

## Оригінальна стаття

УДК 611-013.7/.8:576.3/.4-013.8

**Цимбалюк В.І.<sup>1</sup>, Дерябіна О.Г.<sup>2</sup>, Шувалова Н.С.<sup>2</sup>, Маслова О.О.<sup>2</sup>, Похолоenko Я.О.<sup>3</sup>, Топорова О.К.<sup>3</sup>, Шпильова С.П.<sup>3</sup>, Кирик В.М.<sup>4</sup>, Пічкур Л.Д.<sup>1</sup>, Касяненко Ю.А.<sup>1</sup>, Пічкур О.Л.<sup>1</sup>, Кордюм В.А.<sup>3</sup>**

<sup>1</sup> Відділення відновлювальної нейрохірургії, Інститут нейрохірургії ім. акад. А.П. Ромоданова НАМН України, Київ, Україна

<sup>2</sup> Відділ генних технологій, Інститут генетичної та регенеративної медицини НАМН України, Київ, Україна

<sup>3</sup> Відділ регуляторних механізмів клітини, Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, Київ, Україна

<sup>4</sup> Лабораторія клітинних та тканинних культур відділу клітинних та тканинних технологій, Інститут генетичної та регенеративної медицини НАМН України, Київ, Україна

### **Фенотипові зміни і проліферативний потенціал мезенхімальних стовбурових клітин з вартонових драглів пуповини людини в умовах культивування**

#### **Анотація**

**Мета.** Розробити протокол отримання мезенхімальних стовбурових клітин (МСК) з вартонових драглів пуповини людини, дослідити їх фенотипові зміни і проліферативний потенціал в умовах культивування.

**Матеріали і методи.** МСК пуповини людини культивували протягом 6 пасажів. Для дослідження морфологічних характеристик клітин у культурі застосовували методики забарвлення гематоксиліном та еозином, адаптовані для використання у культурах клітин, за Романовським–Гімзе, толудіновим синім. Для забарвлення ядерної ДНК використовували реагенти-інтеркалятори: Hoechst 33342, DAPI та Ethidium bromid. Експресію поверхневих маркерів МСК (CD105, CD90, CD73, CD34) досліджували за допомогою FACS-аналізу.

**Результати.** В культурі МСК зберігають морфологічну ідентичність протягом 2 пасажів. В подальшому спостерігають тенденцію до зменшення інтенсивності експресії маркерів МСК, ознаки деградації культури, появу на пізніх пасажах спонтанного адипогенного та хондрогенного диференціювання.

**Висновки.** При культивуванні МСК пуповини людини протягом 2 пасажів зберігають морфологічні характеристики і проліферативний потенціал, в подальшому вони втрачають мезенхімальний мультипотентний фенотип.

**Ключові слова:** мезенхімальні стовбурові клітини; пуповина людини; культивування; проліферативний потенціал.

**Укр. нейрохірург. журн. — 2015. — №2. — С.17-24.**

Надійшла до редакції 07.12.14. Прийнята до публікації 20.04.15.

**Адреса для листування:** Пічкур Олександр Леонідович, Відділення відновлювальної нейрохірургії, Інститут нейрохірургії ім. акад. А.П. Ромоданова, вул. Платона Майбороди, 32, Київ, Україна, 04050, e-mail: o.pichkur@gmail.com

**Вступ.** Регенеративна медицина з кожним роком вимагає все більшої гарантії безпечності та ефективності клітинної терапії, тому обрання оптимальних джерел отримання клітин є одним з її ключових етапів. Сьогодні в клітинній терапії використовують різноманітні клітини (як дорослого організму, так і ембріональні), особливе місце серед яких посідають мезенхімальні стовбурові (мультипотентні стромальні) клітини (МСК). Це зумовлене, насамперед, їх імунокоригувальними властивостями, здатністю диференціюватись в різні типи клітин, можливість отримання великої кількості клітин за короткий час, відносною простою культивування. Опубліковані дані про виявлення та успішне виділення МСК практично з усіх тканин організму [1, 2], проте, основну увагу приділяють таким джерелам клітин, як кістковий мозок, жирова тканина, провізорні ембріональні тканини (плацента, пуповина тощо). Описуючи

культури МСК, найчастіше мають на увазі клітини, отримані з кісткового мозку або жирової тканини [3, 4]. Ці клітини належать до категорії дорослих стовбурових клітин, відповідно, існують деякі обмеження щодо застосування аlogenного матеріалу в медицині, пов'язані з особливостями реакції на них імунної системи реципієнта. Незважаючи на спільну назву, МСК з різних джерел значно різняться за доступністю та безпечністю.

Вартонові драгли пуповини (пупкового канатика), на відміну від кісткового мозку та жирової тканини, містять клітини, що збереглися з ранніх етапів ембріогенезу.

Пуповина як похідне жовткового мішка та алантоїсу, містить примітивну форму позазародкової мезенхіми — мукозну сполучну тканину (вартонові драгли) [7], яка за складом клітин та будовою посідає проміжне місце між ембріональною мезенхімою та

Стаття містить рисунки, які відображаються в друкованій версії у відтінках сірого, в електронній — у кольорі.

сполучною тканиною дорослих [7]. В її складі переважають фібробластоподібні клітини, що активно синтезують глікозаміноглікани, та, на думку деяких авторів, зберігають не мультипотентний (на відміну від кісткового мозку та жирової тканини, які є МСК дорослого організму), а навіть плюрипотентний стовбуровий потенціал [8]. Встановлено можливість експресії ними ембріональних маркерів Oct4 і Tra-1-60, Tra-1-81, SSEA-1, SSEA-4) [9]. Вони мають дещо відмінний від зрілого імунотип, що відкриває додаткові можливості для алотрансплантації [10, 11].

Отримання клітин з пуповини не спричиняє морально-етичний конфлікт, процедура ізолювання МСК з пупкового канатика досить проста. В досліджах на тваринах після імуносупресії доведено, що внутрішньовенне або підшкірне введення таких клітин не спричиняє їх відторгнення або критичний негативний вплив. На звичайних тваринах без імуносупресії показано, що принаймні одноразова трансплантація ксеногенних клітин вартонових драглів пуповини можлива без їх негайного відторгнення. Дані літератури свідчать про більш виражені імуносупресивні властивості МСК пуповини у порівнянні з такими аналогічними клітинами з інших джерел, що, поряд з іншими перевагами, свідчить про перспективність використання їх в регенеративній медицині.

Сьогодні актуальними напрямками досліджень біології МСК з вартонових драглів пуповини є розробка й вдосконалення оптимальних методів виділення, ідентифікації та отримання достатньої для клінічного застосування кількості клітин з збереженням їх нативних характеристик. Не вивчені питання якісного складу і зміни фенотипових характеристик клітин в умовах культивування.

**Мета дослідження:** розробити протокол отримання МСК з вартонових драглів пуповини людини, дослідити їх фенотипові зміни і проліферативний потенціал в умовах культивування.

**Матеріали і методи дослідження. Виділення МСК.** Пуповини, отримані від здорових породіль під час фізіологічних пологів, надані муніципальним пологовим будинком №9 м. Києва. Жінки підписали інформаційний лист про згоду надати матеріал для наукових досліджень. В роботі використані 30 пуповин. Матеріал обробляли не пізніше ніж через 5 год після пологів. В лабораторію пуповини доставляли в поживному середовищі ДМЕМ з 10-кратною концентрацією антибіотиків. Пупковий канатик максимально відмивали від крові, на 20–30 хв вміщували в нове поживне середовище Ігла або ДМЕМ з антибіотиками — пеніцилін і стрептоміцин відповідно по 1000 од/мл та 1000 мкг/мл, антимікотичним засобом (амфотеріцин Б, 50 од/мл). Всі маніпуляції проводили у стерильних умовах. Перед початком оброблення пупкового канатика вилучали судини — одну вену і дві артерії та відокремлювали вартонові драгли, які подрібнювали ножицями до найменш можливого розміру 0,1–0,5 см і вміщували в культуральний флакон об'ємом 25 або 75 см<sup>3</sup> з теплим (температура 37°C) ростовим поживним середовищем альфа-MEM (BioWest, Іспанія), 10% фетальної сироватки ВРХ (HyClone, США), 2 ммоль L-глутаміну (Sigma, США) та 10 ммоль FGF («Інтер-фармБіотек», Україна). Культивування здійснювали у СО<sub>2</sub>-інкубаторі (37°C, 5% СО<sub>2</sub>). Через 7–14

днів з експлантів отримували клітини та перші клони, які вирощували до досягнення 70% моношару культурального флакона. Поживне середовище змінювали через кожні 3 доби. Щоденно спостерігали за станом клітин в інвертованому світловому мікроскопі LEICA DMIL при збільшенні ×80. Всі морфометричні аналізи проводили за допомогою програми Image J.

Клітини в клонах — це матеріал нульового пасажу поза організмом. Для пасування клітин за стандартною методикою використовували розчини 0,02% версену та 0,25% трипсину у співвідношенні 1:1. Клітини висівали з розрахунку 10<sup>4</sup> клітин на 1 см<sup>2</sup>, доводячи клітини до 2-го пасажу в культурі, після чого їх характеризували за морфологією, поверхневими маркерами та використовували для подальшого введення дослідним тваринам (досліджували вплив МСК на експериментальних моделях; результати будуть представлені в подальших публікаціях).

**Методи морфологічних досліджень.** Для вивчення морфології клітини в культурі забарвлювали гематоксиліном та еозином, за методикою, адаптованою для використання у культурах клітин. Клітини у чашках Петрі забарвлювали при кімнатній температурі (22°C). Перед забарвленням з чашок видаляли культуральне середовище, клітини фіксували у 4% розчині формаліну протягом 10 хв, об'ємом 2 мл формаліну на чашку. Для відмивання від фіксатора використовували забуферений ізотонічний розчин натрію хлориду (по 4 мл на чашку). Для забарвлення використовували водний розчин гематоксиліну Бьомера та водний розчин еозину. Гематоксилін об'ємом 2 мл додавали у чашку та витримували 10 хв. Відмивання проводили проточною водопровідною водою, додаючи 4 мл води на чашку, повторювали 4 рази. Додавали у кожну чашку по 1,5 мл еозину. Витримували 3 хв та одноразово відмивали водою, додаючи по 2 мл у чашку. Важливою умовою вдалої візуалізації є постійне підтримання вологості у чашках, адже клітини, що пересихають, деформуються й набувають нетипових ознак. Цитоплазма клітин забарвлена у рожево-бузковий колір, ядро — у синьо-фіолетовий.

МСК забарвлювали також з використанням деяких класичних барвників, що застосовують у гістохімічній практиці та під час дослідження клітин крові, за Романовським-Гімзе [12]; ядерним барвником толудіновим синім (водний розчин 1:1000), який, крім того, дозволяє виявляти метакромазію, забарвлюючи основну речовину хряща; основним барвником альціановим синім, що при рН від 3 до 5 забарвлював не тільки нуклеїнові кислоти, а й кислі мукополісахариди [13]. Тонку будову клітин оцінювали з використанням флуоресцентної та конфокальної мікроскопії.

Якісність забарвлення перевіряли під інвертованим світловим мікроскопом LEICA DMIL при збільшенні ×100. Фотографії отримували за допомогою апарата Canon Power Shot A640.

**Ядерні барвники.** Для забарвлення ядерної ДНК використовували реагенти-інтеркалятори: Hoechst 33342, DAPI та Ethidium bromid. Hoechst 33342 та його аналоги найбільш поширені у сучасних цитологічних дослідженнях для візуалізації ДНК ядер у різних об'єктах [14, 15]. Специфічність взаємодії Hoechst 33342 з ДНК пояснюється його розташуванням у малій борозні ДНК [16], що зумовлює появу блакитної

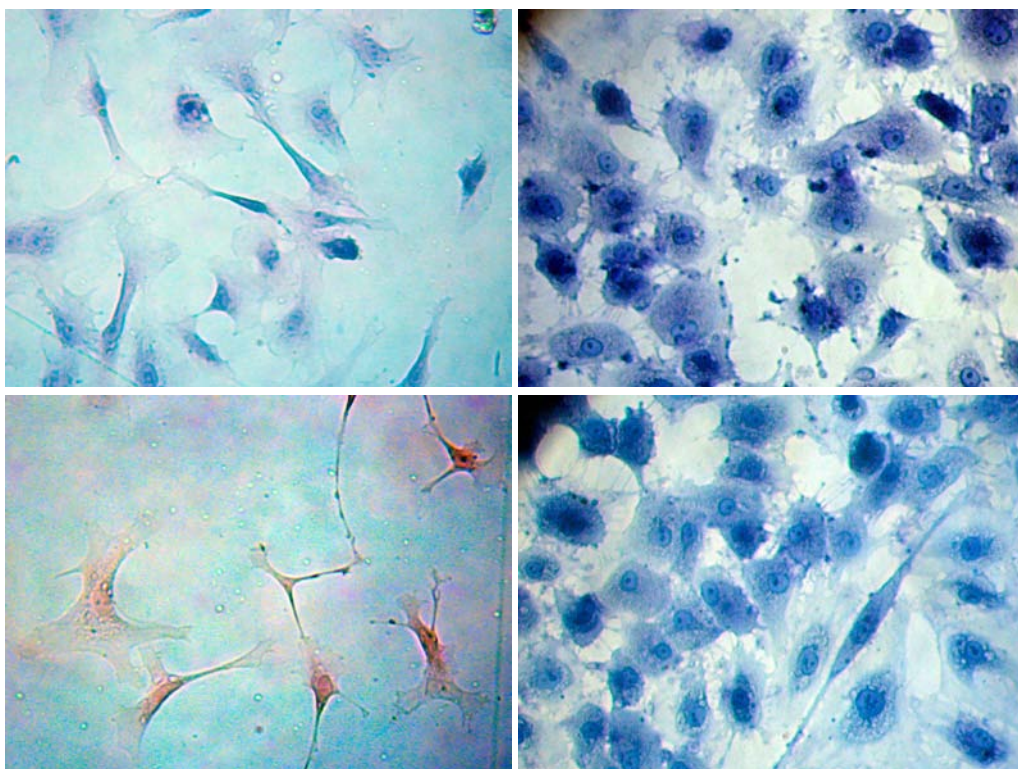
люмінесценції в ядрах. Для забарвлення препаратів Hoechst 33342 використовували в концентрації 5 мкг/мл, інкубували протягом 3–5 хв при температурі 37°C. На конфокальному мікроскопі максимум збудження світіння Hoechst 33342 відзначений при 405 нм, максимум емісії — при 420–480 нм. Таку саму високу специфічність щодо забарвлення ДНК проявляє й інший флуорохром — DAPI — діамідінофенолідол [17]. Забарвлення проводили протягом 3–5 хв при температурі 37°C. Максимум збудження DAPI відповідав 350 нм, максимум емісії — 470 нм. Етидіум бромід (Ethidium bromid) — зручний в роботі флуорохром, який використовували в концентрації 2 мкг/мл при забарвленні протягом 2–5 хв. Збудження флуоресценції етидіумброміду при 488 нм, випромінювання — при 560 нм.

*Визначення експресії поверхневих маркерів.* FACS-аналіз експресії маркерів МСК (CD105, CD90, CD73, CD34 — "BD", США) як мінімальних критеріїв для визначення МСК за рекомендаціями Міжнародного товариства клітинної терапії [18], здійснювали на сортері "BD FACSAria" з застосуванням програмного забезпечення "BD FACSDiva" у відділі клітинних та тканинних технологій Інституту генетичної та регенеративної медицини НАМН України. Аналіз проводили за стандартними протоколами. Клітини вміщували в епендорф у вигляді суспензії (1–5×10<sup>6</sup> кл в 1 мл) у крижаному PBS з додаванням 1% натрію азиду. Додавали 0,1–10 мкг/мл первинних мічених антитіл, розчинених у 3% BSA/PBS та інкубували протягом 30 хв при кімнатній температурі. Потім клітини тричі відмивали, центрифугували при 400 g протягом 5 хв та ресуспендували у 500 мкл крижаного PBS. Матеріал аналізували у проточному цитометрі. Як мітку вико-

ристовували FITC. Проведені стандартні контрольні вимірювання.

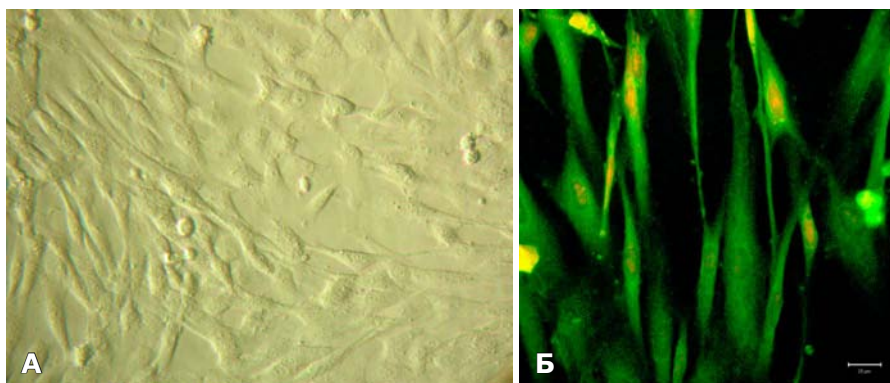
Статистична обробка результатів проведена у "MSEXcel" та програмі для статистичної обробки "x7 2009".

**Результати та їх обговорення.** *Морфологічна характеристика культур МСК з пуповини людини.* Отримані культури МСК цілком відповідали типовим для цього виду клітин морфологічним характеристикам. Оскільки вартонові драгли пуповини людини містять не тільки МСК, а й міофібробласти, фібробласти, макрофаги та інші резидентні клітини, під час отримання матеріалу нульового пасажу виявляли різні за морфологією клітини — від округлих до фібробластоподібних. Нами визначені: субпопуляція маленьких клітин (діаметром 10–15 мкм) з гомогенною цитоплазмою, низьким (приблизно 0,25) ядерно-цитоплазматичним співвідношенням (ЯЦС), невеликим, розташованим у центрі ядром з 4–8 ядерцями, клітини без відростків та субпопуляція більш великих фібробластоподібних клітин (діаметром 40–70 мкм) з гетерогенною цитоплазмою, ще більш низьким ЯЦС, центрально розташованим ядром з 2–4 ядерцями. Ці клітини мали невелику кількість довгих відростків. Виявляли і клітини з одним тонким відростком та ексцентрично розташованим ядром. Крім того, спостерігали клітини більш округлої форми (діаметром 15–30 мкм) з зміщеним ядром з 2–5 ядерцями та щільною гранулярністю у навколоядерній ділянці, а також великою кількістю коротеньких відростків, що здатні формувати щільний моношар (**рис. 1**). Морфологічні характеристики цих клітин відповідають даним літератури і є класичними для МСК людини. Якість культури клітин визначається кількістю наявних у ній веретенноподібних клітин.



**Рис. 1.** Мікрофото. Популяції МСК з вартонових драглів пуповини людини при 0 пасажі в культурі. Забарвлення гематоксилином та еозином. 36.х100.





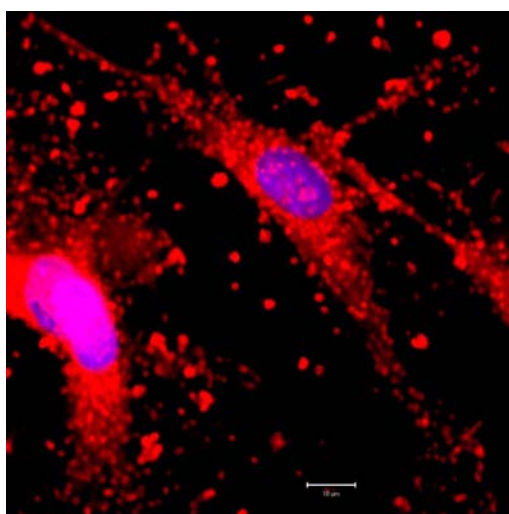
**Рис. 2.** Мікрофото. Культура МСК. 2 пасаж. А — жива незабарвлена культура, зб.х100; Б — конфокальна мікроскопія, забарвлення етидіум бромід + FITC, зб.х400.

За подальшого пасажування МСК в культурі спостерігали переважання веретеноподібних клітин, культура ставала однорідною, на рівні 2-го пасажу практично всі клітини в культурі мали характерну веретеноподібну форму (**рис. 2**). Розмір клітин збільшувався, їх довжина становила 80–150 мкм.

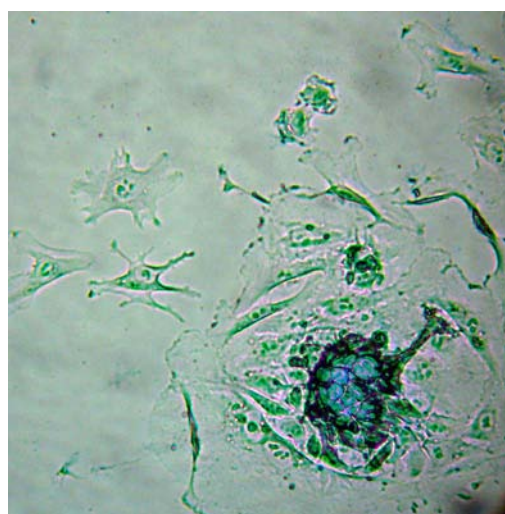
Таким чином, під час пасажування відбувався процес переходу від гетерогенної культури 0 пасажу до найбільш гомогенної культури 2-го пасажу. Починаючи з 3-го пасажу, морфологія клітин була більш різноманітною: з'являлися клітини атипової форми, старіючі клітини, хоча цей процес більш виражений після 5–6 пасажів. У більш пізніх пасажах виявляли спонтанне адипогенне та хондрогенне диференціювання у моношарі (**рис. 3, 4**). Це явище в літературі описують рідко, проте, під час роботи з великою вибіркою культур ми його спостерігали. Його вважають ознакою деградації культури і втрати клітинами мезенхімального мультипотентного фенотипу. Крім того, поява включень жиру може бути зумовлена жировою дистрофією, що виникає в пізні строки культивування, хоча 3-й пасаж не можна вважати «пізнім». Проте, за будь-яких умов, такі клітини не можна використовувати у подальших клінічних дослідженнях.

Спонтанне формування адипоцитів і появу ліпідних крапель в цитоплазмі МСК у деяких спостереженнях відзначали вже на 3-му пасажі. Дрібні ліпидовмісні вакуолі розташовані по всій цитоплазмі клітини, більш щільно — у перинуклеарній зоні. На 4–5-му пасажі кількість адипогенних клітин значно збільшувалася. Збільшувалися вакуолі та гранули ліпідів, навколо ядер МСК формувалися щільні скупчення ліпідів, що виявляли при забарвленні нільським червоним. При цьому МСК були від великих округлих або трикутних клітин до дуже видовжених, неправильної форми, з кількома витягнутими тяжами цитоплазми, або типових веретеноподібних.

За змінами морфології культур під час пасажування виявляли кардинальні фенотипові зміни клітин у культурі, що унеможлиблювало їх подальше використання у клінічній практиці. Оптимальними для трансплантації є клітини з 1-го та 2-го пасажу, проте, кількість клітин на 1-му пасажі недостатня для застосування у великій групі тварин або під час клінічного застосування у людини. В той же час, культивування МСК до 2-го пасажу дає можливість отримати достатню кількість клітин, які зберігають морфологічні характеристики, притаманні МСК, і є досить однорідні.



**Рис. 3.** Мікрофото. Накопичення ліпідів у МСК. 5-й пасаж. Забарвлення ядер — DAPI, ліпідів — нільським червоним. Зб.х400.



**Рис. 4.** Мікрофото. Спонтанний хондрогенез на 4-му пасажі. Забарвлення альціановим синім. Зб.х100.

**Характеристика особливостей проліферації МСК в культурі.** За даними літератури, з 1 см пуповини можна отримати від  $10^3$  до  $10^5$  клітин. У наших спостереженнях доведено, що цей показник варіює залежно від конкретного зразка. Сумарна кількість клітин, яку можна отримати з певного зразка пуповини довжиною 15–25 см за тривалого пасажування протягом 2 пасажів становить  $10^{10}$ .

Під час процедури отримання клітин з зразка пуповини довжиною до 15 см (найбільш частий варіант) виявляли до  $10^6$  округлих клітин, що містять ядро. Проте, кількість власне МСК можна оцінити лише після першого пересіву культури.

Час подвоєння популяції (ЧПП) різнився на етапах пасажування, проте, встановлені деякі відмінності і в межах одного пасажу культур клітин, отриманих з різних зразків пуповини. ЧПП також залежав від стадії росту культури: у log- чи lag-фазі. Вважають, що за постійного пересівання культури у log-фазі популяція подвоюється швидше. Найбільше часу для подвоєння потрібно у період після виділення клітин з пуповини — на 0 пасажі, у середньому ( $82,86 \pm 4,78$ ) год. Важливим моментом на цьому етапі є обрання часу першого пересіву. Потрібно накопичити певну кількість клітин (понад  $10^5$ ), проте, не пропустити log-фазу та не перетримати клітини до lag-фазу, коли ЧПП не буде зменшуватись, і клітини старішатимуть та гинуть. На 1–2-му пасажі ЧПП становить ( $53,28 \pm 8,9$ ) та ( $45,57 \pm 4,04$ ) год. Найменшим є ЧПП на 3-му пасажі — ( $28,43 \pm 5,44$ ) год. Після 3-го пасажу ЧПП збільшується і становить у середньому ( $35,14 \pm 3,44$ ) год — на 4-му пасажі та ( $34 \pm 7$ ) год — на 5-му пасажі (рис. 5). Таким чином, МСК на рівні 5-го пасажу отримували приблизно через 1 міс культивування.

За даними літератури, ЧПП клітин матриксу пуповини варіює від 11 до 87 год. Це протиріччя може бути пов'язане з гетерогенністю пуповини як джерела мезенхімальних клітин. Під час дослідження великої кількості зразків найбільш яскраво проявляються відмінності росту культур клітин, отриманих від різних донорів.

**Характеристика МСК за поверхневими маркерами.** За рекомендаціями Міжнародного товариства з клітинної терапії [18], клітини можуть бути віднесені до МСК, якщо вони експресують принаймні 3 поверхневих маркери — CD73, CD90, CD105 та негативні за CD34 і CD45. Нами показано, що як свіжо виділений клітинний матеріал, так і матеріал 1-го та 2-го пасажів в культурі відповідає цим критеріям (рис. 6).

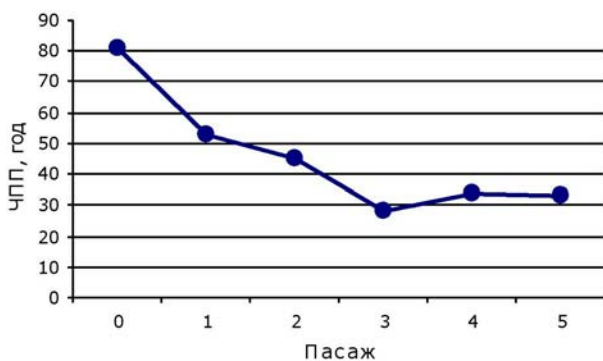


Рис. 5. Зміни ЧПП під час пасажування (МСК від 0 до 5-го пасажу).

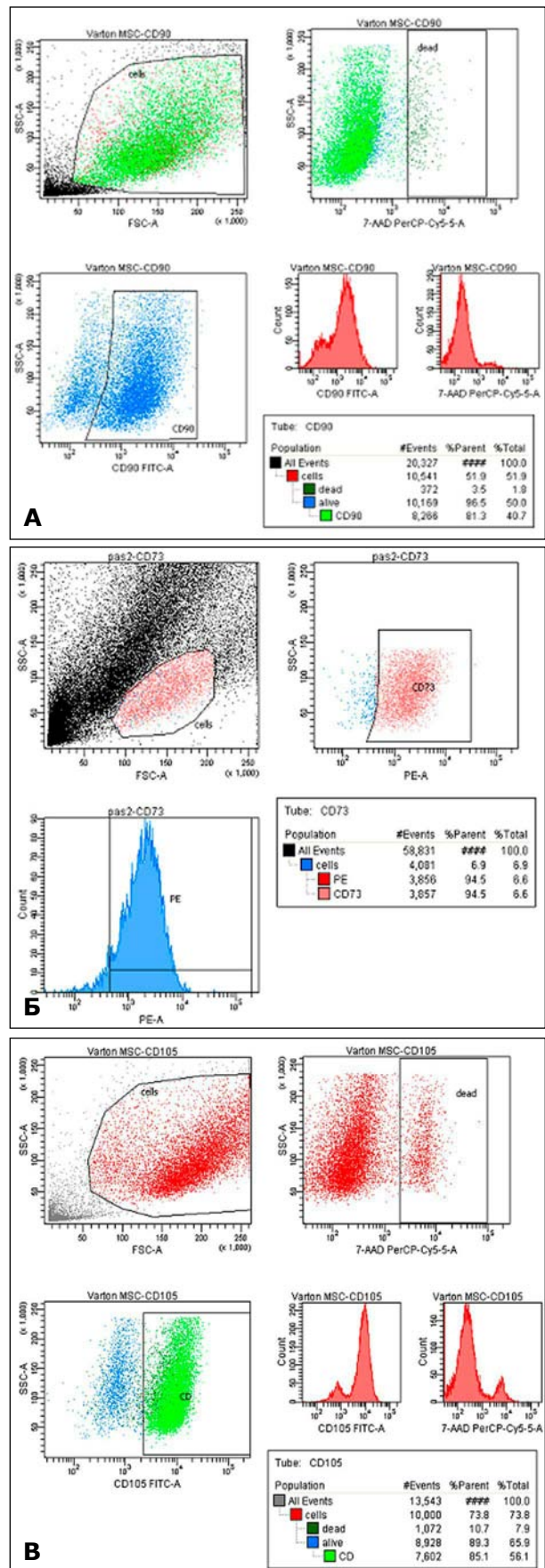


Рис. 6. Експресія позитивних CD90 (А), CD73 (Б), CD105 (В) маркерів клітинами з свіжо отриманого матеріалу вартонових драглів пуповини людини за даними FACS-аналізу.

В подальшому під час пасажування експресія поверхневих маркерів мезенхімальними клітинами вартонових драглів пуповини має тенденцію змінюватись, на 6-му пасажі вона була найменшою з середніх значень (рис. 7). Разом з тим, найбільш високою експресією позитивних маркерів характеризувалися клітини 2-го пасажу, що підтверджувало їх максимальну гомогенність, виявлену за морфологією. Спостерігали тенденцію до зменшення інтенсивності експресії маркерів CD105 та CD90 від 1-го до 6-го пасажу, проте, ці зміни недостовірні ( $p > 0,05$ ) через значні відмінності експресії в межах

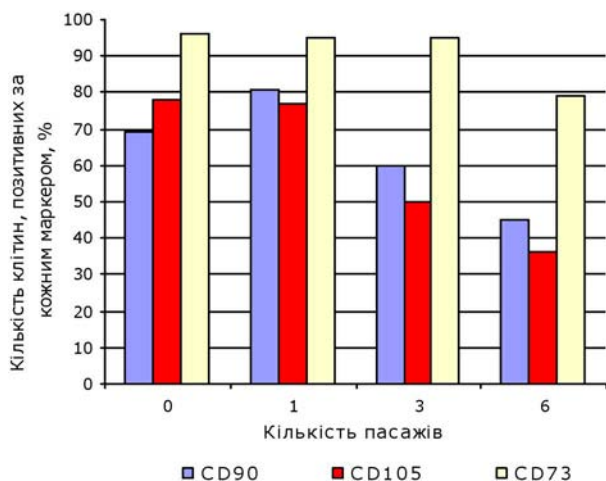


Рис. 7. Експресія позитивних поверхневих маркерів МСК у пасажах (показано середні значення).

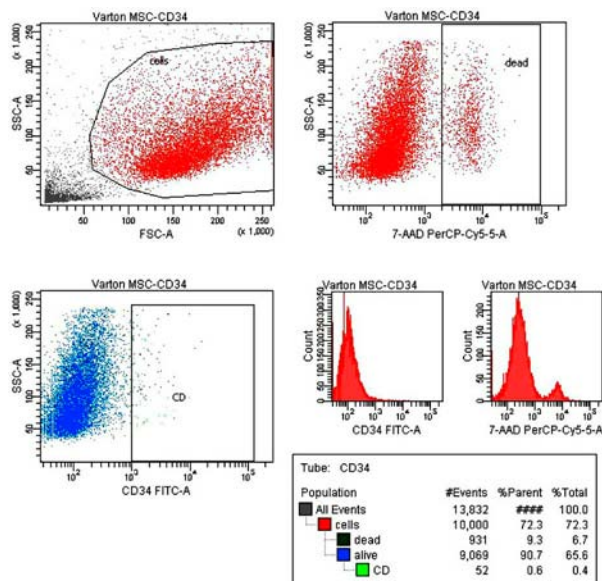


Рис. 8. Низький рівень експресії негативного маркера CD34 клітинами з свіжо отриманого матеріалу вартонових драглів пуповини людини за даними FACS-аналізу.

одного пасажу. Популяція клітин 0 пасажу найбільш гетерогенна за ступенем експресії CD90 (мін 8%, мах 97,8%), 3-го пасажу — за ступенем експресії CD105 (мін 5,5%, мах 75%). Це може свідчити про індивідуальні відмінності зразків пуповини. Найбільш стабільною є експресія маркера CD73 (мін 70,1% — на 6-му пасажі, мах — 99,3% — на 1-му пасажі), вона найменше змінюється під час пасажування, а в межах одного пасажу розкид значень найменший. Культури, що характеризувались більшою гомогенністю та вираженою фібробластоподібною формою клітин, мали й вищу експресію позитивних поверхневих маркерів.

Основним негативним маркером МСК вважають CD34 (позитивний маркер гемопоетичних стовбурових клітин). За результатами наших досліджень, вміст CD34+ клітин в усіх пасажах наближений до 0 (рис. 8). Лише на 0 пасажі спостерігали до 0,6% позитивних за цим маркером клітин, що може бути пов'язане з наявністю невеликої кількості гемопоетичних клітин у матриці пуповини людини. Проте, ці клітини погано адгезувалися до пластика і при пасажуванні еліминувалися.

Таким чином, створений протокол виділення й культивування до 2-го пасажу в культурі МСК вартонових драглів пуповини людини, що забезпечує отримання значної кількості характерних клітин, придатних для подальшого використання у тварин, та в перспективі, і в клінічній практиці. Цей протокол має переваги у порівнянні з такими, що існували, оскільки, по-перше, охоплює всі етапи процесінгу одержання матеріалу з пуповини; по-друге, обґрунтовує можливість подальшого використання клітин не більше 2-го пасажу в культурі; по-третє, адаптований до отримання необхідної кількості клітин (40 млн.) в обмежені (1 міс) строки.

**Висновки.** 1. Створений протокол отримання МСК з вартонових драглів пуповини людини з дослідженням їх фенотипових та проліферативних властивостей в умовах культивування.

2. В динаміці культивування МСК, отриманих з вартонових драглів пуповини людини, відзначено тенденцію до зменшення інтенсивності експресії маркерів CD105 та CD90, хоча ці зміни недостовірні. Найбільш стабільною є експресія маркера CD73.

3. Властивості МСК (типова морфологія, експресія поверхневих маркерів) зберігаються протягом 2 пасажів культивування. В більш пізні строки з'являються ознаки деградації культури та втрати клітинами мезенхімального мультипотентного фенотипу, виникає спонтанне адипогенне та хондрогенне диференціювання у моношарі.

4. Протягом культивування до 2-го пасажу можна отримати біля  $40 \times 10^6$  клітин з ділянки пуповини довжиною 15 см. З лікувальною метою необхідно використовувати МСК пуповини людини не вище 2-го пасажу в культурі.



## Список літератури

- Augello A. Mesenchymal stem cells: a perspective from in vitro cultures to in vivo migration and niche / A. Augello, T.B. Kurth, C. De Bari // *Eur. Cell Mater.* — 2010. — V.20. — P.121-133.
- Bieback K. Mesenchymal stromal cells from human perinatal tissues: From biology to cell therapy / K.Bieback, I.Brinkmann // *World J. Stem Cells.* — 2010. — V.2, N4. — P.81-92.
- Targeting miRNAs involved in cancer stem cell and EMT regulation: An emerging concept in overcoming drug resistance / Z. Wang, Y. Li, A. Ahmad, A. Azmi, D. Kong, S. Banerjee, F. Sarkar // *Drug Resistance Updates.* — 2010. — V.13, N4-5. — P.109-118.
- Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease / J-P. Thiery, H. Acloque, R.Y..J. Huang, M.A. Nieto // *Cell.* — 2009. — V.139, N5. — P.871-890.
- Пролиферативний і диференцировочний потенціал мезенхімальних стоволових кліток із жирової тканини в умовах культивування / В.М.С еменова, Н.И. Лисяний, Л.П. Стайно, Л.Н. Бельська, Д.М. Егорова // *Укр. нейрохірург. журн.* — 2014. — №3. — С.24-29.
- Kalluri J. EMT: When epithelial cells decide to become mesenchymal-like cells / J. Kalluri // *J. Clin. Invest.* — 2009. — V.119, N6. — P.1417-1419.
- Selezneva T. *Gistologiya: polnyi kurs za tri dnya* / T. Selezneva, A. Mishyn, V. Barsukow. — М.: Eksmo, 2007. — 354 p.
- Kalluri R. Fibroblasts in cancer / R. Kalluri, M. Zeisberg // *Nat. Rev. Cancer.* — 2006. — V.6, N5. — P.392-401.
- Multipotent menstrual blood stromal stem cells: isolation, characterization, and differentiation / A. Patel, E. Park, M. Kuzman, F. Benetti, F. Silva, J. Alickson // *Cell Transplant.* — 2008. — V.17, N3. — P.303-311.
- Huang G.T.-J. Mesenchymal stem cells derived from dental tissues vs. those from other sources: their biology and role in regenerative medicine / G.T.-J. Huang, S. Gronthos, S. Shi // *J.D.R.* — 2009. — V.88, N9. — P.792-806.
- Taghizadeh R.R. Wharton's jelly stem cells: future clinical applications / R.R. Taghizadeh, K.J. Cetrulo, C.L. Cetrulo // *Placenta.* — 2011. — V.32, suppl.4. — P.311-315.
- Changes in morphofunctional characteristics of umbilical cord matrix mesenchymal cell during passaging / O.O. Maslova, N.S. Shuvalova, O.M. Sukhorada, O.G. Deryabina, M.V. Makarenko // *Probl. Cryobiol.* — 2012. — V.22, N2. — P.153-156.
- Козловская Л.В. Учебное пособие по клиническим лабораторным методам исследования / Л.В. Козловская, А.Ю. Николаев. — М.: Медицина, 1984. — 288 с.
- In vitro differentiation potential of mesenchymal stem cells / J.M. Gimble, F. Guilak, M.E. Nuttall, S. Sathishkumar // *Transfus. Med. Hemother.* — 2008. — V.35. — P.228-238.
- Jennings B.R. Interaction of chromosomal stains with DNA / B.R. Jennings, P.J. Ridler // *Biophys. Struct. Mech.* — 1983. — V.10. — P.71-79.
- DNA minor groove binders as potential antitumor and antimicrobial agents / P.G. Baralddi, A. Bovero, F. Fruttarolo, D. Preti, M.A. Tbrizi, M.G. Pavani, R. Romagnoli // *Med. Res. Rev.* — 2004. — V.24. — P.475-528.
- Gray J.W. *Techniques in cell cycle analysis* / J.W. Gray., Z. Darzynkiewicz. — N.J.: Humana Press, Clifton, 1986. — 407 p.
- Kubista M. Characterization of interaction between DNA and 4', 6-Dimidino-2-phenylindole by optical spectroscopy / M. Kubista, B. Akerman, B. Norden // *Biochemistry.* — 1987. — V.26. — P.4545-4553.
- Adult bone marrow is a rich source of human mesenchymal "stem" cells but umbilical cord and mobilized adult blood are not / S. Wexler, C. Donaldson, P. Denning-Kendall, C. Rice, B. Bradley, J. Hows // *Br. J. Haematol.* — 2003. — V.121, N2. — P.368-374.

**Цымбалюк В.И.<sup>1</sup>, Дерябина Е.Г.<sup>2</sup>, Шувалова Н.С.<sup>2</sup>, Маслова О.А.<sup>2</sup>, Похоленко Я.А.<sup>3</sup>, Топорова Е.К.<sup>3</sup>, Шпилева С.П.<sup>3</sup>, Кирик В.М.<sup>4</sup>, Пичкур Л.Д.<sup>1</sup>, Касьяненко Ю.А.<sup>1</sup>, Пичкур А.Л.<sup>1</sup>, Кордюм В.А.<sup>3</sup>**

<sup>1</sup> Отделение восстановительной нейрохирургии, Институт нейрохирургии им.акад. А.П. Ромоданова НАМН Украины, Киев, Украина

<sup>2</sup> Отдел генных технологий, Институт генетической и регенеративной медицины НАМН Украины, Киев, Украина

<sup>3</sup> Отдел регуляторных механизмов клетки, Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины, Киев, Украина

<sup>4</sup> Лаборатория клеточных и тканевых культур отдела клеточных и тканевых технологий, Институт генетической и регенеративной медицины НАМН Украины, Киев, Украина

## **Фенотипические изменения и пролиферативный потенциал мезенхимальных стволовых клеток из вартонова студня пуповины человека в условиях культивирования**

### **Аннотация**

**Цель.** Разработать протокол получения мезенхимальных стволовых клеток (МСК) из вартонова студня пуповины человека, исследовать их фенотипические изменения и пролиферативный потенциал в условиях культивирования.

**Материалы и методы.** МСК пуповины человека культивировали на протяжении 6 пассажей. Для исследования морфологических характеристик клеток в культуре использовали методики окраски гематоксилином и эозином, адаптированные для использования в культурах клеток, по Романовскому–Гимзе, толудиновым синим. Для окраски ядерной ДНК использовали реагенты-интеркаляторы: Hoechst 33342, DAPI и Ethidiumbromid. Экспрессию поверхностных маркеров МСК (CD105, CD90, CD73, CD34) изучали с помощью FACS-анализа.

**Результаты.** В культуре МСК сохраняют свою морфологическую идентичность на протяжении 2 пассажей. В дальнейшем наблюдают тенденцию к уменьшению интенсивности экспрессии маркеров МСК, признаки деградации культуры, появление на поздних пассажах спонтанной адипогенной и хондрогенной дифференциации.

**Выводы.** При культивировании МСК пуповины человека на протяжении 2 пассажей сохраняют морфологические характеристики и пролиферативный потенциал, в последующем они утрачивают мезенхимальный мультипотентный фенотип.

**Ключевые слова:** мезенхимальные стволовые клетки; пуповина человека; культивирование; пролиферативный потенциал.

Укр. нейрохирург. журн. — 2015. — №2. — С.17-24.

Поступила в редакцию 07.12.14. Принята к публикации 20.04.15.

**Адрес для переписки:** Пичкур Александр Леонидович, Отделение восстановительной нейрохирургии, Институт нейрохирургии им. акад. А.П. Ромоданова, ул. Платона Майбороды, 32, Киев, Украина, 04050, e-mail: o.pichkur@gmail.com

**Tsybaliuk V.I.<sup>1</sup>, Deriabina E.G.<sup>2</sup>, Shuvalova N.S.<sup>2</sup>, Maslova O.O.<sup>2</sup>, Pokholenko Ya.O.<sup>3</sup>, Toporova O.K.<sup>3</sup>, Shpileva S.P.<sup>3</sup>, Kirik V.M.<sup>4</sup>, Pichkur L.D.<sup>1</sup>, Kasianenko Yu.A.<sup>1</sup>, Pichkur O.L.<sup>1</sup>, Kordium V.A.<sup>3</sup>**

<sup>1</sup> Restorative Neurosurgery Department, Institute of Neurosurgery named after acad. A.P. Romodanov, NAMS of Ukraine, Kiev, Ukraine

<sup>2</sup> Department of Gene Technology, Institute of Genetic and Regenerative Medicine, NAMS of Ukraine, Kiev, Ukraine

<sup>3</sup> Department of Regulatory Mechanisms of Cells, Institute of Molecular Biology and Genetics, NAS of Ukraine, Kiev, Ukraine

<sup>4</sup> Laboratory of Cell and Tissue Cultures of Cell and Tissue Technology Department, Institute of Genetic and Regenerative Medicine, NAMS of Ukraine, Kiev, Ukraine

## **Phenotypical changes and proliferative potential of mesenchymal stem cells from humans Wharton's jelly in the cultivation conditions**

### **Abstract**

**Purpose.** To develop a protocol for mesenchymal stem cells (MSCs) obtaining from wharton's jelly of human umbilical cord, to study their phenotypic changes and proliferative potential in culture.

**Materials and methods.** MSCs from human umbilical cord were cultured for 6 passages. To study morphological features of the cells in a culture we used adapted staining with eosin and gematoksilin, Romanovsky–Giemsa, and toluidine blue. For nuclear DNA coloring we used intercalators: Hoechst 33342, and DARI Ethidiumbromid. MSCs surface markers (CD105, CD90, CD73, CD34) expression was studied by FACS-analysis.

**Results.** In the culture MSCs retain their morphological identity for 2 passages. Further a tendency to MSCs markers expression decreasing was observed, signs of culture degradation, spontaneous chondrogenic and adipogenic differentiation in late passages.

**Conclusion.** Cultured MSCs of human umbilical cord for 2 passages retain their morphological characteristics and proliferative potential, further they lose multipotent mesenchymal phenotype.

**Key words:** mesenchymal stem cells; human umbilical cord; cultivation; proliferative potential.

Ukr Neurosurg J. 2015;2:17-24.

Received, December 07, 2014. Accepted, April 20, 2015.

**Address for correspondence:** Olexandr L. Pichkur, Restorative Neurosurgery Department, Institute of Neurosurgery named after acad. A.P. Romodanov, 32 Platona Mayborody St, Kiev, Ukraine, 04050, e-mail: o.pichkur@gmail.com