

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
ХАРКІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
імені В. Н. КАРАЗІНА

Біологічний факультет
Кафедра молекулярної біології і біотехнології

**РОЗРОБКА ТРИВИМІРНОЇ МОДЕЛІ КУЛЬТУРИ ЕНДОТЕЛІАЛЬНИХ
КЛІТИН КРОВОНОСНИХ СУДИН ЛЮДИНИ.
АНАЛІЗ АНГІОГЕНЕТИЧНОГО ПОТЕНЦІАЛУ МОДЕЛІ**

Допущена до захисту

«__» _____ 2023 р.

Завідувач кафедри _____
Доктор біологічних наук, професор
Божков Анатолій Іванович

Кваліфікаційна робота

студентки кафедри
молекулярної біології і
біотехнології
Комбурлей Юлії
Олександрівни

Науковий керівник:
Доктор біологічних наук,
професор
Клімова Олена
Михайлівна

Оцінка «_____»

«__» _____ 2023 р.

Харків 2023

ЗМІСТ

ВСТУП.....	3
Мета роботи.....	4
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....	5
1.1 Структурні особливості та фізіологічна роль ендотеліального шару кровоносних судин людини.....	5
1.2 Відкриття ролі оксиду азоту як сигнальної молекули в регуляції серцево-судинної системи ..	8
1.3 Дисфункція ендотеліального шару кровоносних судин та розвиток захворювань, пов'язаних з цією патологією ..	10
1.4 Дослідження патологій ендотелію у пацієнтів з постковідним синдрому.....	13
1.5 Методи дослідження фізіології і патологій ендотелію кровоносних судин ..	14
1.6 Переваги і труднощі використання тривимірних моделей культур ендотеліальних клітин у дослідженнях фізіології і патології ангіогенезу ..	15
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ.....	18
2.1 Організація і устаткування лабораторії.....	18
2.2 Пасування і підтримання культури клітин.....	19
2.3 Підготовка планшетів для підвішування крапель ..	21
2.4 Створення тривимірних моделей культур ендотеліальних клітин кровоносних судин людини ..	22
2.5 Приготування твердого середовища для підтримання тривимірних структур моделей ..	23
2.6 Візуалізація отриманих тривимірних культур ..	24
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ..	25
3.1 24 години інкубування клітинних культур у 384-лункових планшетах для підвішування крапель є оптимальним часом для формування 3Д моделі ендотеліальних клітин кровоносних судин людини (HUVES) сфероїдної форми.....	25
3.2 Тверде середовище з колагенового гелю сприяє підтриманню структури і форми сфероїдних культур ендотеліальних клітин кровоносних судин людини HUVES ..	26
3.3 Сфероїдні культури утворювали відростки у колагеновому гелі, що є показником їх здатності до ангіогенезу.....	27
ВИСНОВКИ ..	28
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	30
ДОДАТКИ ..	35

ВСТУП

Дисфункція ендотеліальних клітин вважається важливим фактором ризику для розвитку та прогресу різних серцево-судинних захворювань, включаючи атеросклероз, гіпертонію, коронарну хворобу серця та периферичну артеріальну хворобу. У 2020 році понад 19,1 мільйона смертей у світі було пов'язано з серцево-судинними захворюваннями. [19] У нещодавніх дослідженнях було виявлено асоціацію розвитку патологій ендотелію з постковідним синдромом; у пацієнтів із хронічними серцево-судинними патологіями при інфікуванні SARS-Cov-2 на фоні імунозалежного запального процесу в ендотелії спостерігались порушення тромбоцитарної та плазмової ланок гемостазу. [2] Розуміння дисфункції ендотеліальних клітин має вирішальне значення для розробки стратегій запобігання та лікування серцево-судинних захворювань.

Вивчення фізіології та патологій ендотелію включає в себе широкий спектр підходів, включаючи як методи *in vitro*, так і *in vivo*. У якості *in vitro* моделей використовують двовимірні та тривимірні культури ендотеліальних клітин кровеносних судин людини для вивчення функцій та властивостей ендотелію. Тривимірні моделі культури ендотеліальних клітин набувають все більшої популярності у дослідженнях, оскільки вони більш репрезентативно відтворюють біологічні процеси, що відбуваються у кровеносній системі. Вони дозволяють більш точно моделювати фізіологічні умови та експериментувати з різними параметрами, що у свою чергу підвищує точність результатів для подальшого клінічного і дослідницького використання.

Тривимірні моделі ендотеліальних клітин використовуються для дослідження патологічних станів, пов'язаних з кровеносною системою, зокрема у дослідженнях атеросклерозу, онкологічних захворювань, захворювань серцево-судинної системи, діабету тощо. 3Д моделі

ендотеліальних клітин можуть слугувати експериментальною платформою для тестування лікарських препаратів та визначення їх ефективності та безпеки.

Мета роботи: розробити тривимірну модель культури ендотеліальних клітин кровоносних судин, оптимальну для подальшого використання у дослідженні процесів ангиогенезу.

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1 Структурні особливості та фізіологічна роль ендотеліального шару кровоносних судин людини

З 1960-х років були проведенні фундаментальні дослідження, які змінили уявлення про функції ендотеліального шару кровоносних судин як про систему клітин, що створює бар'єр між внутрішньосудинним простором і оточенням. Було встановлено, що ендотелій - це внутрішній шар кровоносних судин, який забезпечує підтримання гомеостазу, транспорт речовин між внутрішньо- і зовнішньосудинним просторами, регуляцію запальних процесів. Окрім того, важливою функцією ендотеліального шару є спрямування ангиогенезу – процесу утворення нових кровоносних судин у тканинах та органах. Сприймаючи сигнали із крові та/або міжтканинного простору, саме ендотелій спрямовує процес проростання судинної системи у залежності від фізіологічних процесів. [27]

В одному організмі структура і проникна здатність ендотеліального шару кровоносних судин варіюється в залежності від першочергової функції тканини та органу.

Суцільний (безперервний) ендотелій представлений щільним шаром ЕТК. Така структура легко пропускає воду і малі розчинені речовини між клітинами, однак більш великі і важкі молекули можуть бути транспортовані шляхом трансцитозу. Суцільний ендотелій зустрічається у мікросудинах центральної нервової системи (ЦНС) та забезпечує гематоенцефалічний бар'єр – високоселективна проникність мікросудин ЦНС, що забезпечує підвищений контроль гомеостазу мозку. [3, 9] Також суцільний ендотелій зустрічається у лімфатичних вузлах та забезпечує *хомінг лімфоцитів*; це процес міграції і

приєднання лімфоцитів до певних спеціалізованих ділянок лімфатичних органів. Цей процес відіграє важливу роль у регуляції імунних відповідей в організмі. [3, 7]

Фенестровий ендотелій представлений шаром клітин з мікроскопічними отворами у міжклітинному просторі. У порівнянні з суцільним, такий тип характеризується більшою проникною здатністю; забезпечує більш легкий транспорт речовин крізь мікропори, зберігаючи певну селективність завдяки мікророзмірам пор. Такий тип притаманний судинам ендокринних залоз, органів шлунково-кишкового тракту, нефронів. Основною функцією є підтримування ефективної секреції, абсорбції і фільтрації органа, зберігаючи селективність речовин. [3, 27]

Розривний епітелій утворений шаром ЕТК з порами у міжклітинному просторі. Такий тип має найбільшу проникну здатність; забезпечує транспорт клітин. Розривний епітелій притаманний селезінці (забезпечуючи транспорт кров'яних тілець) та кістковому мозку (забезпечуючи транспорт диференційованих клітин крові). [3, 27]

Існують 2 типи сигналів, які здатен сприймати ендотеліальний шар.

Механічні сигнали – зміна фізичних характеристик руху крові, в залежності від яких ендотелій регулює стискання або розширення судин, імунні реакції (утворення тромбів, рух нейтрофілів тощо). Процес сприйняття ендотелієм змін фізичних характеристик руху крові і реагування на них називають *механотрансдукцією*.

Хімічні сигнали – зміна у якісному та кількісному складі розчинних речовин. Ендотелій здатен реагувати на велику різноманітність розчинених у крові речовин. Наприклад, при збільшенні концентрації про- або

антиангіогенних факторів – стимуляторів та інгібіторів росту ендотеліального шару відповідно – спостерігаються зміни у внутрішньоклітинних біохімічних процесах, які призводять до пришвидшення або зупинення проліферації клітин. Сприйняття і реагування на хімічні подразники називають *хемотрансдукцією*.

Основними функціями ендотелію кровоносних судин вважаються:

Регуляція тону судин: Ендотелій виробляє різні вазоактивні речовини, які впливають на тонус судин. Наприклад, ендотеліальні клітини виробляють оксид азоту (NO), який розширює судини і підтримує нормальний кровообіг.

Запобігання згортанню крові: Ендотеліальний шар виробляє ряд факторів, які запобігають згортанню крові. Наприклад, він виробляє фактори, що підтримують рідинний стан крові, такі як простациклін, який перешкоджає згортанню крові та утворенню згортків.

Регуляція проникнення речовин: Ендотелій контролює проникнення різних речовин через стінки кровоносних судин. Він регулює процеси транспорту речовин, включаючи пасивну дифузю, активний транспорт та ендоцитоз.

Вироблення вазоактивних речовин: Ендотеліальні клітини виробляють різноманітні вазоактивні речовини, які впливають на судинний тонус і регуляцію кровотоку. Найважливішою з цих речовин є оксид азоту (NO). За відкриття функції цієї речовини була присуджена Нобелівська премія по фізіології та медицині. [27]

1.2 Відкриття ролі оксиду азоту як сигнальної молекули в регуляції серцево-судинної системи

Відкриття функцій оксиду азоту в ендотеліальному шарі кровоносних судин стало проривом у вивченні фізіології ендотеліуму. У 1998 році трое вчених - Роберт Фурхготт, Луїс Ігнарро і Ферід Мурад – були нагороджені Нобелівською премією за дослідження синтезу і функції оксиду азоту (NO) у регулюванні кровообігу та серцево-судинної системи.

Роберт Фурхготт відкрив роль ендотелію (внутрішнього покриття судин) у регуляції судинного тону. Він виявив, що ендотелій продукує речовину, яка розширює судини, і назвав її ендотеліальним фактором, що розслабляє. [31]

Луїс Ігнарро та Ферід Мурад досліджували механізм дії NO на клітини. Вони встановили, що NO активує гуанілатциклазу, фермент, який стимулює синтез циклічного гуанозинмонофосфату (цГМФ). Циклічний ГМФ, у свою чергу, розслабляє м'язові клітини судин, сприяючи розширенню судин і покращенню кровообігу. [31]

Вчені виявили, що оксид азоту, вироблений ендотеліальним шаром, має потужну вазодилататорну дію, тобто здатність розширювати кровоносні судини. Таким чином, оксид азоту впливає на регуляцію артеріального тону і кровотоку. [31]

Крім того, оксид азоту має ряд інших функцій, таких як зниження агрегації властивість тромбоцитів і лейкоцитів, запобігання проліферації гладких м'язів, зниження виділення прозапальних цитокінів, протидія окисненню ліпопротеїдів низької щільності й холестерину.

Синтез NO відбувається за допомогою NO-синтази та ряду коферментів, до яких входить флавінаденіндинуклеотид, флавінмононуклеотид, гем і тетрагідробіоптерин. Субстратами є L-аргінін, кисень і нікотинаміаденіндинуклеотидфосфат (NADPH), а кінцевими продуктами є L-цитрулін і NO. [1]

NO-синтаза існує у трьох формах, а саме: ендотеліальна, індучибельна та нейрональна. Синтез ендотеліальної NO-синтази відбувається безперервно, незалежно від будь-яких факторів, а її активація здійснюється під впливом кальцій-кальмодулінового комплексу та підвищеної концентрації іонів кальцію в цитоплазмі ендотеліальних клітин.

NO-синтаза існує в трьох формах, а саме: ендотеліальній, індучибельній та нейрональній. Синтез ендотеліальної синтази оксиду азоту Активність NO-синтази може бути посилена пептидами, включаючи рецептори в ендотеліальних клітинах, які зв'язують фосфоліпазу C, і ендотеліальні фактори росту, такі як фактор росту фібробластів і фактор росту ендотелію судин. Концентрація ендотеліальної NO-синтази знижується при запаленні, гіпоксії, ендотеліальній дисфункції, що призводить до зниження рівня NO. [1]

Ці відкриття полягли в основу розробки нових базових підходів до лікування серцево-судинних захворювань, які накладаються на модуляцію рівня оксиду азоту в організмі. Наприклад, нітрати та нітрити, які перетворюються на оксид азоту, можуть бути використані для зниження артеріального тиску та покращення кровообігу. Також розроблені ліки, які стимулюють продукцію оксиду азоту в ендотелії, для покращення функції судин. [18, 28]

1.3 Дисфункція ендотеліального шару кровоносних судин та розвиток захворювань, пов'язаних з цією патологією

Термін «ендотеліальна дисфункція» спочатку використовувався для визначення переходу від нормального нерухомого ендотелію до порушеного ендотелію з нездатністю генерувати оксид азоту та інші вазодилататори. [20]

Ендотеліальна дисфункція включає порушення функції ендотелію – знижений ангіогенез, прозапальний, провазоконстрикційний, проліферативний і прокоагулянтний фенотип. Ендотеліальна дисфункція виявляється у зміні дії ендотелію в бік зменшення вазодилатації, прозапального стану та протромбічних властивостей. [20, 27]

Це пов'язано з більшістю форм серцево-судинних захворювань, таких як гіпертонія, ішемічна хвороба серця, хронічна серцева недостатність, захворювання периферичних судин, діабет, хронічна ниркова недостатність та важкі вірусні інфекції. Вільні радикали можуть порушити баланс NO, пошкодити ендотелій і зробити його надмірно проникним, дозволяючи токсинам переходити в тканини тіла.

У більшості випадків людський організм має достатній запас антиоксидантів, отриманих з різних харчових продуктів, щоб нейтралізувати ці вільні радикали; але якщо організм виснажується цими антиоксидантами або якщо існує занадто багато супутніх факторів, може статися пошкодження ендотелію та зміна балансу NO. [12]

Ендотеліальна дисфункція порушує механізм регуляції судинного гомеостазу, схиляючи судинну стінку до вазоконстрикції, адгезії лейкоцитів, активації тромбоцитів, окисного стресу, тромбозу, коагуляції та запалення, що призводить до патогенезу серцево-судинної системи.

Порушення ендотеліальної функції належить до системного стану, при якому ендотеліальні клітини втрачають свої фізіологічні властивості.

Ендотеліальна дисфункція може бути спричинена багатьма чинниками:

- метаболічний синдром;
- цукровий діабет;
- шкідливі звички;
- артеріальна гіпертензія;
- відсутність фізичної активності;
- хронічна ниркова недостатність;
- захворювання периферичних судин;
- тяжкі вірусні інфекції. [20, 27]

Важливим фактором ендотеліальної дисфункції є ожиріння. Гормон лептин, який циркулює у надмірній кількості в осіб з ожирінням, спричиняє розвиток ендотеліальної дисфункції. Він призводить до зниженого синтезу NO й збільшеної кількості моноцитарного хемотаксичного протеїну-1, що, своєю чергою, впливає не лише на вазоконстрикцію, а й на посилену інфільтрацію лейкоцитів на судинній стінці. [1]

Також відомо, що у пацієнтів із серцево-судинними захворюваннями та гіпертригліцеридемією, гіперхолестеринемією цукровим діабетом 2-го типу, нирковою недостатністю і кардіальним синдромом наявна висока концентрація циркулюючого асиметричного диметиларгініну, який є аналогом L-аргініну й призводить до зниження активності NO-синтази і, як наслідок, до зниження рівня NO .

Коли ж ендотелій функціонує нормально, він допомагає регулювати згортання крові, сприяє імунній відповіді організму, контролює об'єм рідини

та кількість електролітів та інших речовин, які переходять із крові в тканини, і викликає розширення або звуження кровоносних судин. Проте, коли присутня ендотеліальна дисфункція, здатність виконувати одну або декілька з цих функцій знижується. [20]

Ендотеліальна дисфункція підвищує ризик серцево-судинних захворювань та інших станів, серед яких:

- атеросклероз та ішемічна хвороба серця;
- згустки крові та інсульти;
- збільшене серце (гіпертрофічна кардіоміопатія);
- серцеві напади та серцева недостатність;
- високий кров'яний тиск (гіпертонія);
- ниркова недостатність;
- захворювання периферичних артерій;
- легенева гіпертензія та інші.

Ендотеліальна дисфункція також може призвести до гострого коронарного синдрому. Ця комбінація трьох різних типів ішемічної хвороби серця підвищує ризик розриву бляшки всередині кровоносної судини. Розрив бляшки може заблокувати приплив крові до серцевого м'яза, провокуючи серцевий напад. [20]

1.4 Дослідження патологій ендотелію у пацієнтів з постковідним синдромом

Постковідний синдром – сукупність післявірусних симптомів та ускладнень, які можуть виникати після перенесеного захворювання на COVID-19. Цей синдром характеризується тривалим продовженням фізичних, психологічних та неврологічних симптомів після рецидиву або видужання від COVID-19.

Клімова О.М. та ін. досліджували патології кровоносної системи у пацієнтів з постковідним синдромом (ДУ «Інститут загальної та невідкладної хірургії ім. В. Т. Зайцева НАМН України», м. Харків, Україна). Було виявлено тривалу активацію системи комплементу та підвищення концентрації С-реактивного білка у хворих на Covid-19 з асоційованою серцевою та судинною патологією як у гострому, так і постковідному періодах. Більш того, спостерігалися порушення тромбоцитарної та плазмової ланок гемостазу, зокрема згортальної, протизгортальної та фібринолітичної систем. Це пов'язано з імунозапальними реакціями, змінами протеїнів системи комплементу та факторів згортання, цитокінів та утворенням цитотоксичних молекул, що можуть сприяти розвитку тромбоцитопенії та ендотеліїту. [2]

Для лікування пацієнтів з судинною та серцевою патологією у гострому та постковідному періодах рекомендується розробка персоналізованих методів лікування ендотеліту, спрямовані на запобігання імунозапальним реакціям та профілактику порушень ланок гомеостазу. [2]

Використання 3D культури ендотеліальних клітин є одним із перспективних напрямків для персоналізованої медицини. Збирання клітин з пацієнта і вирощування їх у 3D культурі дозволяє досліджувати індивідуальні відповіді пацієнтів на різні лікарські засоби, досліджувати механізми хвороби

та розробляти персоналізовані підходи до лікування. Використання тривимірних клітинних структур дозволяє вивчати ефективність лікарських засобів на основі відповіді клітин конкретного пацієнта. [24]

1.5 Методи дослідження фізіології і патологій ендотелію кровоносних судин

Підходи до досліджень дисфункцій ендотелію кровоносних судин людини поділяються на методи *in vivo* та *in vitro*. До технологій *in vivo* відносять методи вивчення вазодилатації – процесу розширення кровоносних судин, що відбувається внаслідок збільшення просвіту артерій та вен. Одним з таких підходів є вимірювання коефіцієнту реактивної гіперемії (КРГ) за допомогою ультразвукового сканування артерій. Гіперемія – процес аномального збільшення об'єму крові у певних судинах організму. КРГ вимірює розширення артерії під впливом реактивної гіперемії.

Іншим методом *in vivo* вважається аналіз внутрішньоартеріальної або внутрішньовенозної інфузії вазодилататорів, таких як ацетилхолін, метахолін або брадікінін. Метод заснований на аналізі реактивної здатності ендотелію на стимулятори. Найпоширенішими є стимулятори синтезу оксиду азоту: після введення стимуляторів вимірюється вироблення оксиду азоту і реакція на них ендотеліального шару. [8]

До *in vitro* методів відносять дослідження культур ендотеліальних клітин, отриманих із кровоносних судин людини. Цей метод полягає у вирощуванні ендотеліальних клітин в лабораторних умовах. Найбільш широко розповсюдженою технікою вважається культивування у моношарі (2D). Більш новою технікою вважається культивування у тривимірних матицях. Такі

матриці дозволяють зберігати природну не розплющену форму клітин, запобігають формуванню адгезії клітин до поверхні посуду. [4, 5] Також тривимірна структура сприяє організації клітин ендотелію в трубчасті структури, схожі на судини. Це дозволяє вивчати процеси ангіогенезу та механізми, що регулюють формування нових судин. [4, 5] Також, широкого попиту набуває створення тривимірних структур клітин – 3D культивування. Про переваги і недоліки *in vitro* методів описано в наступному пункті.

1.6 Переваги і труднощі використання тривимірних моделей культур ендотеліальних клітин у дослідженнях фізіології і патології ангіогенезу

Використання ендотеліальних клітин у дослідженнях має важливе значення для розуміння функцій ендотелію і його впливу на судинну тонус і регуляцію кровотоку. Двовимірні (моношар, 2D) і тривимірні (сфероїд, 3D) культури ендотеліальних клітин є основними моделями для вивчення ендотелію *in vitro*.

3D моделі клітинних культур *in vitro* стають все більш популярними структурами для вивчення фізіології та патології тканин. Хоч двовимірні моделі мають вагомні переваги використання, вони не достатньо якісно відтворюють фізіологічні процеси, що відбуваються в тканинах *in vivo*. [23]

У 2D культивуванні клітини адгезуються та ростуть на плоскій поверхні. Така модель дозволяє рівномірно розподіляти середовище для культивування із факторами росту. Також, варто зазначити, що у двовимірній культурі може відбуватись сепарація і видалення мертвих клітин: некротичні клітини зазвичай відокремлюються від поверхні та легко видаляються під час заміни середовища. Більш того, висока швидкість створення і легкість підтримання

двовимірних культур збільшують зацікавленість дослідників у використанні моношару. Однак очевидні недоліки такої моделі роблять необхідним розробляти нові методи створення тривимірних моделей. Клітини у моношарі мають плоску та розтягнуту форму, яка відрізняється від їхньої природної форми *in vivo*. Аномальна морфологія клітин у 2D культурі впливає на багато клітинних процесів, включаючи проліферацію, диференціацію, апоптоз та експресію генів та білків. Тому клітини, культивовані у моношарі, не є найефективнішою та репрезентативною моделлю. [14, 24]

У тривимірних культурах морфологія клітин більш точно відповідає їх природній формі в організмі. Крім того, 3D структури складаються з клітин різних стадій (проліферуючі, апоптотичні, гіпоксичні та некротичні клітини). Зовнішні шари такої моделі переважно складаються з життєздатних, проліферуючих клітин. Клітини у центрі отримують менше кисню, факторів росту та поживних речовин з середовища і, як правило, перебувають у гіпоксичному стані. Така клітинна гетерогенність дуже схожа на тканини, особливо на пухлини, в організмі. Оскільки морфологія і взаємодії клітин, вирощених в тривимірному культивуванні, більш схожі на те, що відбувається в організмі, клітинні процеси цих клітин також близькі до тих, що спостерігаються в організмі. [23, 27]

Загалом 3D-моделі культур клітин демонструють вищу точність відтворення умов *in vivo* в порівнянні з 2D-моделлю. Тривимірні структури мають широке застосування у онкологічних дослідженнях. Створюючи мікропухлини *in vitro*, проводяться тестування різних підходів терапії раку, зокрема тестування нових хемотерапевтичних препаратів, радіотерапії, гіпертермії тощо. [22, 23]

Варто зазначити, що для ефективного використання тривимірних культур необхідно удосконалювати методи для вирішення наступних задач:

Формування та підтримка тривимірних структур – сфероїдів - рівномірного розміру. Досягнення рівномірного розміру і форми сфероїдів має важливе значення для забезпечення відтворюваності та точності експериментів.

Формування сфероїдів з невеликою кількістю клітин: Створення сфероїдів з обмеженою кількістю клітин є необхідним на сьогодні для забезпечення здорового метаболізму, але обмежена кількість клітин зменшує подібність моделі до тканин *in vivo*.

Формування сфероїдів, що відтворюють біологічну складність тканини з декількома типами клітин. Це може вимагати оптимізації методів створення тривимірних культур та введення різних клітин у сфероїди. [20, 21, 22, 27]

РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

2.1 Організація і устаткування лабораторії

Практична частина проекту була виконана у біотехнологічній лабораторії другого рівня біологічної безпеки (факультет біомедичної інженерії, Університет Делхаузі, Галіфакс, Нова Шотландія, Канада). Робота була виконана за договору між некомерційною організацією Mitacs, Канада і Міністерством Освіти і Науки України у рамках проекту «Mitacs Globalink Research Award - Ministry of Education and Science of Ukraine». Документ, що підтверджує мою участь у даному проекті прикріплено у Додатку 2.1.

Лабораторія розділена на 5 приміщень:

1. Головне приміщення.

Зберігаються витратні матеріали (піпетки, флакони та планшети для культивування, серветки та паперові рушники тощо); морозильні камери (-20°C і -80°C) для зберігання необхідних реактивів (дод. 2; рис. 2.1а); сухі порошкоподібні реактиви; мікроваги та мірні колби; стерилізатор, устаткований ультрафіолетовою лампою (дод. 2; рис. 2.1б). Усі перераховані матеріали і обладнання були використані у даному дослідженні.

2. Кімната для культивування клітин.

Обладнана боксом біологічної безпеки II класу (дод. 2, рис. 2.2а), центрифугою (дод. 2, рис. 2.2б), інкубатором для підтримання культур клітин (37°C, 5% CO₂) (дод. 2, рис. 2.2в), холодильниками для зберігання середовищ і реактивів, необхідними шафами для зберігання витратних матеріалів і

столами. У боксі біологічної безпеки зберігаються стерильні піпетки і дозатори, розраховані на різний об'єм (дод. 2, рис. 2.2г); кабінет устаткований аспіратором, який регулярно стерилізується. Для спостереження за проліферацією культур клітин і проведення підрахунку клітин, кімната устаткована світловим мікроскопом (дод. 2, рис. 2.2г).

3. Кімната мікроскопії та візуалізації

Устаткована системою EVOS Auto 2 (дод.2, рис 2.3). Це автоматизована система для отримання високоякісних мікроскопічних зображень, яка обладнана цифровими камерами та мікроскопічними об'єктивами високої роздільної здатності. Система має автоматичне управління фокусуванням та зміною об'єктивів, що спрощує процес візуалізації і забезпечує точність і повторюваність результатів.

4. Кімната для кріоконсервування культур клітин. Устаткована резервуаром із рідким азотом (дод.2, рис 2.4).

5. Кімната для автоклавування. Устаткована двома автоклавами, один з яких використовується для стерилізації відходів, інший – для стерилізації обладнання.

2.2 Пасування і підтримання культури клітин

Для формування 3D моделі ендотеліальних клітин кровоносних судин культуру ендотеліальних клітин пупкової вені людини (HUVEC) було отримано від Американської колекції типових культур у замороженому стані ($1 \cdot 10^6$ клітин). Після отримання, культура клітин була розморожена і промита

з використанням фізіологічного розчину. Далі, клітинну культуру осаджували центрифугуванням, ресуспендували у нагрітому середовищі для культивування і поміщали у флакон для культивування. Середовище для культивування ендотеліальних клітин кровоносних судин людини HUVEC було придбано у компанії Sigma-Aldrich; складається із середовища Ігла в модифікації Дульбекко, 1% розчину Антибіотик-Антимікотик і міксу факторів росту ендотеліальних клітин (дод. 4, табл. 4.1). Протягом дослідження були використані одноразові чашки Петрі з площею поверхні 10 см² або флакони для культивування адгезивних культур з площею поверхні 75см².

Субкультивування проводилось коли кофлюентність – ступінь покриття поверхні посуду культурою клітин – набувало значення 90%. Для від'єднання культури від поверхні посуду, використовувався 0.25% розчину трипсину (1мл для чашки Петрі; 2мл для флакону 75см²). Після 2-3 хвилин інкубування культури клітин у розчині трипсину при 37°C, фермент було нейтралізовано середовищем з 10% сироватки бика. Суспензію клітин було осаджено методом центрифугування, супернатант було видалено аспіратором.

Для підрахунку клітин, осаджену культуру ресуспендували у 1мл середовищі для культивування, яке було попередньо нагріто у водяній бані. Кількість клітин було підраховано у камері Горяєва ($N \cdot 10^4$, де N – кількість клітин на 10 μ l суспензії); (дод. 3; рис 3.1).

2.3 Підготовка планшетів для підвішування крапель

Метод був розроблений і оптимізований у лабораторії доктора Брендана Люнга (Університет Делхаузі, Галіфакс, Нова Шотландія, Канада). Ніколас Дейв у своїй дисертації детально описав етапи тестування техніки. [11]

Для отримання сфероїдних культур ендотеліальних клітин людини були використані 384-лункові планшети для підвішування крапель, кожна лунка об'ємом 25 мкл (дод. 5, рис. 5.1). Лунки сконструйовані у формі сфер; будова планшету дозволяє підтримувати силу поверхневого натягу у лунках більшою за силу тяжіння, що дозволяє утримувати клітини у підвішаному стані. Перед використанням, планшети оброблялися у розчині Pluronic® F-108 у концентрації 0,1% (Sigma-Aldrich) у дистильованій воді протягом 24 годин. Pluronic F108 - це полімерна речовина, яка утворює тонкий шар на поверхні планшетів, таким чином запобігає прилипанню клітин до поверхні. Це дозволяє клітинам залишатись у висіяних краплях та формувати сфероїди без утворення адгезії до планшетів. Після обробки, планшети були промиті дистильованою водою та стерилізовані у ультрафіолетовій лампі протягом 30 хвилин.

Стерильні 384-лункові планшети були поміщені у 24-лункову посуду для культивування, в кожному лунку якої додавали по 500 мкл розчину 1% Антибіотик-Антимікотик (АА) у дистильованій воді. Така конструкція створювала стерильну вологу камеру, оптимальну для підтримання клітинної культури.

2.4 Створення тривимірних моделей культур ендотеліальних клітин кровоносних судин людини

Клітини HUVEC були культивовані у стандартних умовах інкубування (37°C, 5% CO₂). Від'єднані від посуду для культивування та ресуспендовані за методом, який описано у пункті 2.1. Для формування сфероїдних клітин, було використано стандартне середовище для культивування ендотеліальних клітин із додаванням 2,4 мг/мл метилцелюлози (Sigma-Aldrich, кат. номер 94378). Сфероїдна культура була сформована із 100 клітин, відповідно до чого була розрахована загальна кількість клітин, яку необхідно перенести у готове середовище.

Для висівання крапель суспензії клітин використовувалась автоматизована мультиканальна (8 каналів) піпетка від виробника Thermo Fisher (дод. 6, рис. 6.1). Краплі суспензії клітин були висіяні у зигзаговій послідовності (дод. 7, рис. 7.1) для запобігання з'єднання близько розташованих культур. Відповідно, в один 384-лунковий планшет було поміщено 192 краплі по 25мкл кожна. Після висівання, культури підтримувалися в стандартних умовах культивування (37°C, 5% CO₂). Після 24 годин інкубування, сформовані моделі були зібрані мікропіпеткою і переміщені у тверде середовище для підтримання стивимірних структур та подальшого аналізу здатності до ангиогенезу. [11, 21]

2.5 Приготування твердого середовища для підтримання тривимірних структур моделей

Застигання колагенового гелю відбувається при кімнатній температурі. Тому важливо було зберігати усі компоненти охолодженими і проводити змішування на льоду.

У пробірці об'ємом 50 мл було змішано 3 мл середовища Ігла в модифікації Дульбекко, 3 мл буферного розчину, який складався з натрій гідрокарбонату, цвітер-іонного буферного компоненту HEPES та натрій гідроксиду, 2.5 мл ембріональної сироватки бика (FBS) і 0.3 мл L-глутаміну. Для зміни рН до лужного, у розчин додавали натрію гідроксид до зміни жовтого кольору на рожевий. 20 мл колагену бика у концентрації 3 мг/мл було додано до розчину в останню чергу. Зберігаючи пробірку з рідким гелем, компоненти були ретельно перемішані серологічною піпеткою.

Зібрані мікропіпеткою моделі були перенесені у пробірку і осаджені методом центрифугування. Супернатант видаляли аспіратором, сфероїди ресуспендували у 0.5 мл середовища для культивування ендотеліальних клітин.

Суспензія із тривимірними культурами була перенесена у рідкий колагеновий гель і ретельно перемішана. Після перемішування, рідкий гель помістили у 24-лунковий планшет; для утворення тонкого шару, у кожному лунку було внесено 1мл суспензії. Планшет з гелем помістили у інкубатор (37°C, 5% CO₂) на 1 годину для застигання колагену. На поверхню твердого гелю було додано 0.5 мл середовища для культивування ендотеліальних клітин. Тривимірні культури інкубували у колагеновому гелі протягом 24 годин. [26]

2.6 Візуалізація отриманих тривимірних культур

Зображення тривимірних культур були отримані з використанням системи EVOS Auto 2. Для отримання зображень моделей у колаген-гелі, необхідно було помістити тонкий шар гелю у посуду. Аналіз утворення відростків проводився з використанням мікроскопу у видимому світлі.

РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ

3.1 24 години інкубування клітинних культур у 384-лункових планшетах для підвішування крапель є оптимальним часом для формування 3Д моделі ендотеліальних клітин кровоносних судин людини (HUVES) сфероїдної форми

Формування 3Д моделі культури клітин відбувається протягом 24-48 годин інкубування у 384-лункових планшетах для підвішування крапель в залежності від типу клітинної культури. Через 24 години інкубування крапель суспензії клітин HUVES у 384-лункових планшетах для підвішування крапель, були зроблені мікроскопічні зображення культур у системі EVOS Auto 2 (дод. 8, рис 8.1).

Тривимірні культури ендотеліальних клітин кровоносних судин людини (HUVES) були повністю сформовані за 24 години інкубування у стандартних умовах для підтримання культур (37°C, 5% CO₂). (дод. 3.1) Базуючись на попередніх дослідженнях, проведених у даній лабораторії, було обрано концентрацію 150 клітин на 25 μ л суспензії для формування сфероїдних культур. Маса такого об'єму краплі з даною концентрацією клітин є оптимальною для підтримання сили поверхневого натягу, за рахунок якої краплі суспензії утримувались у підвішеному стані. Окрім цього, обрана концентрація клітин формувала сфероїдні культури діаметром \sim 100 μ м, що запобігало адгезії клітин до поверхні лунок планшета. (дод. 3.1)

Висівання крапель у зигзагоподібному порядку (дод. 2.3) сприяло запобіганню злипанню сфероїдів у сусідніх лунках. Сфероїдні культури були сформовані у кількості 1 сфероїд на 1 лунку; відповідно з одного планшета було отримано 192 сфероїдні культури ендотеліальних культур.

3.2 Тверде середовище з колагенового гелю сприяє підтриманню структури і форми сфероїдних культур ендотеліальних клітин кровеносних судин людини HUVEC

Для аналізу здатності утворених сфероїдних культур до ангиогенезу, необхідно було приготувати оптимальне середовище, яке підтримуватиме структуру і форму об'ємної моделі культури, запобігатиме переміщенню сфероїдів на дно посуду та їх адгезії до поверхні. Колаген I типу є основною речовиною, яка підтримує форму ендотелію кровеносних судин в організмі та сприяє розростанню системи капілярів. [10, 26]

Тому для підтримування утворених сфероїдних культур та стимуляції ангиогенезу було приготовлено тверде середовище з колагенового гелю. Приготовлене середовище утримувало 3Д моделі у формі сфери та запобігало адгезії культури до поверхні посуду. (дод. 3.2) Окрім цього, твердий гель пропускає середовище для стимуляції ангиогенезу, що описано у пункті 3.2.

1 мл гелю утворює достатньо тонкий шар для проведення мікроскопії і візуалізації сфероїдних культур (дод. 9; рис. 9.1).

3.3 Сфероїдні культури утворювали відростки у колагеновому гелі, що є показником їх здатності до ангиогенезу

Аналіз утворення відростків сфероїдів ендотеліальних клітин може бути використаний як метод вивчення процесу ангиогенезу. [13]

Через 24 години інкубування сфероїдних культур ендотеліальних клітин людини у твердому колагеновому середовищі з додаванням стимуляторів росту ендотелію, було візуалізовано утворення відростків 3Д культур. Тверде середовище з колагенового гелю дозволяє стимуляторам росту ендотелію проходити крізь тонкий шар і ініціювати утворення відростків. (дод. 10; рис. 10.1).

ВИСНОВКИ

1. На базі лабораторії біомедичної інженерії в університеті Делхаузі (Галіфакс, Нова Шотландія, Канада) було розроблено тривимірну модель культури ендотеліальних клітин кровоносних судин людини. Для розробки було отримано лінію ендотеліальних клітин пуповинної вени людини (HUVES) від Американської колекції типових культур. Тривимірні структури було створено методом підвішування крапель у 384-лунковому планшеті. За 24 години інкубування суспензії клітин HUVES у 384-лунковому планшеті спостерігалось формування тривимірних структур культури у формі сфер діаметром $\sim 100\mu\text{m}$. Маса крапель об'ємом $25\mu\text{l}$ із обраною концентрація клітин (150 клітин на $25\mu\text{l}$ середовища) є оптимальною для підтримання сили поверхневого натягу у лунках, за рахунок якої краплі утримуються у підвішеному стані. Попередня обробка планшетів 0.1% розчином Pluronic F108 сприяє запобіганню адгезії клітин до поверхні лунок. Отже, метод вважається оптимальним для створення тривимірної культури ендотеліальних клітин кровоносних судин людини.

2. У якості твердого середовища для підтримання структури сформованих моделей, було обрано твердий колагеновий гель. Колаген є основним компонентом міжклітинного матриксу, який підтримує форму новосформованого ендотелію *in vivo*.

3. Тверде середовище з колагенового гелю підтримує тривимірну структуру культури ендотеліальних клітин. Було досліджено, що колаген утримує сформовані тривимірні структури клітин HUVES, запобігає утворення адгезії до поверхні посуду для культивування. Окрім цього, тверде колагенове середовище ефективно пропускає стимулятори росту кровоносних судин, тим самим підтримує утворення відростків сфероїдних моделей.

4. Сформовані тривимірні структури проявляють активну здатність до ангиогенезу. Через 24 години інкубування сфероїдних культур у твердому колагеновому середовищі, було зафіксовано утворення відростків культури. Таку характеристику використовують як показник ініціації росту системи судин, що у свою чергу є показником здатності до ангиогенезу. Отже, створена тривимірна модель проявляє здатність до ангиогенезу і може бути використана у подальших дослідження розвитку і патологій ендотелію кровоносних судин.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Ендотеліальна дисфункція при COVID-19 (огляд літератури). *Ukrainian medical journal*. 2021. Т. 143. URL: <https://doi.org/10.32471/umj.1680-3051.143.208852>.
2. Предиктори тромбогенності та розвитку ендотеліїту у пацієнтів з Covid-19 – асоційованою серцевою та судинною хірургічною патологією у гострому та постковідному періодах / К. О.м та ін. м. Харків, Україна, 2023. (Препринт. ДУ «Ін-т заг. та невідклад. хірургії ім. В. Т. Зайц. НАМН України»).
3. Aird W. C. Phenotypic heterogeneity of the endothelium. *Circulation research*. 2007. Vol. 100, no. 2. P. 174–190. URL: <https://doi.org/10.1161/01.res.0000255690.03436.ae>.
4. Arnaoutova I., Kleinman H. K. In vitro angiogenesis: endothelial cell tube formation on gelled basement membrane extract. *Nature protocols*. 2010. Vol. 5, no. 4. P. 628–635. URL: <https://doi.org/10.1038/nprot.2010.6>.
5. Arnaoutova I., Kleinman H. K. In vitro angiogenesis: endothelial cell tube formation on gelled basement membrane extract. *Nature protocols*. 2010. Vol. 5, no. 4. P. 628–635. URL: <https://doi.org/10.1038/nprot.2010.6>.
6. Bian K., Doursout M.-F., Murad F. Vascular system: role of nitric oxide in cardiovascular diseases. *The journal of clinical hypertension*. 2008. Vol. 10, no. 4. P. 304–310. URL: <https://doi.org/10.1111/j.1751-7176.2008.06632.x>.

7. Butcher E. C., Picker L. J. Lymphocyte homing and homeostasis. *Science*. 1996. Vol. 272, no. 5258. P. 60–67.
URL: <https://doi.org/10.1126/science.272.5258.60>.
8. Chia P. Y., Teo A., Yeo T. W. Overview of the assessment of endothelial function in humans. *Frontiers in medicine*. 2020. Vol. 7.
URL: <https://doi.org/10.3389/fmed.2020.542567>.
9. Daneman R., Prat A. The blood-brain barrier. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 2015. Vol. 7, no. 1. a020412.
10. Davis G. E., Senger D. R. Endothelial extracellular matrix. *Circulation research*. 2005. Vol. 97, no. 11. P. 1093–1107.
URL: <https://doi.org/10.1161/01.res.0000191547.64391.e3>.
11. Dawe N. Development and characterization of t-slice: a cancer modeling platform to model important features of the tumour microenvironment in vitro : Thesis for the degree of Master of Applied Science. Halifax, 2022. 147 p.
12. Endothelial function in patients with atrial fibrillation / A. A. Khan et al. *Annals of Medicine*. 2020. Vol. 52, no. 1-2. P. 1–11.
URL: <https://doi.org/10.1080/07853890.2019.1711158>.
13. Endothelial progenitor cell sprouting in spheroid cultures is resistant to inhibition by osteoblasts: a model for bone replacement grafts / A. Stahl et al. *FEBS letters*. 2005. Vol. 579, no. 24. P. 5338–5342.
URL: <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2005.09.005>.

14. Establishment and large-scale validation of a three-dimensional tumor model on an array chip for anticancer drug evaluation / R.-R. Xiao et al. *Frontiers in pharmacology*. 2022. Vol. 13. URL: <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.1032975>.
15. Establishment and large-scale validation of a three-dimensional tumor model on an array chip for anticancer drug evaluation / R.-R. Xiao et al. *Frontiers in pharmacology*. 2022. Vol. 13. URL: <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.1032975>.
16. Formation of microvascular networks in vitro / J. P. Morgan et al. *Nature protocols*. 2013. Vol. 8, no. 9. P. 1820–1836. URL: <https://doi.org/10.1038/nprot.2013.110>.
17. Forstermann U., Sessa W. C. Nitric oxide synthases: regulation and function. *European heart journal*. 2011. Vol. 33, no. 7. P. 829–837. URL: <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehr304>.
18. Furchgott R. F. The role of endothelium in the responses of vascular smooth muscle to drugs. *Annual review of pharmacology and toxicology*. 1984. Vol. 24, no. 1. P. 175–197. URL: <https://doi.org/10.1146/annurev.pa.24.040184.001135>.
19. Heart disease and stroke statistics–2022 update: a report from the american heart association / C. W. Tsao et al. *Circulation*. 2022. Vol. 145, no. 8. URL: <https://doi.org/10.1161/cir.0000000000001052>.
20. Jeon B. H. Endothelial dysfunction: from pathophysiology to novel therapeutic approaches. *Biomedicines*. 2021. Vol. 9, no. 11. P. 1571. URL: <https://doi.org/10.3390/biomedicines9111571>.

21. Jeong Y., Tin A., Irudayaraj J. Flipped Well-Plate Hanging-Drop Technique for Growing Three-Dimensional Tumors. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*. 2022. Vol. 10. URL: <https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.898699>.
22. Langhans S. A. Three-Dimensional in vitro cell culture models in drug discovery and drug repositioning. *Frontiers in pharmacology*. 2018. Vol. 9. URL: <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00006>.
23. Mierke C. T. Physical and biological advances in endothelial cell-based engineered co-culture model systems. *Seminars in cell & developmental biology*. 2023. URL: <https://doi.org/10.1016/j.semcd.2023.01.012>.
24. Opportunities and challenges for use of tumor spheroids as models to test drug delivery and efficacy / G. Mehta et al. *Journal of controlled release*. 2012. Vol. 164, no. 2. P. 192–204. URL: <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2012.04.045>.
25. Tarnawski A. S., Ahluwalia A. Endothelial cells and blood vessels are major targets for COVID-19-induced tissue injury and spreading to various organs. *World Journal of Gastroenterology*. 2022. Vol. 28, no. 3. P. 275–289. URL: <https://doi.org/10.3748/wjg.v28.i3.275> .
26. Tetzlaff F., Fischer A. Human endothelial cell spheroid-based sprouting angiogenesis assay in collagenh. *Bio-protocol*. 2018. Vol. 8, no. 17. e2995.
27. The Vascular Endothelium and Human Diseases / P. Rajendran et al. *International Journal of Biological Sciences*. 2013. Vol. 9, no. 10. P. 1057–1069. URL: <https://doi.org/10.7150/ijbs.7502>.

28. The vascular endothelium I : Handbook / ed. by S. Moncada, A. Higgs. Springer Berlin, Heidelberg, 2006. 339 p.

29. Three-Dimensional cell culture systems and their applications in drug discovery and cell-based biosensors / R. Edmondson et al. *ASSAY and drug development technologies*. 2014. Vol. 12, no. 4. P. 207–218. URL: <https://doi.org/10.1089/adt.2014.573>.

30. Zetterström R. The 1998 Nobel Prize-discovery of the role of nitric oxide as a signalling molecule. *Acta paediatrica*. 2009. Vol. 98, no. 3. P. 593–599. URL: <https://doi.org/10.1111/j.1651-2227.2008.01121.x>.

ДОДАТКИ

Додаток 1

Наказ про присудження гранту для виконання дослідження в області біомедичної інженерії в університети Делхаузі (Галіфакс, Нова Шотландія, Канада) у рамках проекту Mitacs Globalink Research Award, ствердженого між некомерційною організацією Mitacs і Міністерством Освіти і Науки України.



October 25, 2022

Application Ref. IT33535

**RE: Globalink Research Award - Ministry of Education and Science of Ukraine
for research in Canada**

Project Title:	Understanding the relationship between adipose tissue hypoxia and maladaptive angiogenesis
Host Academic Supervisor:	Brendan Leung
Intern:	Yuliia Komburlei
Host Department:	Department of Applied Oral Sciences
Host Institution:	Dalhousie University
Home Supervisor:	Oleksandr Zinenko
Home Institution:	V. N. Karazin Kharkiv National University

Dear Applicants,

We are very pleased to advise you that your application for a Mitacs Globalink Research Award - Ministry of Education and Science of Ukraine has been approved. Please refer to Appendix B for the specific funding details and terms and conditions of this award.

Project lead(s) should consult with the appropriate office(s) at their academic institution(s) to determine whether: Biohazard certification(s), permit(s), or approval(s) is/are required to conduct their activities.

Mitacs Globalink builds a living bridge between Canada and international partners by establishing and reinforcing global links through student mobility. Mitacs has partnered with Ministry of Education and Science of Ukraine to support the two-way mobility of students between Canadian academic institutions and Ministry of Education and Science of Ukraine. The Mitacs Globalink Research Award - Ministry of Education and Science of Ukraine is an exciting initiative that provides the opportunity for faculty members and students at Canadian academic institutions and and to build an international research network and undertake research abroad.

All awards are subject to ongoing program eligibility and continuation of funding by our government partners. This award is offered in partnership with Ministry of Education and Science of Ukraine Mitacs gratefully acknowledges the financial support of the Government of Canada for their ongoing support of the Globalink program.

If you have any questions or comments, please contact Harpreet Sidhu, Grant Specialist, at hsidhu@mitacs.ca.

Thank you for your proposal and welcome to Mitacs Globalink!

Yours truly,

Henry Ling
Vice President, Research

Enclosures:

- Appendix A: Intern Acceptance Form
- Appendix B: Funding Details and Terms and Conditions of Award
- Appendix C: Additional Information

● Montréal, QC
405 avenue Ogilvy
Bureau 101
Montréal, QC H3N 1M3

● Ottawa, ON
56 Sparks Street
Suite 300
Ottawa, ON K1P 5A9

● Toronto, ON
Banting Institute, University of Toronto
522 - 100 College Street
Toronto, ON M5G 1L5

● Vancouver, BC
Suite 301 - 6190 Agronomy Road
University of British Columbia
Vancouver, BC V6T 1Z3

Додаток 2

Організація і обладнання лабораторії біомедичної інженерії університету Делхаузі (Галіфакс, Нова Шотландія, Канада).

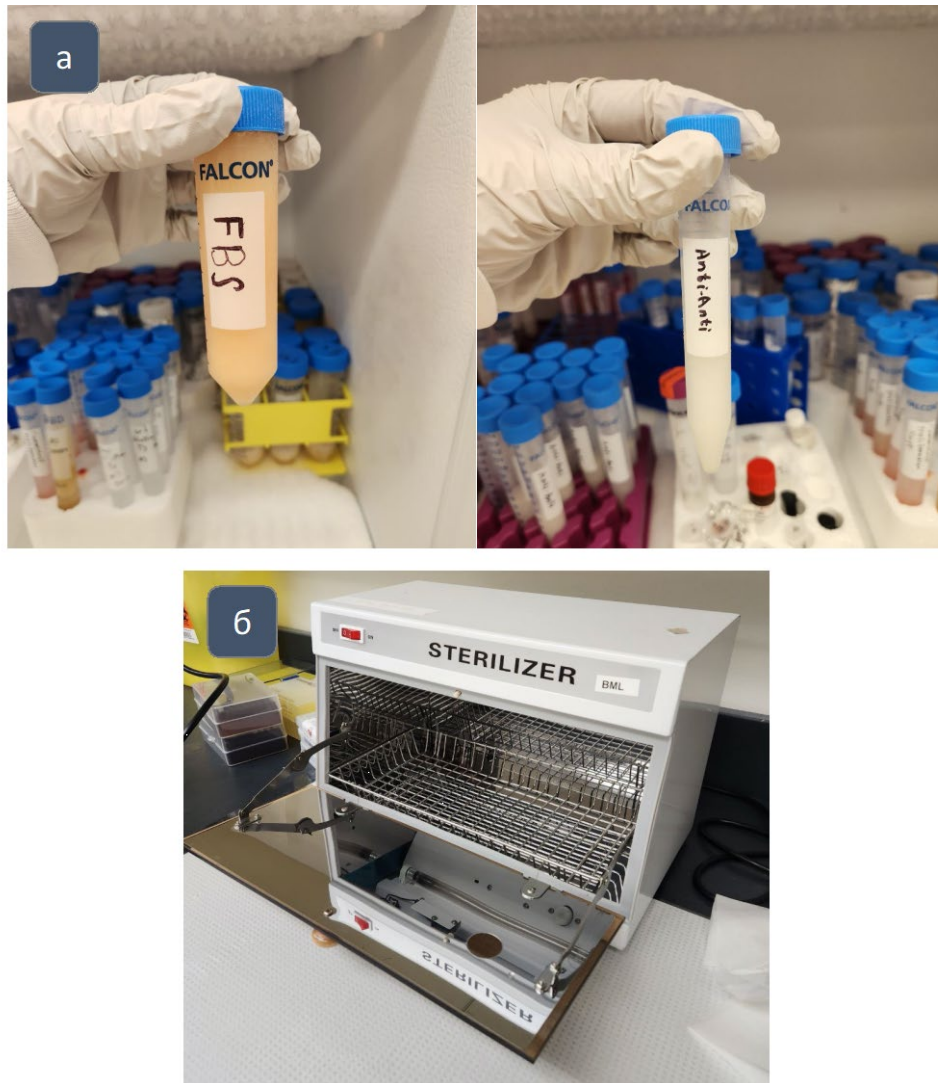


Рисунок 2.1 Морозильні камери для зберігання реактивів (а) та стерилізатор устаткований ультрафіолетовою лампою (б) головного приміщення лабораторії



Рисунок 2.2 Організація приміщення для культивування клітин: бокс біологічної безпеки II рівня (а), центрифуга (б), інкубатор для підтримання культур клітин (в), дозатори боксу біологічної безпеки (г), світловий мікроскоп (г).



Рисунок 2.4 Резервуар із рідким азотом для кріоконсервування.

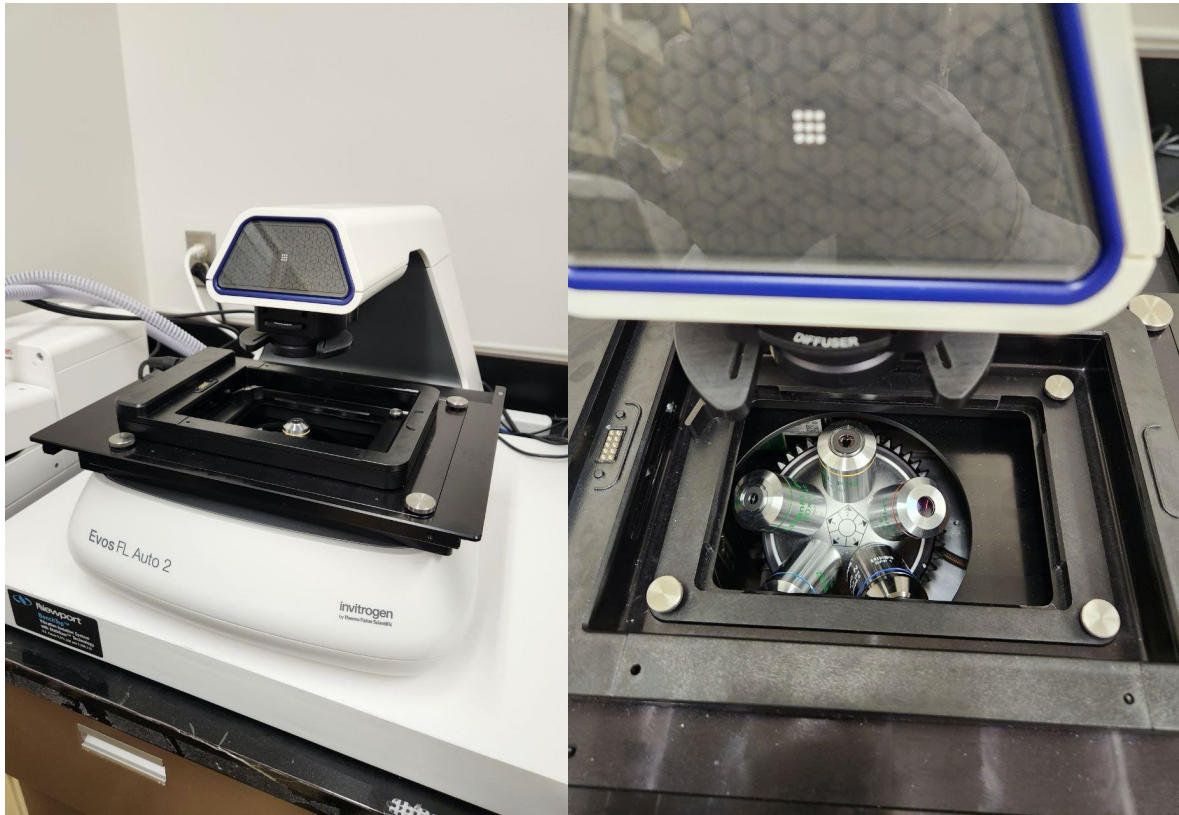


Рисунок 2.5 Система EVOS Auto 2 для мікроскопії та візуалізації

Додаток 3

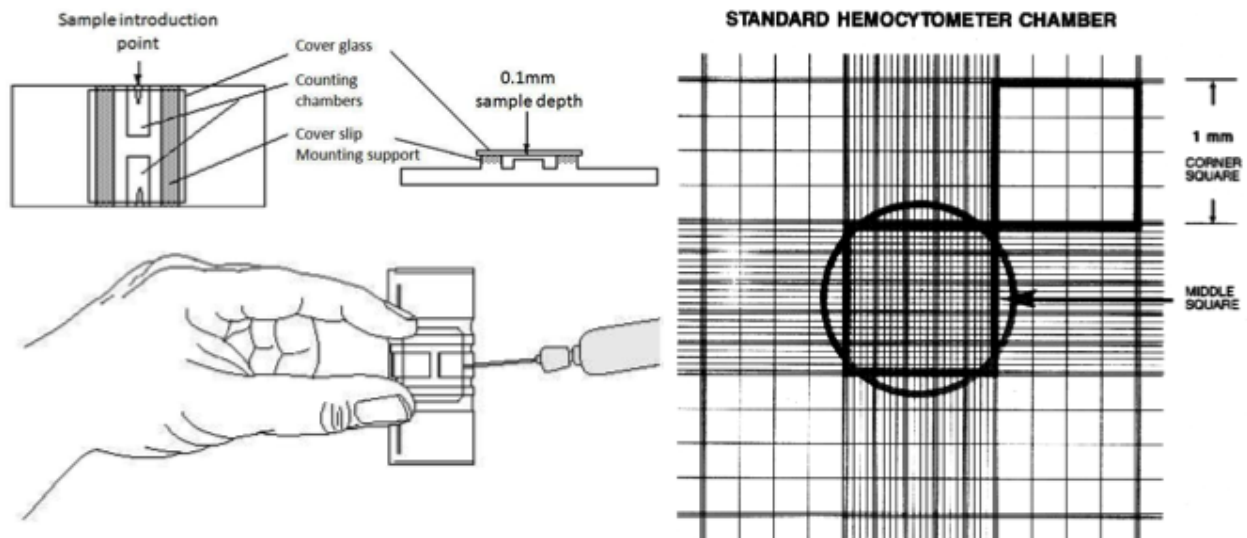


Рисунок 3.1 Будова камери Горяєва. Підрахунок клітин відбувається на 10 мкл суспензії клітин; визначають кількість клітин у центральному квадраті (обведено чорним кругом); для більш точного підрахунку, використовують чотири великих квадрата по кутам решітки, кількість клітин сумують і ділять на 4

Додаток 4

Таблиця 4.1 Склад міксу стимуляторів росту ендотеліальних клітин HUVEC

№	Назва компоненту	Фінальна концентрація
1	Сироватка теляти	0.02 ml/ml
2	Рекомбінантний людський епідермальний фактор росту	5 ng/ml
3	Базовий фактор росту фібробластів (рекомбінантний людський)	10 ng/ml
4	Інсуліноподібний фактор росту (рекомбінантний людський)	20 ng/ml
5	Фактор росту ендотелію судин (рекомбінантний людський)	0.5 ng/ml
6	Аскорбінова кислота	1 µg/ml
7	Гепарин	22.5 µg/ml
8	Гідрокортизон	0.2 µg/ml

Додаток 5

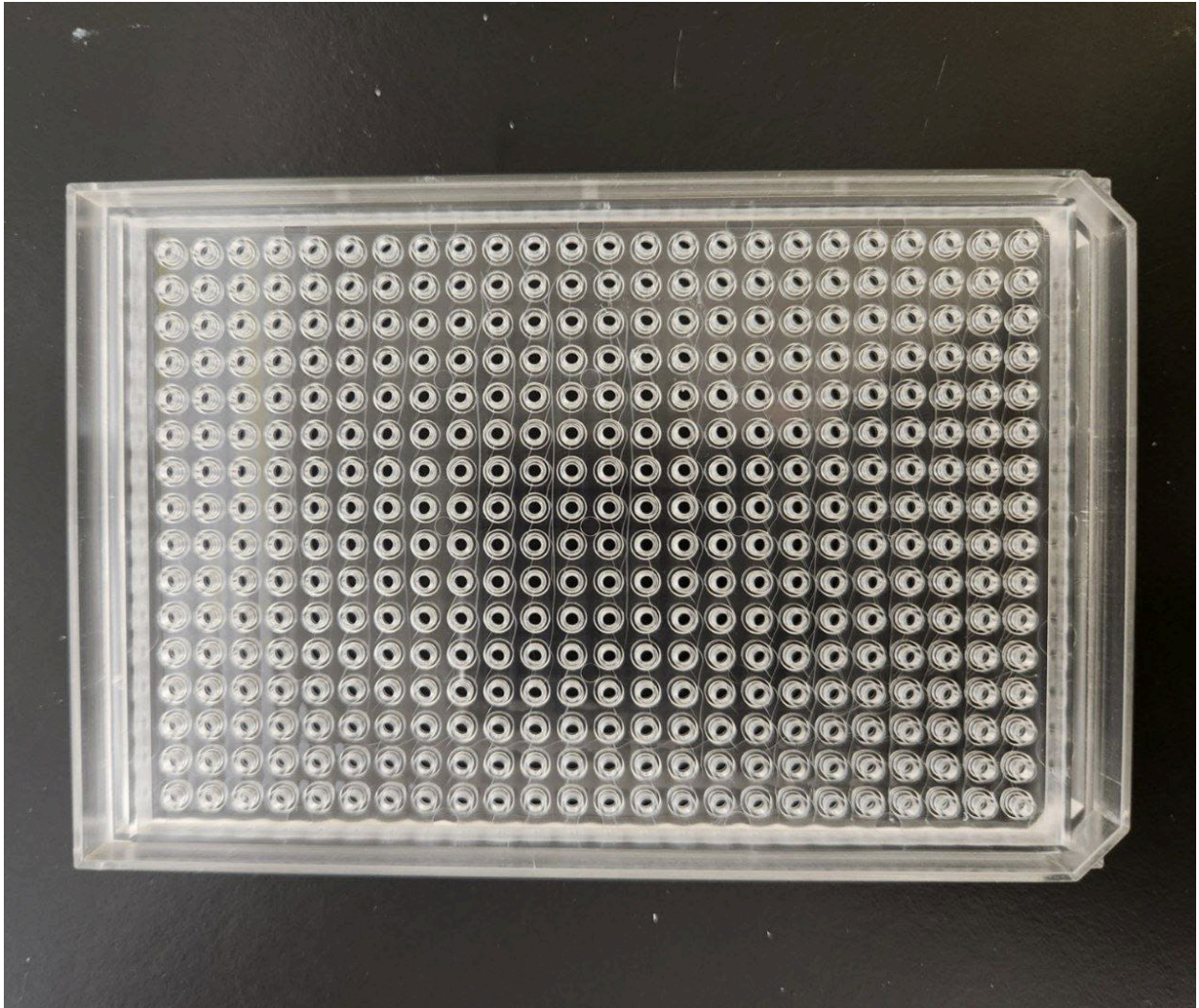


Рисунок 5.1 384-лунковий планшет для підвішування крапель, що був використаний для формування тривимірних культур ендотеліальних клітин кровоносних судин людини (HUVES).

Додаток 6



Рисунок 6.1 Автоматизована мультиканальна піпетка для висювання крапель суспензії клітин у 384-лунковий планшет для формування тривимірних культур.

Додаток 7

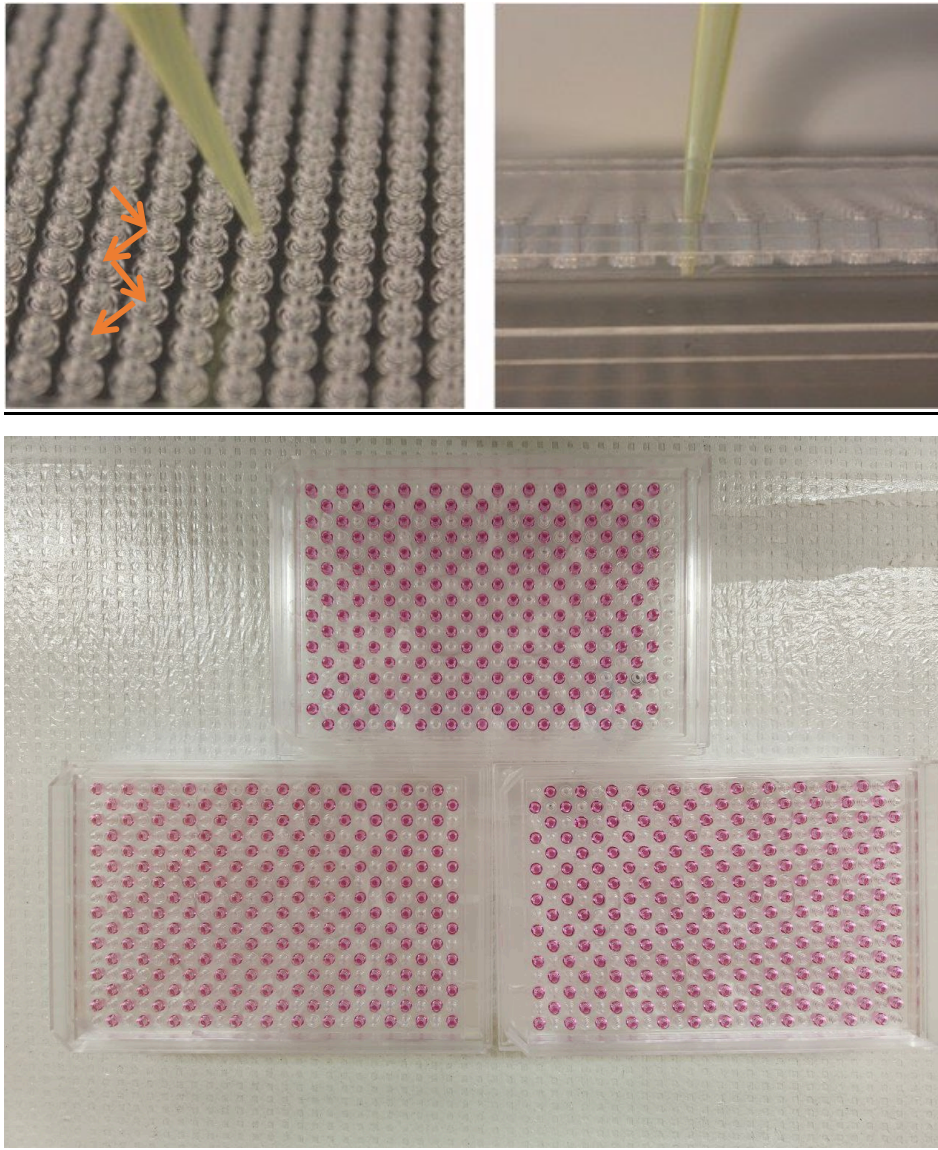


Рисунок 7.1 Спосіб висівання крапель у 384-лунковий планшет; для запобігання з'єднання близько розташованих культур, краплі були висіяні у зигзиговій послідовності; кількість крапель на 1 планшет дорівнювала 192.

Додаток 8

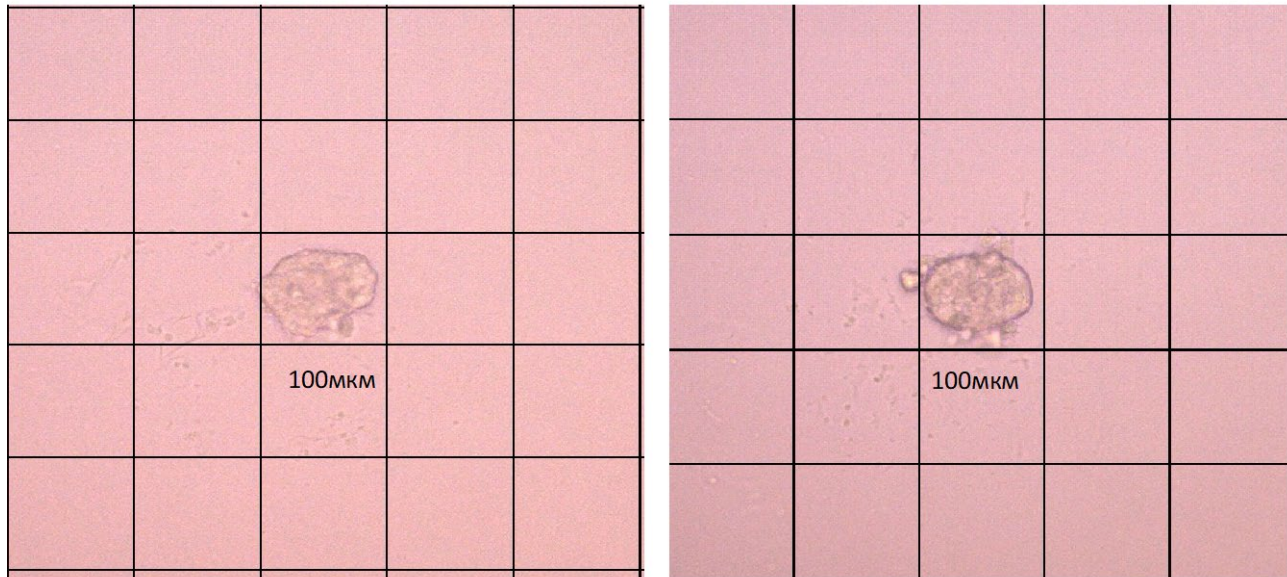


Рисунок 8.1 Тривимірні моделі культур ендотеліальних клітин кровоносних судин людини (HUVEC) після 24 годин інкубування у 384-лункових планшетах для підвішування крапель. Зображення отримані з використанням системи для мікроскопічної візуалізації EVOS Auto 2; решітка для вимірювання розмірів отриманих моделей була побудована у програмному забезпеченні мікроскопу.

Додаток 9



Рисунок 9.1 Тривимірні моделі культур ендотеліальних клітин кровоносних судин людини (HUVEC) у твердому колагеновому середовищі; 3Д культури були сформовані протягом 24 годин інкубування у 384-лункових планшетах для підвішування крапель. Зображення отримані з використанням системи для мікроскопічної візуалізації EVOS Auto 2.

Додаток 10

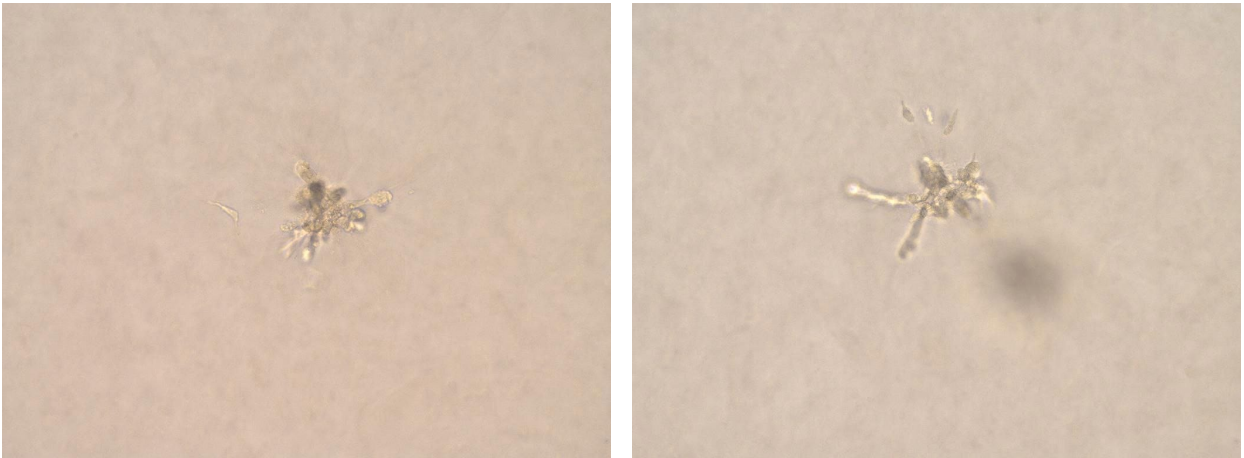


Рисунок 10.1 Утворення відростків 3Д моделі культур ендотеліальних клітин кровоносних судин людини (HUVEC) після 24 годин інкубування у твердому колагеновому середовищі з додаванням стимуляторів ангіогенезу; 3Д культури були сформовані протягом 24 годин інкубування у 384-лункових планшетах для підвішування крапель. Зображення отримані з використанням системи для мікроскопічної візуалізації EVOS Auto 2.