

**Особливості культивування та кріозберігання
стовбурових клітин з пуповини щурів**

ЗМІСТ

Вступ.....	3
Розділ 1. Сучасні проблеми використання стовбурових клітин (огляд літератури).....	5
Розділ 2. Матеріали та методи дослідження.....	11
Розділ 3. Результати та їх обговорення.....	15
3.1. Отримання первинної культури МСК.....	15
3.2. Підбір оптимальних умов для росту культури МСК.....	17
3.3. Каріотипування МСК.....	20
3.4. Кріоконсервація МСК.....	22
3.5. Взаємодія МСК із ацелюлярним матриксом.....	22
Висновки.....	24
Список використаної літератури.....	25

ВСТУП

Стовбурові клітини (СК) є недиференційованими структурними компонентами ембріональних зачатків чи сформованих тканин та органів, що володіють здатністю перетворюватися в спеціалізовані клітини та мають величезний потенціал для розмноження. СК можуть відновлювати пошкоджені клітини, тканини чи органи людини та повертати їх до нормального функціонування. Завдяки цим властивостям вони можуть бути використані у регенеративній медицині для лікування різноманітних патологій людини [Zomer et al., 2015].

З усіх типів СК найбільший терапевтичний потенціал мають мезенхімальні стовбурові клітини (МСК), виділені з пуповини, амніону, плаценти. На відміну від ембріональних та індукованих плюрипотентних стовбурових клітин МСК позазародкових органів мають репресовані онкогени, тому не володіють пухлиногенністю [Хлусов и др., 2018].

На відміну від стовбурових клітин дорослого організму МСК перинатального матеріалу є менш імуногенними, оскільки характеризуються низькою експресією антигенів МНС I класу, а також низькою чи нульовою експресією антигенів МНС II класу. Це захищає їх при алогенному введенні від атаки Т-лімфоцитів та природних кілерів реципієнта [Han et al., 2017].

Важливими перевагами МСК, отриманих із післяродового матеріалу, порівняно зі стовбуровими клітинами з інших джерел дорослого організму чи ембріона, є доступність, економічність, етичність, мультипотентність, вищий регенераторний потенціал і низький ризик передачі інфекцій [Шехтер, 2015; Brockmann et al., 2017].

Відомо, що при тривалому культивуванні МСК *in vitro* у клітинній популяції можуть виникати хромосомні аберації чи геномні мутації, як ознаки спонтанного мутагенезу. Порушення кількості генетичного матеріалу може призвести до неправильного функціонування геному, що негативно впливає на клітину, аж до її пухлинної трансформації [Омельченко и др., 2011; Мазуркевич та ін., 2017]. З активним розвитком клітинних технологій у регенеративній

медицині все більшої актуальності набуває збереження генетичної стабільності клітинних ліній [Мазуркевич та ін., 2017, Mayshar et al., 2010].

Для отримання життєздатних стовбурових клітин після кріоконсервації важливим є відпрацювання такої методики, яка б дозволяла довготривало зберігати ці клітини із збереженням максимальної життєздатності після процедури розморожування [Смолянинов и др., 2009].

Мета дослідження. Метою даної роботи є розробка ефективних методик отримання, культивування, а також проведення цитогенетичного аналізу і кріоконсервації мезенхімальних стовбурових клітин пуповини щура.

Для реалізації мети поставлено такі **завдання:**

- 1) отримати первинну культуру МСК з Вартонових драглів пуповини щура;
- 2) підібрати умови культивування та кріоконсервації МСК з пуповини щура;
- 3) провести цитогенетичний аналіз пуповинних МСК на ранніх пасажах;
- 4) з'ясувати ефективність взаємодії стовбурових клітин із ацелюлярним матриксом з метою оцінки його цитотоксичного впливу.

Об'єкт дослідження: МСК перинатального матеріалу.

Предмет дослідження: підбір методик отримання, культивування та кріоконсервації МСК з пуповини щурів на основі оцінки життєздатності та проліферативного потенціалу клітин.

Практичне значення. Отримані результати послужать основою для подальшого використання стовбурових клітин для вивчення їх регенеративного потенціалу при корекції змодельованих експериментальних патологій у щурів.

РОЗДІЛ 1. СУЧАСНІ ПРОБЛЕМИ ВИКОРИСТАННЯ СТОВБУРОВИХ КЛІТИН (огляд літератури)

Стовбурові клітини (СК) – це первинні клітини, що зустрічаються в усіх багатоклітинних організмах. Вони можуть самовідновлюватися шляхом мітозу, а також диференціюватися в досить велику кількість спеціалізованих типів клітин [Visvader et al., 2016].

Всі СК володіють двома невід’ємними особливостями: самовідновленням – здатністю зберігати свій фенотип незмінним після поділу (без диференціювання) та диференціальним потенціалом – здатністю спеціалізуватися в різні типи клітин при певних умовах.

У науковій літературі найчастіше використовують 2 класифікації СК: за здатністю до диференціювання та за джерелами їх походження або виділення.

За здатністю диференціюватися СК діляться на 5 груп: тотипотентні, плюрипотентні, мультипотентні, олігопотентні, уніпотентні (клітини-попередники) [Мезен и др., 2014; Шилина, 2017].

За походженням і джерелами отримання СК можна розділити на: ембріональні (з внутрішньої клітинної маси бластоцисти); фетальні (отримують з абортівного матеріалу на 9–12 тижні вагітності); перинатальні (отримані з післяродового матеріалу: плаценти, пуповини, амніону); СК дорослого організму та індуквані плюрипотентні СК. [Мезен и др., 2014; Yeo & Ng, 2013]

СК дорослого організму поділяються на такі види: популяція СК шкіри, яка включає базальні кератиноцити та малодиференційовані попередники фібробластів; СК жирової тканини (за рекомендацією «Міжнародного товариства стовбурових клітин, отриманих з жирової тканини» прийнято називати стромально-васкулярною фракцією) яка включає в себе: а) васкулярні (судинні) клітини; б) фібробластоподібні клітини, що розташовуються вздовж капілярів. Їх називають мультипотентними мезенхімальними або стромальними СК (МСК) [Тимченко та ін., 2019]; популяція нейральних СК (нейробласти гіпокампа, нюхової ділянки та паравентрикулярної зони головного мозку);

популяція СК скелетної м'язової тканини (клітини сателіти, клітини бічної популяції або SP-клітини).

На сьогоднішній день перинатальний матеріал розглядають як потужне джерело мультипотентних СК. У 1974 р було показано, що пуповинна кров містить чимало гемопоетичних стовбурових і прогеніторних клітин [Knudtzon, 1974], при цьому інші тканини пуповинного канатика залишалися просто біологічними відходами, що не представляють наукової цінності. Ставлення до строми пуповини було кардинальним чином переглянуто, коли в 1991 р К. McElreavey з співавт. описали культуру фібробластоподібних клітин, виділених з Вартонових драглів [McElreavey et al., 1991]. Належність даних клітин до мультипотентних МСК була доведена в 2004 р.: наявність рецепторів до білків позаклітинного матриксу CD44 і CD105, інтегринів CD29 і CD51, продукція CD73, відсутність експресії гемопоетичних маркерів CD34 і CD45, можливість індукованого диференціювання в остеоцити, хондроцити, адипоцити і кардіоміоцити [Wang et al., 2004]. У даний час до МСК пуповинного канатика відносять клітини, виділені з цілого фрагмента канатика (в англійській літературі – «total umbilical cord-derived») або різних його ділянок (Вартонових драглів, периваскулярної фракції, та субамніотичного шару) [Bongso & Fong, 2013; Щеголев и др., 2010].

У зв'язку з можливістю використання СК в регенеративній медицині, важливим аспектом доклінічного дослідження стає підтримання генетичної стабільності культури клітин поза організмом. У процесі масштабування при збільшенні клітинної маси та тривалості культивування МСК, можуть з'явитися *de novo* клітинні лінії зі змінами хромосомного набору, що, в свою чергу, згодом дають аномальні клітинні лінії. Порушення кількості генетичного матеріалу може призвести до неправильного функціонування геному, що негативно впливає на клітини, аж до злоякісних трансформацій [Мазуркевич та ін., 2017; Омельченко и др., 2011].

У літературних джерелах зустрічаються суперечливі дані щодо можливостей збереження генетичної стабільності клітинних ліній *in vitro*. Є

повідомлення, що майже всі культури ембріональних клітин мишей розвиваються у постійні клітинні лінії в межах трьох місяців культивування. Спонтанна іморталізація і злочасна трансформація клітин частіше відбувається у мишей, ніж у щурів, проте деякі вчені вважають, що це може бути спільною рисою гризунів [Frosina, 2001].

При проведенні цитогенетичного аналізу МСК щурів під час їх культивування *in vitro*, науковці спостерігали зміни каріотипу культури клітин з першого по шостий пасаж. Ними виявлено зміни у генетичному апараті клітин, що проявлялись у вигляді анеуплоїдій, поліплоїдій, а також мікроядер, кількість яких змінювалась залежно від пасажу. Однак, мінливість каріотипу зазначених клітин не перевищувала спонтанного рівня мутацій, характерного для даного виду тварин. Кількість клітин з анеуплоїдним набором хромосом становила від 8,9 до 18,9 %, поліплоїдним набором – від 1,1 до 4,4%, а кількість клітин з мікроядрами знаходилась у межах від 0,2 до 1,9 % [Мазуркевич та ін., 2017].

Для тривалого зберігання МСК активно використовується кріоконсервація. Як правило, кріоконсервування клітин проводять у рідкому азоті ($-196\text{ }^{\circ}\text{C}$) в присутності кріопротекторів для попередження руйнування внутрішньоклітинних структур кристалами льоду. За таких умов біологічний матеріал можна зберігати роками і навіть десятиліттями [Bhattacharya, 2016].

Ефективність низькотемпературного зберігання залежить від виду і типу клітин; їх концентрації в суспензії; складу консерваційного середовища. Важливе значення мають вид і концентрація кріопротектора (речовина, яка дозволить знизити шкідливий вплив фізико-хімічних чинників при кріоконсервуванні) [Shivakumar et al., 2015].

Клітини піддаються заморожуванню не в простих дво- чи трикомпонентних розчинах, а в складних сумішах, які містять у собі солі, цукри, колігативні кріопротектори з позаклітинними кріопротекторами чи без них, а також білки плазми крові. Покращення життєздатності клітин при збільшенні концентрації білка і, можливо, при комбінованому використанні

проникаючих та позаклітинних кріопротекторів може пояснюватись теоріями замерзання і вітрифікації та їх впливом на живу клітину. При зниженні температури нижче температури вітрифікації (склування рідини) збільшення утворених раніше кристалів льоду за рахунок рекристалізації незамерзлої води не може відбуватись, і клітини захищені від прогресуючого механічного пошкодження. Рекристалізація може відбуватися у будь-який час (включаючи час нагрівання), коли температура продукту вища, ніж температура вітрифікації. Оптимальна температура зберігання – це температура нижче точки вітрифікації для кріопротекторного розчину, який використовується. Можуть використовуватись і більш високі температури, але при цьому існує ризик пошкодження клітин, який залежить від температури зберігання і стабільності (в'язкості) розчину за цієї температури [Alberts et al., 2018; Janz et al., 2012].

Окрім механічного та дегідратаційного пошкодження, охолодження саме по собі може призвести до негативних наслідків для клітини.

Хімічна структура кріопротекторів важлива для виживання СК при заморожуванні, і для оптимальної кріоконсервації велике значення має молекулярна взаємодія між кріопротекторами та білковими чи ліпідними молекулами плазмолемі клітин [Chen et al., 2016].

Важливою характеристикою СК є їхня висока міграційна здатність. Мобілізація (міграція СК в ділянки пошкодження чи запалення) та гоумінг (повернення СК у свої ніші) вважаються ланцюжком взаємопов'язаних фізіологічних подій, що цікавлять науковців з точки зору можливості цілеспрямованого впливу на його ланки з метою підвищення ефективності репаративної клітинної терапії. Встановлено, що після системного введення приживлення МСК у пошкоджених тканинах було досить низьким; натомість більшість МСК, що застосовувались внутрішньовенно, були виявлені в легенях та печінці обстежуваних [Börger et al., 2017; Caplan et al., 2011].

При дослідженні імунних властивостей МСК пуповинного канатика було з'ясовано, що ці клітини мають здатність: інгібувати проліферацію ракових

клітин в ксеногенних та алогенних моделях; пригнічувати цитолітичну активність NK-клітин та Т-кілерів (слабкий імуносупресивний ефект); продукувати протизапальні цитокіни та не здатні секретувати костимулюючі молекули CD40, CD80 і CD86, що забезпечують активацію В-лімфоцитів [Арутюнян и др., 2015; Weiss et al., 2008].

У даний час вважається, що імуномодулююча активність МСК пуповини забезпечена паракринним механізмом. Так, наприклад, синтез даними клітинами ІЛ-6 перешкоджає дозріванню дендритних клітин [Deng et al., 2014], синтез простагландину Е2 пригнічує цитолітичну активність NK-клітин [Chatterjee et al., 2014], а синтез індоламін-2,3-діоксигенази (IDO) пригнічує диференціювання Т-хелперів [Liu et al., 2015]. Після стимулювання ІЛ-1 β в МСК пуповинного канатика значно підвищується рівень транскрипції імуномодулюючих цитокінів TGF β 1, IDO, TSG6 і PGE2, причому сильніше, ніж в МСК кісткового мозку і плаценти [Sabapathy et al., 2014]. TSG6 і PGE2 є основними ефекторними молекулами, що забезпечують здатність МСК регулювати ранні етапи запалення за рахунок переключення М1 / М2 шляхів активації макрофагів [Prockop, 2013].

На сучасному етапі розвитку регенеративної медицини суспензії стовбурових клітин використовують з метою інтенсифікації відновлення уражених патологіями чи механічним пошкодженням органів та структур людського тіла. Зокрема, на сьогоднішній день засоби клітинної терапії дозволяють покращити лікування артрозів, розсіяного склерозу, хвороби Крона, Альцгеймера та Паркінсона, цукрового діабету, гепатитів, тощо та сприяють швидшому загоєнню ранових поверхонь з утворенням менш помітних рубців після травм чи оперативних втручань [Арутюнян и др., 2015; Глухов и Аралова, 2015; Хоменко, 2016; Шаповалова и др., 2017; Marshall et al., 2018].

Однак досі залишається актуальним пошук нових засобів, що впливають на процеси репаративної регенерації, надаючи як стимулюючий вплив, так і запобігаючи формуванню рубців [Monavarian et al., 2019; Ridiandries et al., 2018]. Продовжуються пошуки методів лікування, котрі б дозволили добитись

максимально повної репаративної регенерації у зоні пошкодження [Larouche et al., 2016; Martin et al., 2015]. Особливою проблемою залишається лікування повношарових дефектів шкіри. Розширення можливостей біоінженерії з використанням масштабованих *in vitro* СК відкриває нові перспективи у цьому напрямку [Imparato et al., 2017; Larouche et al., 2016; Laverdet et al., 2014 ; Roger et al., 2019].

РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Експерименти проведені на тваринах із дотриманням вимог Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» (ст. 230 від 2006 року), Загальних етичних експериментів над тваринами», схвалених Національним конгресом з біоетики і узгоджених із положеннями «Європейської конвенції щодо захисту хребетних тварин, яких використовують в експериментах та інших наукових цілях» (Страсбург, 1986).

Для отримання первинної культури МСК із віварію брали самку *Rattus norvegicus* Berkenhout на пізній стадії гестації. Евтаназію здійснювали з використанням тіопенталу. Із виділених плодів відбирали пуповинні канатики. Матеріал (Вартонові драгли периваскулярної зони) відмивали від крові стерильним буферним розчином HBSS (Gibco) з додаванням 1 % пеніциліну-стрептоміцину (Sigma). Після ферментації клітинної маси 0,1% колагеназою до центрифужної пробірки додали 4 мл поживного середовища DMEM/F12 Advanced, пропіпетували і відцентрифугували 5 хв при 300 g. Процедуру повторили двічі. Отриманий осад ресуспендували у ростовому середовищі з додаванням 10 % FBS (Gibco) та висадили у культуральні флакони. Культивували в CO₂ інкубаторі за температури 37 °C та концентрації CO₂ – 5 %. Отриманим первинним культурам присвоїли нульовий пасаж (P₀). Візуальну оцінку формування моношару здійснювали за допомогою інвертованого мікроскопа Delta Optical NIB-100. Через кожні 3 доби робили повну заміну поживного середовища, або підживку на ½ або ¼ вмісту середовища з підтриманням концентрації FBS.

Пасажування (пересів) клітинних ліній здійснювали при досягненні щільності клітинної популяції 100 % шляхом теплої трипсинізації. Дно флаконів промивали розчином HBSS, нашаровували фермент Tryple і поміщали на 5 хв у CO₂-інкубатор. Нейтралізацію дії ферменту здійснювали за допомогою кондиційного середовища. Зібрану клітинну суспензію центрифугували 8 хв при 170g, після чого вносили у флакони з розрахунку

50 000 клітин на 1 мл середовища, присвоюючи новий пасаж. Підрахунок клітин у суспензії здійснювали за допомогою гемоцитометра після фарбування вітальним барвником трипановим синім.

Для аналізу ростових властивостей отриманої клітинної лінії клітини розсівали по 350 тис. на культуральний флакон площею 25 см² та додавали по 7 мл ростового середовища. Через кожні 24 год клітини знімали з поверхні культурального посуду за допомогою ферменту Tryple, підраховували їхню кількість у гемоцитометрі. При закисленні поживного середовища (індикатор феноловий червоний набував оранжевого кольору) його замінювали на свіже. Для кожного пасажу робили по три повтори та будували загальну криву росту за середніми значеннями.

Для перевірки якості клітинної лінії на відсутність спонтанного мутагенезу проводили цитогенетичний аналіз клітин на різних пасажах. За даними літератури для щурів лінії WISTAR *Rattus norvegicus* Berkenhout в нормі каріотип налічує 42 хромосоми [Омельченко и др., 2011; Чабала и др., 2011].

Каріотипування проводили на 16 метафазних пластинках на третьому, четвертому та п'ятому пасажах. Для отримання препаратів хромосом використовували модифікацію стандартного цитогенетичного методу [Мазуркевич, Малюк, 2015]. Процедуру проводили на 3, 4 та 5 доби, коли клітинна популяція досягла логарифмічної фази росту. Після інкубування клітин протягом 3 год у колхіцині у концентрації 1×10^{-7} М при 37 °С, здійснювали трипсинізацію впродовж 10 хв у CO₂-інкубаторі при 37 °С. Після нейтралізації ферменту до клітин додали теплий гіпотонічний розчин KCl (0,07 М) та інкубували ще 30 хв. Фіксацію матеріалу здійснювали оцтовим метанолом (у співвідношенні 1:3) на танучому льоді протягом 10 хв. Фіксатор замінювали двічі, потім суспензію клітин розкапували на холодні вологі предметні скельця. Зразки фарбували розчином Романовського-Гімзи («Merck», Німеччина) 25 хв та аналізували за допомогою мікроскопа Nikon Eclipse Ci-E (Японія).

Кріоконсервацію МСК здійснювали на 3–4 пасажах після досягнення моношару – конфлюенту 100 %. Спочатку клітини відкріплювали від дна культуральних флаконів, ферментуючи Tryple протягом 5 хв. Далі клітинну суспензію збирали у пробірки та центрифугували 8 хв 170g. Осад розчиняли у свіжій порції поживного середовища. У кріопробірки вносили по 50 % клітинної суспензії у поживному середовищі DMEM. Для зменшення токсичного впливу кріопротектора на МСК, додавали спеціальне середовище для заморожування (15 % поживного середовища DMEM₀ (без антибіотиків), 20 % ембріональної сироватки FBS, 10 % кондиційного середовища DMEM, 5 % DMSO (Sigma)) у 2 етапи (по 0,5 мл). Подальше зберігання клітинного матеріалу здійснювалось в умовах низькотемпературного холодильника при -80 °C (проміжний етап) та рідкого азоту (-196 °C) – кінцевий етап.

Розморожування кріопробірок з клітинною суспензією здійснювали двома способами. I спосіб: клітинну суспензію швидко розморозили у термобані при 37 °C, внесли у пробірку та підраховали кількість живих клітин у гемоцитометрі, зафарбовуючи трипановим синім. Далі розбавили клітинну суспензію у 10 разів поживним середовищем DMEM. Після ресуспендування внесли у культуральний флакон 175 см², довівши концентрацію FBS до 10 %. На наступну добу повністю замінили середовище зі збереженням концентрації сироватки 10 %.

II спосіб: до суспензії додали 10-кратну кількість поживного середовища DMEM, ресуспензували та центрифугували 5 хв при 170g. Осад розвели у середовищі DMEM з метою повного відмивання від кріопротектора, а далі провели аналогічні першому способу маніпуляції. При цьому виді розморожування заміни середовища через 24 год не здійснювали.

Для визначення цитотоксичності ацелюляризованого ліофілізованого матриксу (як новітнього засобу лікування повношарових ранових дефектів шкіри) проводили дослідження росту клітинної лінії МСК пуповини в присутності шматочків дерми та перикарду свині. Даний матеріал був люб'язно

наданий доц. Куляндою ТНМУ ім. Горбачевського. Експеримент закладали у шести повторностях у дванадцятилункових культуральних планшетах.

Клітинну суспензію у поживному середовищі DMEM/F12 Advanced з додаванням 2% ЕСТ вносили з розрахунку 50 000 клітин в 1 мл на одну лунку (600 000 клітин на один планшет). Шматочки перикарду та дерми використовувалися розміром ~ 5 мм x 5 мм. Для експерименту сформували контроль – 4 лунки (клітинна суспензія без шматочків безклітинного матриксу); варіант I – 2 лунки (клітинна суспензія + шматочок сухого перикарду); варіант II – 2 лунки (клітинна суспензія + шматочок вимоченого перикарду у кондиційному ростовому середовищі протягом 1 год); варіант III – 2 лунки (суспензія + шматочок сухої дерми); варіант IV – 2 лунки (суспензія + шматочок вимоченої дерми у кондиційному ростовому середовищі протягом 1 год).

Статистичний аналіз даних виконували за допомогою програм Excel (MS Office 2010). Дані представлені у вигляді середнього арифметичного значення із зображенням стандартної похибки ($\pm S.D.$) середнього значення.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

3.1. Отримання первинної культури МСК

Клітинну лінію МСК пуповини плодів щурів у вигляді суспензії висівали на культуральні флакони для прикріплення до дна культурального пластику. Мікроскопічний аналіз первинних клітинних ліній, здійснювали через 48 год після висівання [пат. 79270 Україна, 2013]. У культурі МСК пуповини спостерігали часткову адгезію клітин. Клітини мали типову фібробластоподібну морфологію – були витягнутої форми з двома основними діаметрально розташованими відростками (мал. 3.1). Щільність клітинної популяції становила менше 10 %, спостерігалась зміна рН середовища у бік кислого (індикатор кислотності фенол червоний – обов'язковий компонент поживного середовища DMEM /F12 Advanced – набував помаранчевого кольору).



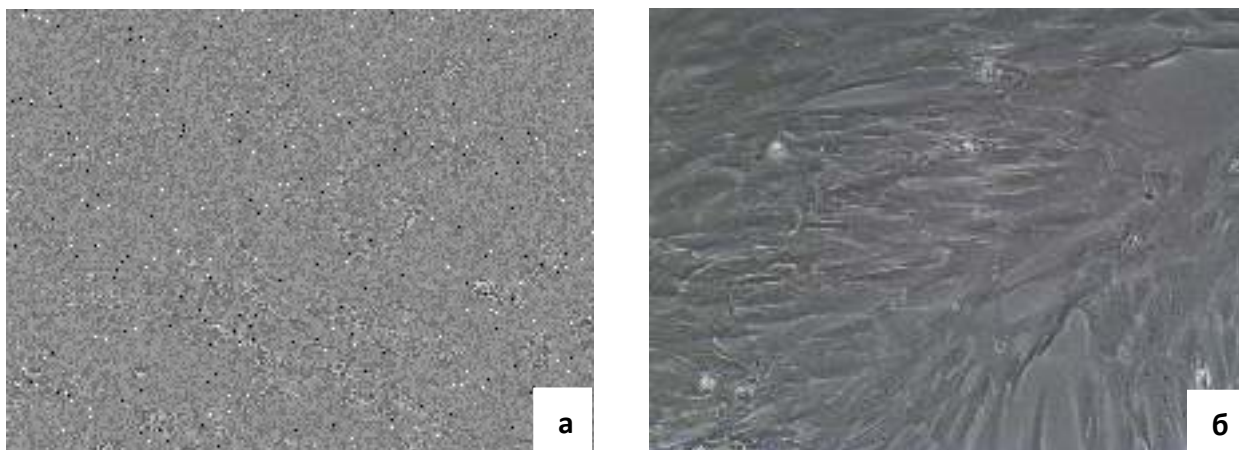
Мал. 3.1 Первинна культура МСК пуповини на третю добу культивування. Збільшення *x100*

З метою видалення відмерлих, пошкоджених клітин чи неприкріплених формених елементів крові на третій день культивування була здійснена повна заміна поживного середовища у культуральному флаконі зі збереженням концентрації ЕСТ 10%.

Наступний аналіз первинної культури клітин строми пуповини здійснили

через 4 доби після посіву матеріалу. На цей час культивування щільність клітинної популяції – конфлюент – становив приблизно 50 % (мал. 3.2 а). На даному етапі знову здійснили заміну середовища, але зі зменшенням вмісту сироватки до 2 %.

100 % конфлюент (моношар клітин) у первинній культурі МСК пуповини одержали на 8 добу культивування (мал. 3.2 б). Після цього здійснили пасажування клітин згідно описаного вище протоколу. Результати інтенсивності росту первинної культури стромальних клітин пуповини висвітлені у таблиці 3.1.



Мал. 3.2 Первинна культура МСК пуповини на четверту (а) та сьому добу (б) культивування. Збільшення $\times 100$

Таблиця 3.1.

Залежність щільності клітинної популяції пуповинної строми від тривалості культивування (%), $M \pm m$

Доба	Конфлюент, %
2	$8,0 \pm 2,0$
3	$25,0 \pm 5,0$
4	$50,0 \pm 5,0$
5	$75,0 \pm 5,0$
6	$87,0 \pm 3,0$
7	$95,0 \pm 2,0$
8	100

3.2. Підбір оптимальних умов для росту культури МСК

Утворення 100 % конфлюенту є підставою для пасажування клітин. З метою знизити темпи проліферації клітинної популяції Вартонових драглів було вирішено перевести клітинну лінію на ростове середовище зі зниженою концентрацією сироватки – 2 %. Для порівняння впливу різного складу поживного середовища на інтенсивність росту клітин пуповинної строми було використано два види культуральних середовищ DMEM/F12 та DMEM/F12 Advanced. Відмінність між цими середовищами полягає у тому, що DMEM/F12 Advanced має додатково у своєму складі інсулін, трансферин, етаноламін, глутатіон, аскорбінову кислоту, додаткове джерело білка AlbuMAX® II, тому його можна використовувати із додаванням мінімальних концентрацій ЕСТ [Ковпак та ін., 2016].

Оскільки усі клітинні лінії були отримані та культивовані на середовищі DMEM/F12 Advanced, то експеримент мав такий вигляд: контроль – середовище DMEM/F12 Advanced із концентрацією сироватки 2 %; дослід – DMEM/F12 з аналогічною концентрацією ЕСТ.

Мікроскопічний аналіз стану клітинних популяцій у контрольній та дослідній групах здійснювали щодня впродовж першого пасажу (P1) до утворення 100% моношару клітин на дні культуральних флаконів. Було виявлено, що клітинна лінія МСК пуповини у варіанті контролю досягнула 100 % конфлюенту на 4 добу культивування, тоді як у варіанті досліді такий результат було зафіксований лише через 6 діб від початку пасажу (табл. 3.2).

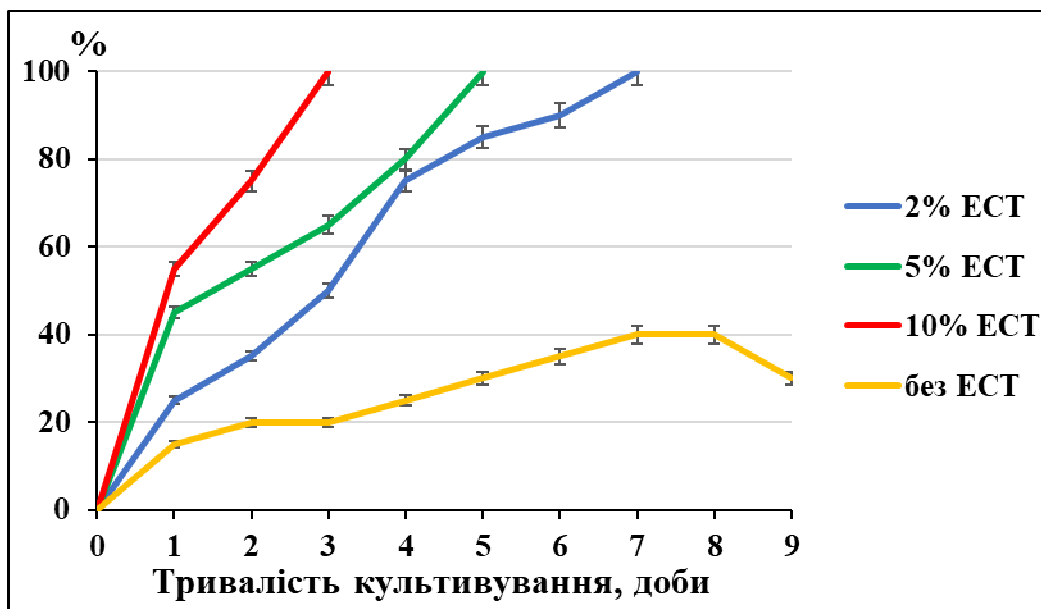
Таблиця 3.2

Вплив різних видів поживних середовищ на інтенсивність росту клітинної культури МСК пуповини, ($M \pm m$, %)

Дослідна група	Час культивування						
	1 доба	2 доба	3 доба	4 доба	5 доба	6 доба	
DMEM/F12 Advanced	60,0±2,0	70,0±5,0	85,0±2,0	100			
DMEM/F12	40,0±5,0	50,0±5,0	65,0±5,0	80,0±5,0	95,0±2,0	100	

Одержані результати свідчать про те, що обидва види середовищ сприятливо впливають на проліферацію клітинних ліній, адже клітини інтенсивно розмножуються на цих поживних середовищах. Відмінність полягає лише у тому, що при однаковій концентрації ЕСТ клітинні лінії, що вирощувалися на середовищі DMEM/F12, наростали трохи повільніше, ніж ті, що культивувалися на DMEM/F12 Advanced. Очевидно, такий результат зумовлений особливими додатками, що присутні у складі останнього середовища. Тобто, при вирощуванні клітинних культур на DMEM/F12 необхідно збільшувати концентрацію ЕСТ.

Окрім впливу хімічного складу середовищ, додатково досліджували вплив різних концентрацій сироватки у поживному середовищі DMEM/F12 Advanced – 2, 5, 10 % та безсироваткове поживне середовище (через присутність додаткового джерела білка у своєму складі, близького до альбуміну плазми крові) на проліферативну активність клітинних ліній (мал 3.3.) Для експериментів використані клітинні лінії на 2 та 3 пасажах.

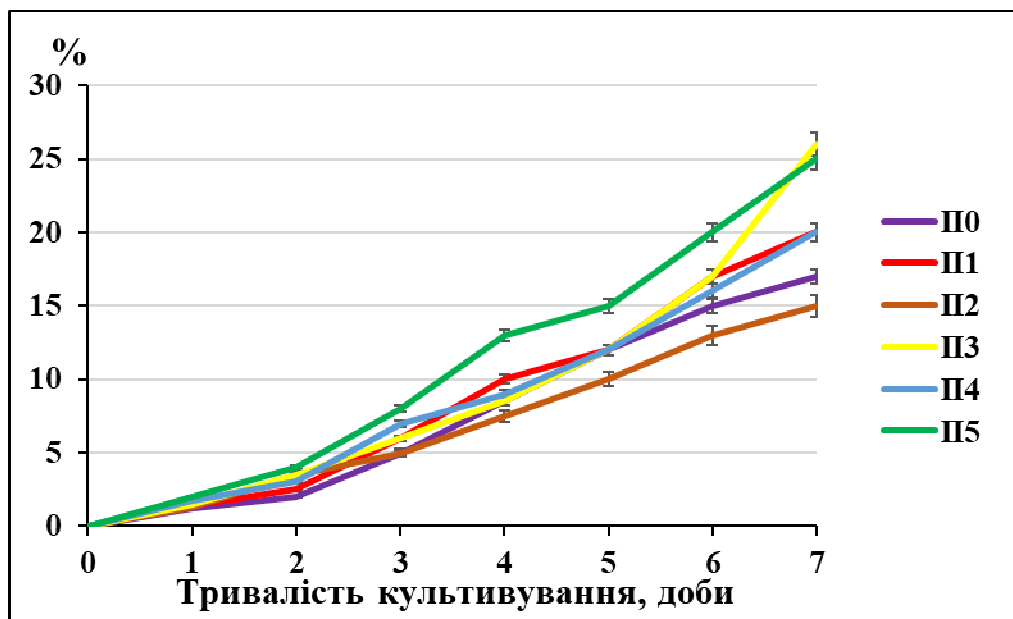


Мал. 3.3. Вплив різної концентрації сироватки у поживному середовищі DMEM/F12 Advanced на ріст МСК пуповинних канатиків

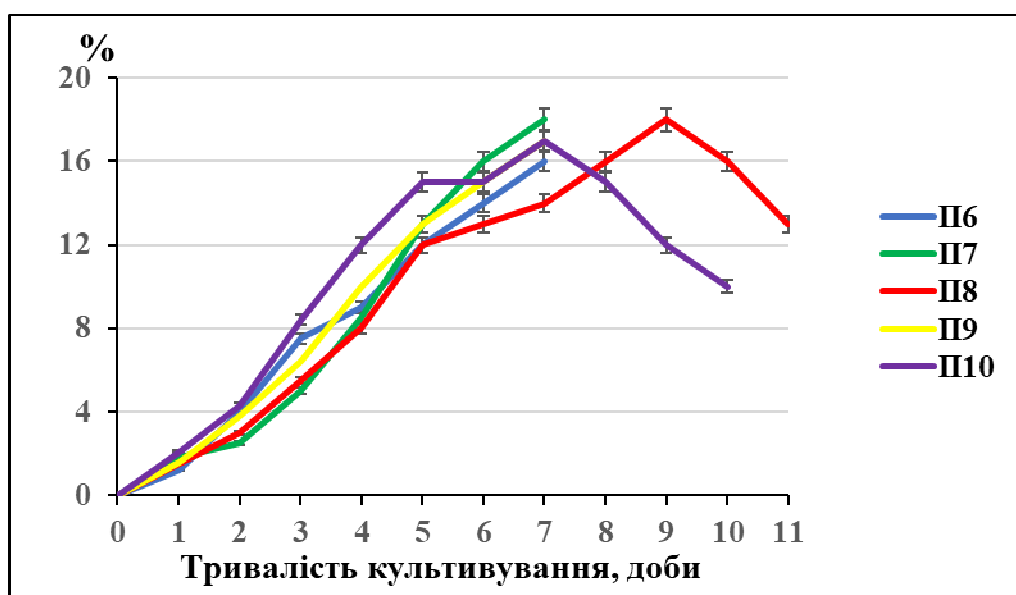
При культивуванні клітин на безсироватковому середовищі клітинні лінії призупиняли проліферацію на 8-9 доби культивування і поступово відмирили. В усіх інших варіантах клітинні лінії спостерігались до утворення 100 % конфлюенту (див. мал. 3.3). На підставі даного аналізу зробили висновок про те, що оптимальною концентрацією сироватки для росту клітинної лінії МСК пуповини є 2 %.

Ростові особливості клітинних ліній МСК аналізували протягом 10 пасажів. Криві росту МСК пуповини 1–5 пасажу характеризувалась lag-фазою майже стандартної тривалості (перші 1–2 доби після висадки клітинної лінії), одразу за якою слідувала стадія експоненціального росту (log-фаза), яка тривала 3 дні (3–5 доби культивування). Після цієї фази наступала стадія сповільненого росту, яка тривала лише добу і відразу наступала фаза плато, що тривала 3 доби. Далі спостерігалася стадія відмирання клітинної лінії. Це відбувалося при досягненні клітинною лінією конфлюенту 100 %, оскільки не залишалось простору для подальшого розмноження та росту нових клітин (мал. 3.4, 3,5).

З 5-го по 10-тий пасаж у всіх клітинних лініях спостерігалася коротша lag-фаза, яка швидко переходила у довготривалу стадію експоненціального росту (4 дні). Після цього наступала довга фаза плато. На 10–13 день культивування клітини поступово починали відмирати, що проявлялося у відкріпленні їх від дна культурального пластику.



Мал. 3.3. Криві росту клітинних ліній (млн) на П₀₋₅



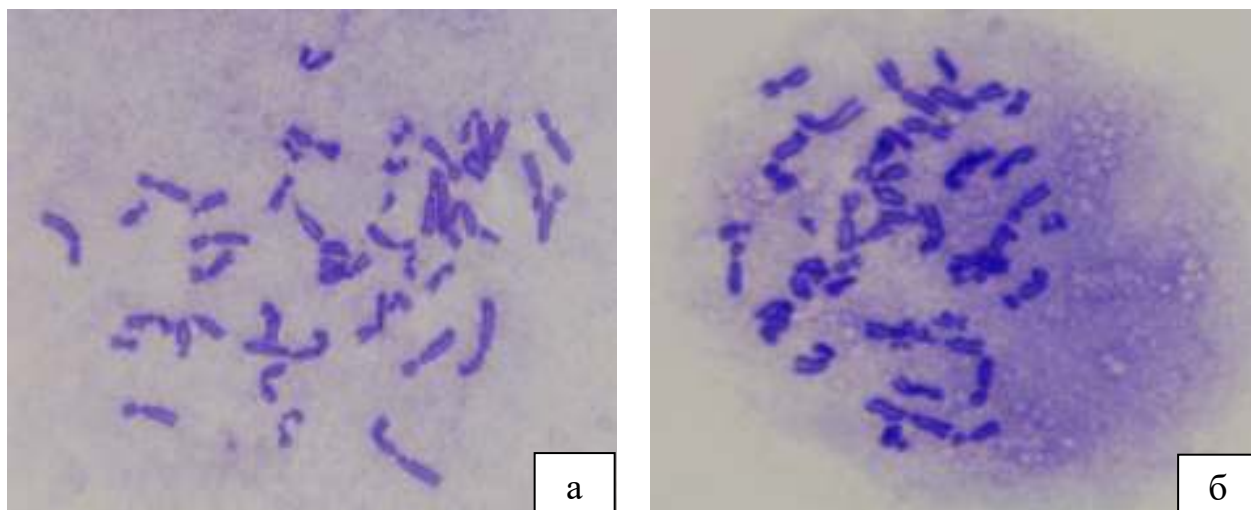
Мал. 3.4. Криві росту клітинних ліній (млн) на П₆₋₁₀

3.3. Каріотипування МСК

За даними наукових досліджень, при тривалому культивуванні та збільшенні клітинної маси МСК в умовах *in vitro*, у них можуть з'явитися клітини з змінами хромосомного набору *de novo* та накопичення хромосомних перебудов, що призведе до порушення стабільності клітинних ліній та неправильного геномного функціонування [Мазуркевич та ін., 2017; Омельченко и др., 2011]. Такі хромосомні аберації також можуть бути

викликані впливом кріопротекторів під час кріоконсервації та при тривалому культивуванні у присутності ростових факторів ЕСТ [Alberts et al., 2018; Shaw et al., 2003; Коваленко и др., 2009].

З метою перевірки збереження стабільності хромосомного набору отриманих клітинних ліній з пуповини щурів, проводили їх цитогенетичний аналіз. Для каріотипування використовували 16 метафазних пластинок МСК на третьому, четвертому та п'ятому пасажах. Процедуру проводили на 3, 4 та 5 доби, коли клітинна популяція досягала логарифмічної фази росту. На кожному препараті аналізували лише ті метафазні пластинки, у яких можна було достовірно підрахувати кількість хромосом (мал. 3.6)



Мал 3.6. Мікрофотографії метафазних пластинок МСК пуповинних канатиків щура: а – на 3 пасажі; б – на 5 пасажі. Збільшення $\times 100$

За результатами мікроскопічного аналізу в отриманих клітинних лініях МСК пуповинних канатиків зберігалось стабільне число хромосом на досліджуваних пасажах. Одержані нами результати узгоджуються з даними інших дослідників про збереження стабільності числа хромосом МСК на ранніх пасажах [Ярцева и Федорцева, 2014; Frosina, 2001].

Однак, як відомо з наукової літератури, зі збільшенням тривалості культивування рівень спонтанних мутацій у клітинах підвищується [Омельченко и др., 2011; Ярцева и Федорцева, 2014]. Тому, доречним є продовження вивчення каріотипу даної клітинної лінії на пізніших пасажах.

3.4. Кріоконсервація МСК

Мікроскопічний аналіз стану культури, здійснений через 1 добу культивування після розморожування зразків, виявив, що більшість клітин не втратили здатність до адгезії та набули типової для МСК морфології. В клітинних лініях МСК, розморожених першим способом (шляхом 10-кратного розбавлення ДМСО), щільність клітинної популяції складала 15 %. За протоколом через добу здійснили заміну середовища у цьому варіанті всіх ліній щоб повністю позбутись токсичної дії кріопротектора на клітини. У другому варіанті, коли ДМСО відразу вилучали з розмороженої клітинної суспензії шляхом центрифугування, конфлюент лінії МСК пуповини виявився малим – близько 5 %.

На 5 добу після розморожування конфлюент у варіанті десятикратного розбавлення вмісту кріопробірки склав 35 %, а у варіанті із центрифугованими клітинами – 30 % відповідно. Досягнення 100 % конфлюенту у варіанті із розбавленими клітинами спостерігався на 9 добу, тоді як у варіанті центрифугованих клітин – лише на 11 добу. Тому, як видно з наведених результатів спосіб розморожування клітинної суспензії методом 10-кратного розведення кріопротектора виявився більш ефективним за альтернативний спосіб негайного усунення диметилсульфоксиду за допомогою центрифугування.

Отже, центрифугування МСК у присутності ДМСО є шкідливішим для клітин, ніж їх вирощування впродовж 24 годин у присутності сильно розведеного розчину кріопротектора.

3.5. Взаємодія МСК із ацелюлярним матриксом

Аналіз взаємодії МСК пуповини з ліофілізованим ацелюлярним матриксом, отриманим з перикарду та дерми свині, показав, що перикард виявився кращим субстратом для взаємодії з досліджуваними СК (як сухі, так і вимочені в кондиційному поживному середовищі шматочки). На 1 добу культивування незначна частина клітин прикріпилася лише у варіанті контролю

та шматочків вимоченої дерми. На 3 добу продовжилася проліферація клітин у контрольних лунках а також почали наростати клітини у варіанті шматочків сухого, вимоченого перикарду, та сухої дерми відповідно (табл. 3.3).

Таблиця 3.3

Взаємодія ацелюлярного матриксу з клітинною лінією МСК пуповини

Шматочки АЦМ	1 доба (конфлюент, %)	3 доба (конфлюент, %)	7 доба (конфлюент, %)
Контроль	2,0±1,0	9±1	15±3
Сухі шматочки перикарду	Клітини плавають, неприкріплені	6±2	10±1
Вимочені 1 год у ДМЕМк	Клітини плавають, неприкріплені	5±1	9±2
Сухі шматочки дерми	Клітини плавають, неприкріплені	2±1	Нема розпластаних
Вимочені 1 год у ДМЕМк	5±1	5±1	Нема розпластаних

На 7 добу після закладки експерименту спостерігається клітинна проліферація у варіантах контролю, а також шматочків сухого та вимоченого перикарду. У випадку шматочків сухої та вимоченої дерми клітинна лінія відмерла. Ефективність впливу ацелюляризованого матриксу на проліферацію клітинних ліній МСК пуповини становила 62,5 %, порівняно з контролем. Очевидно, що ліофілізована ацелюляризована дерма є токсичною для клітин пуповини.

За результатами проведених дослідів можна зробити висновок, що ацелюлярний матрикс у вигляді шматочків сухої дерми більш токсично впливає на досліджувані лінії МСК, порівняно з ліофілізованим перикардом. Тому, саме перикард можна вважати більш придатним для терапевтичного використання з метою лікування дефектів шкіри.

ВИСНОВКИ

У результаті проведення комплексу експериментальних робіт вивчено особливості й розроблено умови отримання первинних і постійних клітинних ліній мезенхімальних стовбурових клітин (МСК) пуловини лабораторних щурів *Rattus norvegicus* Berkenhout лінії WISTAR.

1. З'ясовано, що для вирощування отриманих ліній МСК з Вартонових драглів пуловинного канатика щурів оптимальним серед протестованих є поживне середовище DMEM/F12 Advanced.

2. Встановлено, що оптимальною для ефективної проліферації пуловинних МСК є 2%-ва концентрація ЕСТ.

3. Визначено, що спосіб розморожування клітинної суспензії методом 10-кратного розведення ДМСО виявився ефективнішим за альтернативний спосіб негайного усунення кріопротектора за допомогою центрифугування. Центрифугування МСК у присутності ДМСО є шкідливішим для клітин, ніж їх вирощування впродовж 24 годин у присутності сильно розведеного розчину кріопротектора.

4. Виявлено, що ацелюлярний матрикс у вигляді шматочків ліофілізованої дерми токсично впливає на досліджувані лінії МСК. Клітини краще проліферували у присутності сухого та вимоченого в кондеційному середовищі ліофілізованого перикарду. Ефективність впливу ацелюляризованого матриксу на проліферацію клітинних ліній МСК пуловини становила 62,5 %, порівняно з контролем. Тому, ліофілізований перикард можна пропонувати для терапевтичного використання з метою лікування ранових дефектів шкіри.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Арутюнян И. В., Макаров А. В., Ельчанинов А. В., Фатхудинов Т. Х. Мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки пупочного канатика: биологические свойства и клиническое применение// *Гены и клетки* Т 10, 2015, № 2. стр.: 30-38. URL: <https://www.genescells.ru/article/multipotentnyie-mezenhimalnyie-stromalnyie-kletki-pupochnogo-kanatika-biologicheskie-svoystva-i-klinicheskoe-primenenie> (дата обращения: 17.03.2017).
2. Глухов А. А., Аралова М. В. Патофизиология длительно незаживающих ран и современные методы стимуляции раневого процесса. *Новости хирургии*. Т. 23, № 6. – С. 673-79, 2015.
3. Коваленко И. Ф., Коций С. В., Тимофеева Е. В., Сакун А. В., Коваленко С. Е., Высеканцев И. П., Розанов Л. Ф. Проницаемость мембран клеток СПЭВ для молекул воды и ДМСО *Проблемы криобиологии*. 2009. Т. 19, № 1. С. 25-31.
4. Ковпак В. В., Ковпак О. С. Проліферативна активність мезенхімальних стовбурових клітин щура за впливу культурального середовища. *Наукові доповіді Національного університету біоресурсів і природокористування України*. 2016. №3. С. 62–65.
5. Мазуркевич А.І., Малюк Н.А., Стародуб Л.Ф. Цитогенетичний аналіз мезенхімальних стовбурових клітин кісткового мозку кролів на ранніх пасажах культивування *in vitro*. *Науковий вісник ЛНУВМБТ імені Л.З. Гжицького*. – 2015. Т. 17, № 1 (61) Ч. 2. – С. 100–107.
6. Мазуркевич А.Й., Ковпак В.В., Ковпак О.С. Цитогенетичний аналіз культури клітин жирової тканини щурів на ранніх пасажах // *Український часопис ветеринарних наук*. – 2017. – С. 159–167.
7. Мезен Н. Й., Квачева З. Б., Сичик Л. М. *Стовбурові клітини : навч.-метод. посібник*. Вид 2-е , доп. Мінск: БДМУ, 2014, 62 с.
8. Омельченко Е.А., Кульшин В.Е., Зарубенко Е.С., Панибратцева С.Г., Забирник А.С. Сравнительный цитогенетический анализ стромальных

- клеток костного мозга на различных пассажах у крыс линии WISTAR // Проблемы непрерывной медицинской освіти та науки. – 2011. – № 4. – С. 55-59.
9. Смолянинов А. Б., Багаутдинов Ш. М., Хурцилава О. Г., Кованько Г. Н. Криоконсервация и криохранение стволовых клеток в банках пуповинной крови и костного мозга. Вестник международной академии холода. 2009. – № 2. – С. 38–43.
 10. Спосіб культивування мезенхімальних стовбурових клітин: пат. 79270 Україна: МПК (2013.01) C12N 5/00. № а 2011 13698; заявл. 21.11.2011; опубл. 25.04.2013, Бюл. № 8.
 11. Тимченко А.С., Залесський В.М., Сергутіна С.Ю. Потенційні можливості застосування мезенхімальних стовбурових клітин під час котрансплантації з гемопоетичними СК для регуляції порушеної клітинної рівноваги в системі кровотворення. *Журнал Національної Академії Медичних Наук України*. 2019. Т 25, № 2. – С. 139 – 148
 12. Хлусов И.А., Литвинова Л.С., Юрова К.А., Мелащенко Е.С., Хазиахматова О.Г., Шуплецова В.В., Хлусова М.Ю. Моделирование микроокружения мезенхимных стволовых клеток как перспективный подход к тканевой инженерии и регенеративной медицине (краткий обзор). Бюллетень сибирской медицины. Т. 17, № 3, С. 217–228, 2018
 13. Хоменко І.П. Характеристика бойової хірургічної травми, недоліки та досягнення в лікуванні поранених і травмованих в умовах антитерористичної операції / І.П. Хоменко, А.В. Верба, Е.М. Хорошун // Наука і практика. – 2016. – №1–2. – С. 27–31.
 14. Чабала Л.И., Сливкин А.И., Чабала В.А. Явление структурно-функциональных преобразований хромосом в популяции клеток костного мозга *rattus norvegicus*. *Вестник ВГУ, Серия: Химия. Биология. Фармация*. 2011, № 1. – С. 200–204.
 15. Шаповалова Е. Ю., Морозова М. Н., Барановский Ю. Г., Бойко Т. А., Барановский А. Г. Сравнительная характеристика волокнистого состава

- рубца после введения ауто- и гетерофибробластов в рану у мышей. Здоровье и образование в XXI веке. – 2017. – Т.19, № 3. – С.100–104.
16. Шехтер А.Б. Технология получения и структурные особенности коллагеновых децеллюляризованных коллагенсодержащих матриц для тканевой инженерии в урологии /А.Б.Шехтер, А.Е. Гуллер, Л. П. Истранов, Е.В. Истранова, А. З. Винаров, Д. В. Бутнару, и др.// Архив патологии. – М.: «Медиа Сфера» 2015. – № 6 – С.29- 38.
 17. Шилина М. А. Физиологическая и генетическая характеристика эндометриальных мезенхимных стволовых клеток человека в культуре. дисс. ... к-та биол. наук.: 03.03.04 / Ин-т Цитол. РАН, 2017. 118 с.
 18. Щеголев А.И., Дубова Е.А., Павлов К.А. Морфология плаценты. Москва: НЦАГиП им. В. И. Кулакова; 2010.
 19. Ярцева Н. М., Федорцева Р. Ф. Особенности изменений кариотипа клеток крысы в процессе их трансформации *in vitro*. *Цитология*. 2014. Т. 56, №1. – С. 14–35.
 20. Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Morgan, D., Raff, M., & Keith Roberts, P. W. *Molecular biology of the cell*. 2018.
 21. Bhattacharya, M. S. A review on cryoprotectant and its modern implication in cryonics. *Asian Journal of Pharmaceutics (AJP): Free full text articles from Asian J Pharm*, 2016, 10.3.
 22. Bongso A., Fong C-Y. Phenotype and Differentiation Potential of Stromal Populations Obtained from Various Zones of Human Umbilical Cord: An Overview. *Stem Cell Reviews and Reports* 2013; 9(2): 226-40.
 23. Börger V., Bremer M., Ferrer-Tur R., Gockeln L., Stambouli O., Becic A., Giebel B. Mesenchymal Stem/Stromal Cell-Derived Extracellular Vesicles and Their Potential as Novel Immunomodulatory Therapeutic Agents. *International Journal of Molecular Sciences* 2017. № 18. P. 1450.
 24. Brockmann L., Giannou A.D., Gagliani N., and Huber S. Regulation of TH17 cells and associated cytokines in wound healing, tissue regeneration, and

- carcinogenesis. *International Journal of Molecular Sciences*. – 2017. – Vol. 18, № 5, 1033.
25. Caplan, A. I., Correa, D. The Msc: An Injury Drugstore. *Cell Stem Cell*. – 2011. № 9. – P. 11–15.
26. Chatterjee D., Marquardt N., Tufa D. et al. Role of gammasecretase in human umbilical-cord derived mesenchymal stem cell mediated suppression of NK cell cytotoxicity. *Cell Commun. Signal*. 2014; 12(1): 63.
27. Chen, G., Yue, A., Ruan, Z., Yin, Y., Wang, R., Ren, Y., & Zhu, L. Comparison of the effects of different cryoprotectants on stem cells from umbilical cord blood. *Stem Cells International*. Hindawi Publishing Corporation *Stem Cells International* Volume 2016, Article ID 1396783, 7 p.
28. Deng Y., Yi S., Wang G. et al. Umbilical cord-derived mesenchymal stem cells instruct dendritic cells to acquire tolerogenic phenotypes through the IL-6-mediated upregulation of SOCS1. *Stem Cells Dev*. 2014; 23(17): 2080-92.
29. Frosina G. Counteracting spontaneous transformation via overexpression of rate limiting DNA base excision repair enzymes. *Carcinogenesis*. – 2001. – Vol. 22, № 9. – P.1335-1341.
30. Han, Y. J., Kang, Y. H., Shivakumar, S. B., Bharti, D., Son, Y. B., Choi, Y. H., Park, W. U., Byun, J. H., Rho, G. J., & Park, B. W. Stem cells from cryopreserved human dental pulp tissues sequentially differentiate into definitive endoderm and hepatocyte-like cells in vitro. *International Journal of Medical Sciences*, 2017, 14.13: 1418.
31. Imperato G, Casale C, Scamardella S, et al. A novel engineered dermis for in vitro photodamage research. *J Tissue Eng Regen Med*. Vol.11, pp.2276–2285, 2017.
32. Janz, F.D.L., Debes, A.D.A., Cavaglieri, R. D. C., Duarte, S. A., Romão, C. M., Morón, A. F., & Bydlowski, S.P. Evaluation of distinct freezing methods and cryoprotectants for human amniotic fluid stem cells cryopreservation. *Journal of biomedicine and biotechnology*. – Vol. 2012, Article ID 649353, 10 pages doi:10.1155/2012/649353.

33. Knudtzon S . In vitro growth of granulocytic colonies from circulating cells in human cord blood. *Blood* 1974; 43(3): 357-61.
34. Larouche D., Cantin-Warren L., Desgagné M., Guignard R., Martel I., Ayoub A., Lavoie A., Gauvin R., Auger F.A., Moulin V.J., Germain L. Improved methods to produce tissue-engineered skin substitutes suitable for the permanent closure of full-thickness skin injuries. *Biores Open Access*; Vol. 5, № 1, pp. 320–329, 2016.
35. Laverdet B., Micallef L., Lebreton C., Mollard J., Lataillade J.J., Coulomb B., Desmoulière A. Use of mesenchymal stem cells for cutaneous repair and skin substitute elaboration. // *Pathologie Biologie*.; Vol. 62, № 2, pp. 108–117. 2014.
36. Liu R ., S u D., Zhou M. et al. Umbilical cord mesenchymal stem cells inhibit the differentiation of circulating T follicular helper cells in patients with primary Sjögren’s syndrome through the secretion of indoleamine 2,3-dioxygenase. *Rheumatology (Oxford)* 2015; 54(2): 332-42.
37. Marshall C.D., Hu M. S., Leavitt T., Barnes L. A., Lorenz H. P., and Longaker M. T. Cutaneous scarring: basic science, current treatments, and future directions, *Advances in Wound Care*, Vol. 7, № 2, pp. 29–45, 2018.
38. Martin P. and Nunan R. Cellular and molecular mechanisms of repair in acute and chronic wound healing. *British Journal of Dermatology*, Vol. 173, № 2, pp. 370–378, 2015.
39. Mayshar Y., Ben-David U., Lavon N. et al. Identification and classification of chromosomal aberrations in human induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell*. 2010. Vol. 7, № 4. – P. 521–531.
40. McElreavey K.D., Irvine A.I., Ennis K.T. et al. Isolation, culture and characterisation of fibroblast-like cells derived from the Wharton’s jelly portion of human umbilical cord. *Biochem. Soc. Trans.* 1991; 19(1): 29S.
41. Monavarian M., Kader S., Moeinzadeh S., and Jabbari E. Regenerative Scar-Free Skin Wound Healing. *Tissue engineering: P. B*, Vol. 25, № 4, 2019.
42. Prockop D.J. Concise review: two negative feedback loops place mesenchymal stem/stromal cells at the center of early regulators of inflammation. *Stem Cells* 2013; 31(10): 2042-6.

43. Ridiandries A., Tan J. T. M., and Bursill C. A. The role of chemokines in wound healing, *International Journal of Molecular Sciences*, Vol. 19, №10, article 3217, 2018.
44. Roger M., Fullard N., Costello L., Bradbury S., Markiewicz E., O'Reilly S., Darling N., Ritchie P., Maatta A., Karakesisoglou I., Nelson G., von Zglinicki T., Dicolandrea T., Isfort R., Bascom C., Przyborski S. (2019) Bioengineering the microanatomy of human skin. *Journal of anatomy*, 234 (4), pp. 438–455.
45. Sabapathy V., Sundaram B., VM S. et al. Human Wharton's Jelly Mesenchymal Stem Cells plasticity augments scar-free skin wound healing with hair growth. *PLoS One* 2014; 9(4): e93726.
46. Shaw J.M., Jones G.M. Terminology associated with vitrification and other cryopreservation procedures for oocytes and embryos. *Hum Reprod Update*. – 2003. –Vol. 9, № 6. – P. 583–605.
47. Shivakumar, S. B., Bharti, D., Jang, S. J., Hwang, S. C., Park, J. K., Shin, J. K., ... & Rho, G. J. Cryopreservation of human Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells following controlled rate freezing protocol using different cryoprotectants; a comparative study. *International Journal of Stem Cells*, 2015, 8.2: 155.
48. Visvader, Jane E.; Clevers, Hans Tissue-specific designs of stem cell hierarchies. *Nature Cell Biology*. – 2016. – Vol. 18. № 4. – P. 349-55 ISSN 1465-7392. doi:10.1038/ncb3332.
49. Wang H .S., Hung S .C., Peng S .T. et al. Mesenchymal stem cells in the Wharton's jelly of the human umbilical cord. *Stem Cells* 2004; 22(7): 1330-7.
50. Weiss M.L., Anderson C., Medicetty S . et al. Immune properties of human umbilical cord Wharton's jelly-derived cells. *Stem Cells* 2008; 26(11): 2865-74.
51. Yeo J. C., Ng H. H. The transcriptional regulation of pluripotency. *Cell research*. – 2013. – Vol. 23. № 1. – P. 20–32.
52. Zomer H.D., Vidane A.S., Gonçalves N.N., Ambrósio C.E. Mesenchymal and induced pluripotent stem cells: general insights and clinical perspectives. *Stem Cells Cloning*. – 2015. – Vol. 8. – P. 125–134.