет адресную доставку клеток и равномерное заполнение зоны дефекта.

Эпителизация ран с нанесенными МСК в ГП протекает быстрее, чем при самостоятельном заживлении: за первые 3-е суток площадь раневой поверхности сокращалась на 29,5% в случае нанесения МСК против 14,3% при самостоятельном заживлении и в случае нанесения ГП без клеток. Гистологические исследования позволили выявить более раннее начало формирования и созревание грануляционной ткани с ярче выраженным ангиогенезом в ранах после нанесения МСК. К 28-м суткам раны этой группы характеризуются наличием полноценного эпидермиса на подлежащей неплотной рубцовой ткани и сформированными дериватами кожи.

Осуществлена модификация метода криоконсервирования, который включает этап культивирования МСК в течение 24 часов в присутствии 0,1М сахарозы, непосредственно предшествующий криоконсервированию в присутствии 0,2М сахарозы, путем использования плазмы крови в качестве базового компонента криозащитной среды (КЗС). Она позволяет повысить сохранность криоконсервированных в отсутствие криопротектора и эмбриональной сыворотки МСК с $47,3 \pm 5,9\%$ до $60,4 \pm 3,9\%$. При монослойном культивировании криоконсервированные МСК прикрепляются к пластику, распластываются, пролиферируют и формируют типичные «потoki» клеток, как это свойственно некриоконсервированным МСК. Введение в состав КЗС криопротектора ДМСО в концентрации 1-10% значительно повышает сохранность МСК, причем при низких концентрациях криопротектора (1% и 2%) подтверждается преимущество КЗС на основе плазмы крови перед средой на основе α -МЕМ. Криоконсервирование в среде на основе плазмы крови с 0,2 М сахарозой и 1% ДМСО (ПС1Д) позволяет получить МСК сохранностью $77,0 \pm 2,9\%$, чья метаболическая активность после 24 часов

рекультивирования в монослое соответствует уровню 73% этого показателя для некриоконсервированных клеток и не отличается от уровня метаболической активности МСК, криоконсервированных в присутствии 10% ДМСО.

Криозащитная среда ПС1Д в присутствии источника тромбина и ионов Са способна образовывать стабильный гидрогель, что позволяет получать сразу после отогрева суспензий клеток, криоконсервированных в среде ПС1Д, биоинженерные конструкции МСК в гидрогеле, исключая этап отмывки. При трехмерном культивировании в геле ПС1Д криоконсервированные МСК распластываются, приобретают типичный фибробластоподобный вид и формируют характерную трехмерную структуру, на пятые сутки культивирования их метаболическая активность соответствует уровню некриоконсервированных клеток, культивируемых в геле.

Криоконсервированные МСК, нанесенные на рану в составе биоинженерной конструкции с ПС1Д, стимулируют процесс ранозаживления полнослойного эксцизионного дефекта кожи у мышей на уровне некриоконсервированных МСК. Летально поврежденные МСК способствуют ранозаживлению краткосрочно: отличия от контроля выявляются лишь на 3-и сутки наблюдения.

С использованием МСК мышей, трансгенных по зеленому флуоресцентному белку, доказано пребывания в течение 5-и суток в зоне дефекта криоконсервированных клеток, нанесенных на поверхность эксцизионных ран в составе геля ПС1Д.

Ключевые слова: мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки, криоконсервирование, плазма крови, трехмерное культивирование, эксцизионные раны кожи, ранозаживление.

ANNOTATION

Tykhvynska O.O. Cryopreservation, three-dimensional cultivation and wound healing effect of mesenchymal stromal cells in blood plasma-based media. - The qualifying scientific paper as a manuscript.

Thesis for the degree of Candidate of Biological Science (Philosophy Doctor) in specialty 03.00.19 "Cryobiology". – Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkiv, 2020.

The thesis is dedicated to assessment of individual conditions for MSCs cryopreservation and formation of 3D scaffolds using human blood plasma-based solutions.

It was established that plasma-based hydrogels ensured adhesion and proliferation of MSCs and could be used as 3D carriers. The method of MSCs cryopreservation, including pretreatment with sucrose, was improved by replacement of culture media with blood plasma in cryoprotective solution. After cryopreservation in human blood plasma, supplemented with 0.2M sucrose and 1% DMSO (PS1D solution), MSCs had high viability and metabolic activity values. PS1D solution could form a stable hydrogel allowing creation of bioengineered structures. When applied on the surface of full-thickness wounds as a part of hydrogel PS1D, cryopreserved MSCs improved wound

healing. GFP⁺- MSCs in PS1D hydrogel were visualized within the wound defect area for 5 days after application.

Keywords: multipotent mesenchymal stromal cells, cryopreservation, blood plasma, 3D cultivation, excisional skin wounds, wound healing.

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

ГП – гель з плазми крові; ДМСО – диметилсульфоксид; ЕБ – етидія бромід; ЕС – ембріональна сироватка; ЗФБ⁺-МСК – МСК, позитивні за зеленим флуоресцентним білком; КЗС – кріозахисне середовище; КС – культуральне середовище; к/к – кріоконсервований; л/п – летально пошкоджений; н/к – некріоконсервований; МСК – мультипотентні мезенхімальні стромальні клітини; ПЗТ – плазма, збіднена на тромбоцити; ПС1Д – кріозахисне середовище складом ПЗТ, 0,2 М сахарози, 1% ДМСО; УОФ – умовні одиниці флуоресценції; ФДА – флуоресцеїн діацетат; АВ – Alamar Blue.

Відповідальний за випуск – д.б.н. Г.О. Бабійчук

Підписано до друку 01.09.2020.