

**МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ БІОРЕСУРСІВ
І ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ УКРАЇНИ**

КЛАДНИЦЬКА ЛАРИСА ВОЛОДИМИРІВНА

УДК 636.6:612:546.289:549.23

**МОРФОФУНКЦІОНАЛЬНІ ВЛАСТИВОСТІ СТОВБУРОВИХ КЛІТИН
ТА ЇХ ВПЛИВ НА ПУХЛИННИЙ ПРОЦЕС**

16.00.02 «Патологія, онкологія і морфологія тварин»

Автореферат дисертації на здобуття наукового ступеня
доктора ветеринарних наук

Київ – 2020

Дисертацією є кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису
Роботу виконано в Національному університеті біоресурсів і природо-
користування України Міністерства освіти і науки України

Науковий консультант доктор ветеринарних наук, професор
член-кореспондент НААН
Мазуркевич Анатолій Йосипович,
Національний університет біоресурсів
і природокористування України,
професор кафедри хірургії і патофізіології
імені І. О. Поваженка

Офіційні опоненти: доктор ветеринарних наук, професор
Коцюмбас Галина Іванівна,
Львівський національний університет
ветеринарної медицини та біотехнологій
імені С. З. Гжицького,
завідувач кафедри нормальної
та патологічної морфології і судової ветеринарії

доктор ветеринарних наук, професор
Горальський Леонід Петрович,
Поліський національний університет,
завідувач кафедри анатомії і гістології

доктор ветеринарних наук, професор
Клестова Зінаїда Сергіївна,
Державний науково-контрольний інститут
біотехнології і штамів мікроорганізмів,
заступник директора з наукової роботи

Захист відбудеться «05» листопада 2020 року о 10⁰⁰ годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.004.03 у Національному університеті біоресурсів і природокористування України за адресою: 03041, м. Київ, вул. Героїв Оборони, 15, навчальний корпус № 3, кімната 301

З дисертацією можна ознайомитися в науковій бібліотеці Національного університету біоресурсів і природокористування України за адресою: 03041, м. Київ, вул. Героїв Оборони, 13, навчальний корпус № 4, кімната 41а

Автореферат розіслано «02» жовтня 2020 року

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради

В. В. Мельник

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Мезенхімні стовбурові клітини займають одне з провідних місць серед біологічних препаратів, що проходять клінічні випробування та застосовуються у медичній та ветеринарній медицині. Їх джерелом може бути червоний кістковий мозок, плацента, ендометрій, кордова кров, фетальна, жирова тканина, молочні зуби тощо (Bianco P., 2008; Caplan A., 1991; Stanko P., 2014; Kobolak J., 2016; Tigistu-Sahle F., 2017; Uder C., 2018). Використання жирової тканини, як джерела стовбурових клітин, має низку переваг, оскільки не існує біотичних перепон для використання цього первинного матеріалу як у медичній, так і ветеринарній практиці. Застосування стовбурових клітин здійснюють за різноманітної патології кісткової і хрящової тканини (Berebichez-Fridman R., 2017; Liu L., 2019), ішемічної хвороби серця (Luger D., 2017; Lalu M., 2018). Найбільш значущою для подальшого використання стовбурових клітин, крім їх здатності до комітації в різних напрямках, є імуномодельююча та імуносупресивна властивість (Le Blank K., 2015; Souza L., 2016; Li N., 2017), що є підґрунтям для використання їх у лікуванні аутоімунних захворювань, хворобі трансплантат проти власника, хронічному гепатиті і цирозі печінки (Galleu A., 2017; Elgas S., 2019; Wang L., 2016; Krasovska-Kwiecien A., 2019), запаленні легень (Harrell C., 2019), септичних процесах (Chen H., 2014; Chang C., 2012) тощо.

Нині з'являється все більше даних відносно застосування стовбурових клітин у ветеринарній медицині при лікуванні остеоартритів, дегенерації міжхребцевих дисків, ділятаційної кардіоміопатії, хронічних нефритів, тощо (de Bakker E., 2013; Hoffman A., 2016; Deviredy L., 2017; Sasaki A., 2018; Harrell C., 2019). У галузі ветеринарної медицини в Україні під керівництвом доктора ветеринарних наук, професора А. Й. Мазуркевича проведено серію досліджень окремих біологічних властивостей стовбурових клітин та їх вплив на корекцію функціонального стану ушкоджених тканин і органів (Мазуркевич А., 2013–2020; Ковпак В., 2014–2020; Малюк М., 2015–2019; Харкевич Ю., 2015–2019; Савчук Т., 2019; Бокотько Р., 2019;).

Ряд аспектів застосування стовбурових клітин, особливо у дрібних домашніх тварин, залишається не з'ясованими. Насамперед, кількість досліджень з використанням стовбурових клітин у собак та, особливо, котів, незначна (Ковпак В., 2014–2020; Малюк М., 2015–2019). Відсутні стандарти визначення критичних характеристик стовбурових клітин тваринного походження. Остаточо не розроблені ефективні підходи виділення і отримання стовбурових клітин тварин різних видів, недостатньо охарактеризований їх антигенний спектр, клітинний цикл, морфологічні, функціональні показники, особливості ліпідного обміну, співвідношення насичених, мононенасичених та поліненасичених жирних кислот, що є ключовим фактором у процесах проліферації і підтримання їх основних морфологічних та функціональних характеристик (Sonveber T., 2018; Rogers G., 2014; Gilroy D., 2019; Grzesiak J., 2011; Mathew S., 2019).

Водночас, немає чітких обмежень та рекомендацій щодо визначення числа пасажів для культивування клітини, не встановлені остаточно маркерні білки, важливі для контролю якості клітин, призначених для трансплантації тощо. Важливим є також доклінічне дослідження безпеки використання стовбурових клітин, особливо з точки зору достовірного впливу на канцерогенез, оскільки за багатьма морфологічними та функціональними властивостями стовбурові клітини походять на злякано трансформовані клітини. Гостро постає питання щодо методів оцінки канцеропротективного, модуляторного, метаболічного впливу на організм реципієнта інокульованих стовбурових клітин з терапевтичним спрямуванням. Однак, в літературі є лише поодинокі дослідження, проведені у цьому напрямі, і на теперішній час отримані суперечливі результати, що вказують як на здатність стовбурових клітин пригнічувати пухлинний ріст (Rezaie Z., 2019; Lee H., 2017; He L., 2016; Gonzalez M., 2017; Huang J., 2015), так і сприяти його промоції (Nishikawa G., 2019; Wang S., 2019, Chen B., 2018; Liu Y., 2019). Вивченню вказаних аспектів і присвячена дана дисертація.

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

Дисертація є складовою частиною науково-дослідної роботи кафедри фізіології, патофізіології та імунології тварин (нині – кафедра хірургії і патофізіології імені академіка І. О. Поваженка) Національного університету біоресурсів і природокористування України за темами: «Вивчення морфофункціональних характеристик патологічно змінених тканин у тварин-реципієнтів при застосуванні стовбурових клітин» (номер державної реєстрації 0111U003428, 2011–2015 рр.); «Дослідити особливості коригуючої дії введених стовбурових клітин на патологічно змінені структури і функції тканин в організмі тварин-реципієнтів» (номер державної реєстрації 0115U003476, 2015–2017 рр.); «Розробити нові способи стимуляції процесів відновлення ушкоджених тканин опорно-рухового апарату домашніх тварин методами клітинної терапії» (номер державної реєстрації 0118U000307, 2018–2020 рр.).

Мета та завдання дослідження. Мета дисертаційного дослідження – дослідити морфофункціональні властивості стовбурових клітин тварин та їх системний вплив на пухлинний процес.

Для досягнення поставленої мети необхідно було вирішити такі завдання:

- удосконалити умови виділення та культивування стовбурових клітин культури жирової тканини тварин (собаки, коня, миші), нервової тканини (кота), червоного кісткового мозку (миші) в умовах *in vitro*;

- встановити морфологічні та функціональні властивості стовбурових клітин культури жирової тканини та кісткового мозку за ранніх і пізніх пасажів культивування *in vitro*;

- дослідити клітинний цикл та каріотипову стабільність клітин культур жирової тканини та червоного кісткового мозку за ранніх і пізніх пасажів культивування *in vitro*;

- визначити імунофенотип стовбурових клітин культури жирової та нервової тканини з використанням імуноцитохімічних реакцій детекції

мембранних та внутрішньоклітинних білків, характерних для клітин з низьким ступенем диференціації;

– встановити біологічну активність клітин культур жирової, нервової тканини, червоного кісткового мозку за показниками жирнокислотного складу ліпідів;

– дослідити характер проліферативних змін клітин за показниками активності сукцинатдегідрогенази мембран мітохондрій печінки тварин-реципієнтів за трансплантації стовбурових клітин *in vivo*;

– вивчити характер системної та клітинної імунної відповіді організму тварин-реципієнтів *in vivo* за трансплантації мезенхімних стовбурових клітин за клітинними, ваговими параметрами лімфоїдних органів та активністю перитонеальних макрофагів;

– дослідити параметри росту, метастазування перещепленої карциноми за дії стовбурових клітин на моделі швидко прогресуючої карциноми легені Льюїс;

– визначити вплив трансплантації мезенхімних стовбурових клітин культури кісткового мозку на клітинний цикл, апоптоз, рівень генетичної стабільності клітин первинної пухлини карциноми легені Льюїс у скелетній м'язовій тканині миші на моделі швидко прогресуючої карциноми легені Льюїс;

– дослідити патоморфологічні зміни структури первинної пухлинної тканини карциноми легені Льюїс у скелетній м'язовій тканині миші за впливу алогенних мезенхімних стовбурових клітин культури кісткового мозку на моделі швидкопрогресуючої карциноми легені Льюїс.

Об'єкт дослідження – морфологічні і функціональні властивості стовбурових клітин тваринного походження та їх системний вплив на пухлинний процес.

Предмет дослідження – морфологічні, функціональні, імунофенотипові показники, жирнокислотний склад ліпідів, клітинний цикл стовбурових клітин; активність перитонеальних макрофагів, клітинність лімфоїдних органів, активність сукцинатдегідрогенази мітохондрій печінки тварин-реципієнтів; ріст пухлини, метастазування, апоптоз, клітинний цикл, анеуплоїдія, морфологічні зміни первинної пухлини в організмі тварин-реципієнтів з експериментально змодельованим пухлинним процесом за впливу алогенних стовбурових клітин.

Методи дослідження: культивування клітин *in vitro*, методи експериментального моделювання (відтворення та моніторинг росту і метастазування карциноми легені Льюїс), морфологічні методи (світлова мікроскопія (оглядові та спеціальні методики) цитологічних препаратів культур клітин, гістологічних препаратів пухлин, морфометричний аналіз), цитологічні (цитофлуориметричне визначення диплоїдних та анеуплоїдних клітин та відсотковий вміст клітин за фазами клітинного циклу, визначення ядерно-цитоплазматичного співвідношення та морфологічних ознак клітин за ранніх і пізніх пасажів культивування, дослідження життєздатних та апоптичних клітин), імунологічні (імуноцитохімічне визначення експресії антигенів, дослідження клітинності і вагового індексу імунних органів, функціональної

активності перитонеальних макрофагів), біохімічні (визначення жирно-кислотного складу ліпідів мембран, визначення активності сукцинат-дегідрогенази мембран мітохондрій печінки, біохімічних показників сироватки крові), зоотехнічні (визначення маси тіла, пухлини, тимусу, селезінки, параметрів метастазів), статистичні методи (визначення середніх величин та їх похибок, рівня достовірності, кореляційний, однофакторний дисперсійний аналіз). Усі дослідження проведено з дотриманням норм біологічної безпеки та принципів біоетики.

Наукова новизна одержаних результатів. Уперше проведено комплексне дослідження морфологічних і функціональних властивостей стовбурових клітин та їх вплив на експериментально змодельований пухлинний процес в тварин-реципієнтів.

Уперше розроблено нові метод отримання стовбурових клітин культури жирової тканини собаки, коня, миші та визначено оптимальний склад середовища для її кріоконсервування. Уперше розроблено метод отримання стовбурових клітин нервової тканини kota. Встановлено, що жирова тканина більшого сальника і підшкірна є придатною для отримання адгезивної фракції моноклеарних клітин з високою проліферативною активністю. Жирова тканина більшого сальника у якості первинного матеріалу дає більший вихід адгезивної фракції моноклеарних клітин з високою проліферативною активністю та їх найкращі функціональні властивості. Уперше проведено оптимізацію умов обробки та отримання стовбурових клітин культури червоного кісткового мозку миші.

Отримано нові наукові дані щодо морфології та функціонального стану стовбурових клітин культури червоного кісткового мозку та жирової тканини, які змінюються у процесі культивування, що засвідчує початок реплікативного старіння з 4 та 7 пасажів відповідно.

Уперше визначено вміст стовбурових клітин культури червоного кісткового мозку та жирової тканини за фазами клітинного циклу та вміст анеуплоїдів за ранніх та пізніх пасажів культивування. Доведено, що культура клітин червоного кісткового мозку та жирової тканини на пізніх пасажах характеризуються достовірно більшим вмістом анеуплоїдних клітин та зменшенням кількості клітин проліферативного пулу G₂/M+S.

Отримано нові наукові дані щодо імунофенотипу стовбурових клітин культури жирової та нервової тканини. Доведено причинно-наслідкову залежність експресії ядерних та цитоплазматичних білків стовбурових клітин та збільшення пасажів культивування: віментин $\eta^2=0,73$ ($p<0,05$), актин $\eta^2=0,79$ ($p<0,05$), E-кадгерин $\eta^2=0,87$ ($p<0,01$), CD44 $\eta^2=0,74$ ($p<0,05$), Ki-67 $\eta^2=0,83$ ($p<0,05$), PCNA $\eta^2=0,83$ ($p<0,05$).

Уперше встановлено, що стовбурові клітини культури червоного кісткового мозку, жирової та нервової тканини мають спільні риси спектру жирних кислот, що характерно для клітин з високим проліферативним потенціалом, резистентних до апоптозу; високе співвідношення мононенасиченої олеїнової до насиченої стеаринової кислоти (C18:1/C18:0), яке становить 1,50–2,18 і характеризує активність ферменту стеарил-коензим

А-десатурази та активний стан Wnt/ β -катенін сигнального шляху; нездатність до подовження ланцюга насичених жирних кислот.

Уперше визначено, що стовбурові клітини культури червоного кісткового мозку мають відмінності за складом поліненасичених жирних кислот порівняно з такими жирової і нервової тканини: більший вміст ненасичених жирних кислот ($p < 0,05$), $\omega 6$ жирних кислот ($p < 0,05$) та менший вміст $\omega 3$ жирних кислот ($p < 0,05$).

Уперше в дослідях *in vivo* встановлено, що трансплантація стовбурових клітин культури жирової тканини та кісткового мозку спричинює підвищення активності сукцинатдегідрогенази мітохондрій гепатоцитів мишей-реципієнтів, що вказує на збільшення їх мітотичної активності; короточасного збільшення відносного індексу маси тимусу і селезінки тварин-реципієнтів і вмісту в них лімфоїдних клітин, які поступово відновлюються до норми; підвищення активності НАДФ-Н₂-оксидази моноцитів, макрофагів.

Уперше доведено, що за системного впливу алогенних мезенхімних стовбурових клітин у тварин-реципієнтів з експериментально змодельованим пухлинним процесом збільшується маса первинної пухлини, загальний об'єм метастазів, відбувається швидший перехід пухлинного процесу до васкулярної стадії з більшим показником кількості метастазів розміром 1,0–3,0 мм, що засвідчує активізацію пухлинного процесу. Доведено причинно-наслідкову залежність трансплантації стовбурових клітин на загальний об'єм метастазів із показником сили впливу $\eta^2_x = 0,74$ ($p < 0,05$).

Отримано нові наукові дані щодо зниження генетичної стабільності клітин первинної пухлини мишей C57BL/6 з перещепленою метастатичною карциномою легені Льюїс за впливу стовбурових клітин, що характеризується збільшенням кількості анеуплоїдів у первинній пухлині – $76,68 \pm 1,99$ % ($p < 0,001$) та їх кількості серед клітин проліферативного пулу G₂/M+S – $68,02 \pm 3,42$ % ($p < 0,001$), що засвідчує злякисніший фенотип клітин первинної пухлини.

Уперше встановлено, що застосування алогенних мезенхімних стовбурових клітин культури кісткового мозку в мишей C57BL/6 з трансплантованою метастатичною карциномою легені Льюїс призводить до порушення механізмів запрограмованої загибелі клітин первинної пухлини через зниження апоптозу до $41,82 \pm 1,37$ % ($p < 0,001$), $\eta^2_x = 0,88$ ($p < 0,001$), що засвідчує активізацію пухлинного процесу.

Наукову новизну отриманих результатів підтверджено патентами на корисну модель «Спосіб отримання мезенхімальних стовбурових клітин з жирової тканини собаки» та «Спосіб отримання нейральних стовбурових клітин kota».

Практичне значення одержаних результатів дослідження. Запропоновані нові методи отримання стовбурових клітин культури жирової та нервової тканини, удосконалений метод отримання стовбурових клітин культури червоного кісткового мозку можуть бути використані для отримання стовбурових клітин тварин різних видів.

Результати дослідження морфологічних, функціональних властивостей, клітинного циклу стовбурових клітин, вмісту анеуплоїдів у культурах клітин за різних пасажів культивування можуть слугувати критеріями якісної оцінки клітинного матеріалу для трансплантації з терапевтичною метою та забезпечать теоретичне підґрунтя для подальших наукових досліджень у цьому напрямі.

Отримані наукові дані щодо системного впливу алогенних мезенхімних стовбурових клітин у тварин-реципієнтів з експериментально змодельованим пухлинним процесом доповнюють сучасні дані щодо його перебігу та забезпечують підґрунтя для проведення ретельного обстеження, спрямованого на виявлення прихованої онкологічної патології, враховуючи здатність мезенхімних стовбурових клітин активувати та прискорювати процеси канцерогенезу.

Основні положення дисертації впроваджено в навчальний процес і науково-дослідну роботу кафедр: нормальної та патологічної фізіології тварин Львівського національного університету ветеринарної медицини та біотехнологій імені С. З. Гжицького; нормальної та патологічної фізіології тварин Білоцерківського національного аграрного університету; анатомії, нормальної та патологічної фізіології Сумського національного аграрного університету; фізіології, біохімії та мікробіології Одеського державного аграрного університету; нормальної та патологічної фізіології тварин Харківської державної зооветеринарної академії; фізіології та біохімії сільсько-господарських тварин Дніпровського державного аграрно-економічного університету; фізіології, біохімії і морфології Подільського державного аграрно-технічного університету.

За результатами досліджень розроблено та впроваджено у практику методичні рекомендації «Методи видоспецифічної оцінки стовбурових клітин та їх застосування у ветеринарній клітинній регенеративній медицині» (затверджено Вченою радою Національного університету біоресурсів і природокористування України, протокол № 5 від 27.12.2017 р.).

Особистий внесок здобувача. Дисертація є самостійним науковим дослідженням. Здобувачем за участі наукового консультанта доктора ветеринарних наук, професора, члена-кореспондента НААН А. Й. Мазуркевича визначено мету та завдання роботи, обґрунтовано науковий напрям та програму досліджень, сформульовано висновки і пропозиції.

Здобувачем особисто проведено патентно-інформаційний пошук та аналіз наукової літератури щодо морфологічних, функціональних, імунних властивостей стовбурових клітин кісткового мозку, жирової та нервової тканини, пухлинного процесу в організмі тварин, запропоновано ідею досліджень, виконано весь обсяг експериментальних досліджень, проведено статистичну обробку цифрових показників, написано та оформлено всі розділи дисертації, сформовано ілюстративні матеріали. Здобувачем вперше здійснено дослідження та порівняння морфології, фенотипу та каріотипу клітин у культурах виділених з різних джерел (червоний кістковий мозок, жирова тканина, нервова тканина) різних видів тварин (собаки, kota, коня, миші); встановлено вплив алогенних мезенхімних стовбурових клітин на пухлинний

процес за експериментально індукованої карциноми легені Льюїс та доведено їх вплив на активізацію онкопроцесу, збільшення кількості метастазів васкулярної стадії, зниження рівня апоптозу, підвищення кількості анеуплоїдів та зростання проліферативного пулу клітин первинної пухлини дослідних тварин. Із результатів проведених досліджень і публікацій зі співавторами, за їх згодою, використано лише ті результати, які було одержано особисто здобувачем.

Обговорення результатів дослідження і формулювання висновків проведено спільно з науковим консультантом. У докторській дисертації Л. В. Кладницької відсутні матеріали кандидатської дисертації.

Апробація результатів дисертації. Матеріали дисертації було апробовано в доповідях та обговорено на: II Міжнародній науково-практичній конференції молодих вчених «Актуальні проблеми наук про життя та природокористування» (м. Київ, 2013 р.); Cell Technology Week (м. Київ, 2013 р.); Міжнародній науковій конференції, присвяченій 115-річчю Національного університету біоресурсів і природокористування України та 15-річчю GCHERA «Біоресурси планети та біобезпека навколишнього середовища: проблеми та перспективи» (м. Київ, 2013 р.); Міжнародній науково-практичній конференції, присвяченій 230-річчю ветеринарної освіти і науки в Україні «Інноваційність розвитку сучасного аграрного виробництва» (м. Львів, 2014 р.); XIII Міжнародній науково-практичній конференції професорсько-викладацького складу та аспірантів, присвяченій 20-річчю набуття університетом статусу Національного «Проблеми ветеринарної медицини та якості і безпеки продукції тваринництва» (м. Київ, 2014 р.); симпозиумі «The 7th Annual Maryland stem cell research» (Меріленд, США, 2014 р.); Міжнародній науковій конференції «Роль фізіології тварин у вирішенні сучасних проблем аграрної освіти, науки і виробництва» (м. Львів, 2014 р.); Міжнародній конференції «European Molecular Biology organization Conference» (м. Париж, Франція, 2014 р.), XIX з'їзді Українського фізіологічного товариства з міжнародною участю, присвяченому 90-річчю від дня народження академіка П. Г. Костюка (м. Львів, 2015 р.); XIV Міжнародній науково-практичній конференції професорсько-викладацького складу та аспірантів, присвяченій 95-річчю факультету ветеринарної медицини НУБіП України «Проблеми ветеринарної медицини та якості і безпеки продукції тваринництва» (м. Київ, 2015 р.); Міжнародній науково-практичній конференції «Природне агровиробництво в Україні: проблеми становлення, перспективи розвитку», секція «Екологічне тваринництво та рибництво» (м. Дніпропетровськ, 2015 р.); Міжнародній науково-практичній конференції «Актуальні проблеми фізіології тварин» (м. Одеса, 2016 р.); Міжнародній науково-практичній конференції, присвяченій 95-річчю заснування факультету ветеринарної медицини Національного університету біоресурсів і природокористування України «Інновації у ветеринарну освіту і науку XXI століття» (м. Київ, 2015 р.); IV Європейському конгресі з імунології (м. Вена, Австрійська Республіка, 2015 р.); Міжнародній науково-практичній конференції, присвяченій 115-річчю з дня народження академіка

І. О. Поваженка «Теорія, практика та перспективи ветеринарної медицини» (м. Київ, 2016 р.); Міжнародній науково-практичній конференції «Інновації у ветеринарну освіту і науку» (м. Київ, 2016 р.); XV Міжнародній науково-практичній конференції професорського складу та аспірантів «Проблеми ветеринарної медицини та якості і безпеки продукції тваринництва» (м. Київ, 2016 р.); Міжнародній науково-практичній конференції в рамках реалізації проекту за підтримки програми Жана Моне «Контроль безпечності харчових продуктів у ЄС», присвяченій 120-річчю заснування Національного університету біоресурсів і природокористування України «Контроль безпечності харчових продуктів. Україна – ЄС: невирішені питання» (м. Київ, 2018 р.); Міжнародній науково-практичній конференції, присвяченій 120-річчю заснування Національного університету біоресурсів і природокористування України «Актуальні проблеми фізіології тварин» (м. Чернігів, 2018 р.); Міжнародній науково-практичній конференції «Цілі сталого розвитку третього тисячоліття: виклики для університетів наук про життя» (м. Київ, 2018 р.); симпозіумі і літній школі «Fundamental principles of cancer biotherapy» (м. Київ, 2018 р.); XI Parnas Conference «Young Scientists Forum, Biochemistry and Molecular Biology for Innovative Medicine» (м. Київ, 2018 р.); XVII Всеукраїнській науково-практичній конференції, присвяченій 100-річчю від дня народження доктора біологічних наук, колишнього завідувача лабораторії фізіології лактації Українського НДІ фізіології і біохімії сільськогосподарських тварин В. І. Третевича «Молоді учені у вирішенні актуальних проблем біології, тваринництва та ветеринарної медицини» (м. Львів, 2018 р.); конференції молодих учених Інституту біохімії імені О. В. Палладіна НАН України «Актуальні проблеми біохімії та біотехнології» (м. Київ, 2019 р.); Міжнародній науково-практичній конференції, присвяченій 80-річчю від дня народження професора В. Я. Атамася «Актуальні проблеми епізоотології та заразних хвороб тварин» (м. Одеса, 2019 р.); 20 з'їзді Українського фізіологічного товариства з міжнародною участю (м. Київ, 2019 р.); науково-практичній конференції молодих вчених, присвяченій Всесвітньому дню боротьби проти раку «Фундаментальна медицина: інтегральні підходи до терапії хворих з онкопатологією» (м. Київ, 2019 р.).

Публікації. За результатами досліджень опубліковано 53 наукові праці, з яких 25 статей у наукових фахових виданнях України, включених до міжнародних наукометричних баз даних, 3 статті у наукових виданнях інших держав, стаття в іншому науковому виданні України, включеному до міжнародних наукометричних баз даних, 2 патенти України на корисну модель, методичні рекомендації та 21 теза наукових доповідей.

Структура та обсяг дисертації. Дисертація складається з анотацій, вступу, огляду літератури, матеріалів і методів дослідження, результатів експериментальних досліджень, висновків, практичних рекомендацій, списку використаних джерел. Дисертацію викладено на 417 сторінках. Матеріали дисертації проілюстровано 107 рисунками і 48 таблицями. Список джерел використаної літератури містить 487 посилань, з яких 422 латиницею.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Вибір напрямів досліджень, матеріал і методи виконання роботи. Дисертацію виконано впродовж 2013–2020 рр. на кафедрі фізіології, патофізіології та імунології тварин (нині – кафедра біохімії і фізіології тварин імені академіка М. Ф. Гулого та кафедра хірургії і патофізіології імені І. О. Поваженка) Національного університету біоресурсів і природокористування України, на базі проблемної науково-дослідної лабораторії фізіології та експериментальної патології тварин, навчально-наукової лабораторії «Центр клітинних технологій у ветеринарній медицині» Національного університету біоресурсів і природокористування України. Окремі дослідження виконано на базі відділу експериментальних клітинних систем Інституту експериментальної патології, онкології і радіобіології імені Р. С. Кавецького НАН України, Української лабораторії якості та безпеки продукції АПК Національного університету біоресурсів і природокористування України, відділу клінічної імунології інституту клінічної радіології Національного наукового центру радіаційної медицини Національної академії медичних наук України.

Дослідження проводили на клінічно здорових тваринах: 250 самців лінійних мишей С57В1/6 вагою 20–24 г віком 2–3 місяці; 35 собаках різних порід вагою 10–25 кг віком 10–18 місяців; 3 конях української верхової породи, вагою 400–450 кг віком 4–5 років, 15 новонароджених цуценятах та 12 кошенятах.

Годівлю дослідних тварин здійснювали за раціоном, який відповідав потребі в поживних речовинах, мікро-, макроелементах та вітамінах. Тварини мали вільний доступ до води. Експериментальні дослідження проведено з дотримання вимог Закону України № 3447 – IV від 21.02.2006 р. «Про захист тварин від жорстокого поводження» та цілком узгоджуються з основними принципами «Європейської конвенції з захисту хребетних тварин, що використовуються для експериментальних та наукових цілей» (Страсбург, 1986), декларації «Про гуманне ставлення до тварин» (Гельсінкі, 2000) і Національного конгресу з біоетики «Загальні етичні принципи експериментів на тваринах» (Київ, 2001).

Прилади, використані для наукових досліджень, проходили щорічну метрологічну перевірку.

Першу серію досліджень присвячено розробленню та оптимізації способу отримання та культивування стовбурових клітин з різних джерел, визначенню впливу умов культивування та кріоконсервування на їх властивості. Загальну схему досліджень наведено на рис. 1.

Мезенхімні стовбурових клітин культури червоного кісткового мозку мишей отримували методом вимивання його з діафізів стегнової, плечової та великої гомілкової кісток евтаназованих тварин, виділяли фракцію моноклеарів у градієнті щільності фіколу, культивували у поживному середовищі Ігла, модифікованого Дюльбекко з додаванням 20 % фетальної сироватки телят, 1 % антибіотика-антиміотика в умовах CO₂-інкубатора

за температури 37 °С, 5 % вмісту CO₂, абсолютної вологості повітря. Культуральне середовище замінювали на свіже кожні 72 год (Мазуркевич та співавтори, 2013). Щільність фіколу в дослідах становила 1,074, 1,076, 1,078 і 1,080.

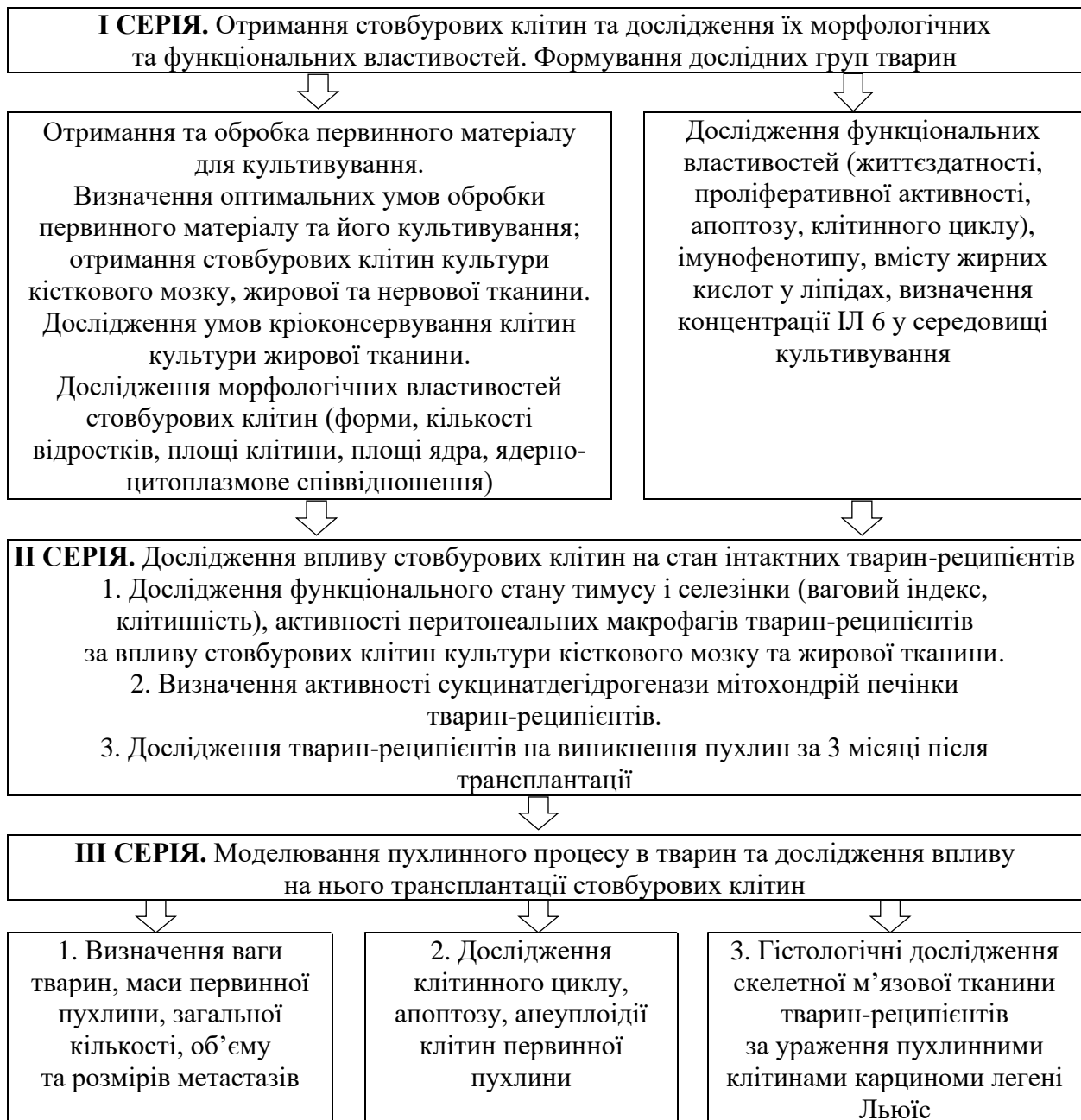


Рис. 1. Загальна схема досліджень

Для отримання мезенхімних стовбурових клітин культури жирової тканини тварин використовували жирову тканину більшого сальника мишей, собак під час планових оперативних втручань (оваріогістеректомія, оваріоектомія) та підшкірну жирову тканину мишей, собак та коней.

Отримання мезенхімних стовбурових клітин культури жирової тканини проводили за власною методикою (Кладницька Л. В. і співавтори, 2016) та порівнювали з відомим методом обробки первинного матеріалу дезагрегаційними розчинами (2 мг/см³ колагенази типу II) та методом

експланту. Культивування проводили у CO₂ інкубаторі за 5 % вмісту CO₂, температури 37 °С, абсолютної вологості повітря.

Клітини переводили у суспензію за допомогою розчину 0,25 % трипсину з 0,02 % етилендиметилтетраоцтової кислоти під контролем інвертованого мікроскопа Axiovert 40. Суспензію фільтрували, промивали фосфатно-буферним розчином та проводили субкультивування з метою культури клітин різних пасажів для досліджень.

Отримання нейральних стовбурових клітин kota здійснювали за власною методикою (Кладницька Л. В. і співавтори, 2016), яка передбачає культивування стовбурових клітин за присутності фрагментів нервової тканини.

Проводили підрахунок загальної кількості клітин, розраховували індекс проліферації, визначали життєздатність за фарбування трипановим синім (Strober, 2001). Отримані клітини різних культур фарбували гематоксилином Караці та еозином за Палпенгеймом, надавали їм морфологічну характеристику і визначали морфометричні параметри за допомогою інвертованого мікроскопа Axiovert (Carl Zeiss, Germany) з використанням програми Axiovision ImageJ 1.45 (США).

Розподіл стовбурових клітин культури жирової тканини та кісткового мозку за фазами клітинного циклу та визначення кількості клітин в стані апоптозу проводили методом цитофлуориметрії за використання ДНК-зв'язуючого барвника пропідіуму йодиду (Ormerod et al., 1998). Крім спонтанного апоптозу, визначали рівень індукованого апоптозу стовбурових клітин за культивування у поживному середовищі без додавання стимулюючих факторів.

Експресію антигенів визначали непрямим імуноцитохімічним методом (Глузман Д. Ф. і співавтори, 2000) з системою візуалізації Ultra Vision LP Value Detection system (Thermo-Scientific, США). Використовували моноклональні антитіла (мкАТ) фірми Thermo-Scientific, США: PCNA (клон PC10), Ki-67 (RB-9043-PO), β-катеніну (клон 15B8), bcl-2 (клон 100/D5), а також Е-кадгерину (клон EP700Y; Roche, США), N-кадгерину (клон 8C11; Biolegend, США); віментину (клон SP20; Abcam, США), нестину (клон 10C2; Sigma-Aldrich), актину (клон 1A4+SC5) і CD44 (156-3C11) фірми Diagnostic Biosystems, США. Результати реакції оцінювали методом гістохімічної оцінки H-score [Detre et al., 1995]. Також у культурах стовбурових клітин визначали експресію антигенів CD34, CD 90 і CD117 (BD Pharmingen, США) прямим флуоресцентним методом.

Визначення вмісту жирних кислот у стовбурових клітинах проводили методом газорідинної хроматографії. Екстракцію ліпідів проводили за Folch et al. (1957), приготування метилових ефірів жирних кислот – за Boateng et al. (2008). Суміш метилових ефірів жирних кислот аналізували на газовому хроматографі Trace GC Ultra з полум'яно-іонізаційним детектором з використанням капілярної колонки SPTM-2560 або CP Wax 58. Визначали оптимальний склад середовища кріоконсервування стовбурових клітин

культури жирової тканини за показниками життєздатності та проліферативно активності клітин.

Здатність стовбурових клітин до секреції біологічно активних речовин оцінювали за концентрацією інтерлейкіну 6 у культуральному середовищі, що визначали імуноферментним методом з використанням комерційних наборів (№ BMS213/2; Bender MedSystems GmbH, Austria) згідно інструкції виробника.

У **другій серії** досліджень *in vivo* для визначення системного впливу стовбурових клітин культури кісткового мозку та жирової тканини на стан інтактних тварин-реципієнтів було досліджено ваговий індекс і клітинність селезінки та тимусу за Гольдбергом та співавторами (1972), метаболічну активність перитонеальних макрофагів за спонтанним та стимульованим тестом з нітросинім тетразолієм (Park et al., 1968), активність сукцинатдегідрогенази в мітохондріях печінки (Ещенко Н., Вольский Г., 1968). Дослідження проводили на 2–3-місячних мишах лінії C57Bl/6 вагою 20–24 г. Для трансплантації використовували стовбурові клітини культури кісткового мозку або жирової тканини 4 пасажу. Стовбурові клітини у кількості 10^4 вводили в хвостову вену тварин у 0,5 мл фосфатно-буферного розчину. Контролем слугували миші, яким вводили в хвостову вену 0,5 мл 0,89 % розчину NaCl (плацебо), а також тварини, яким не проводили внутрішньовенних утручань (інтактні).

У **третьій серії** досліджень у системі *in vivo* моделювали пухлинний процес – метастазуючу карциному легені Льюїс та визначали вплив трансплантації алогенних мезенхімних стовбурових клітин на її розвиток. Клітини лінії карциноми легені Льюїс отримані з клітинного банку ліній тканин людини та тварин Інституту експериментальної патології, онкології та радіобіології імені Р. Є Кавецького НАН України. Клітини карциноми легені Льюїс культивували за стандартних умов. Самцям мишей лінії C57Bl/6 2–3-місячного віку, вагою 20–24 г, внутрішньом'язово в ділянці стегна інокулювали 1×10^6 клітин карциноми легені Льюїс. Тваринам першої групи додаткових маніпуляцій не проводили; другої групи – на 8 добу після інокуляції клітин карциноми Льюїс внутрішньовенно вводили $1,25 \times 10^4$ алогенних мезенхімних стовбурових клітин 4 пасажу; третьої групи – внутрішньовенно вводили розчин 0,89 % NaCl. На 18 та 24 добу досліду тварин піддавали евтаназії, зважували, вилучали і визначали масу первинної пухлини, кількість та об'єм метастазів у легенях. Для характеристики морфологічних особливостей пухлини та оточуючої м'язової тканини виготовляли гістологічні препарати. За допомогою методу протокової цитофлуориметрії визначали розподіл клітин первинної пухлини за фазами клітинного циклу, вміст анеуплоїдів та рівень апоптозу.

Одержані цифрові дані опрацьовано статистично з визначенням середньоарифметичної величини (M), її похибки (m). Достовірність різниці середніх значень встановлювали за критерієм Стюдента. Зміни показників вважали достовірними за $p < 0,05$ (у тому числі, $p < 0,01$ і $p < 0,001$). Коефіцієнт кореляції (r) розраховували методом Пірсона, також проводили однофакторний

дисперсійний аналіз отриманих результатів за допомогою прикладного програмного комплексу «Microsoft Office Excel 2016».

РЕЗУЛЬТАТИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ АНАЛІЗ

Отримання стовбурових клітин культури жирової тканини тварин.

Жирова тканина є альтернативним джерелом стовбурових клітин. Відібрали жирову тканину різної локалізації: підшкірну та більшого сальника і використали її у якості первинного матеріалу для отримання стовбурових клітин різними способами. Підшкірну жирову тканину в коня відбирали між ділянкою сідниці і коренем хвоста; в собак – в передпупковій ділянці вентральної черевної стінки, в мишей – в паховій ділянці (рис. 2).

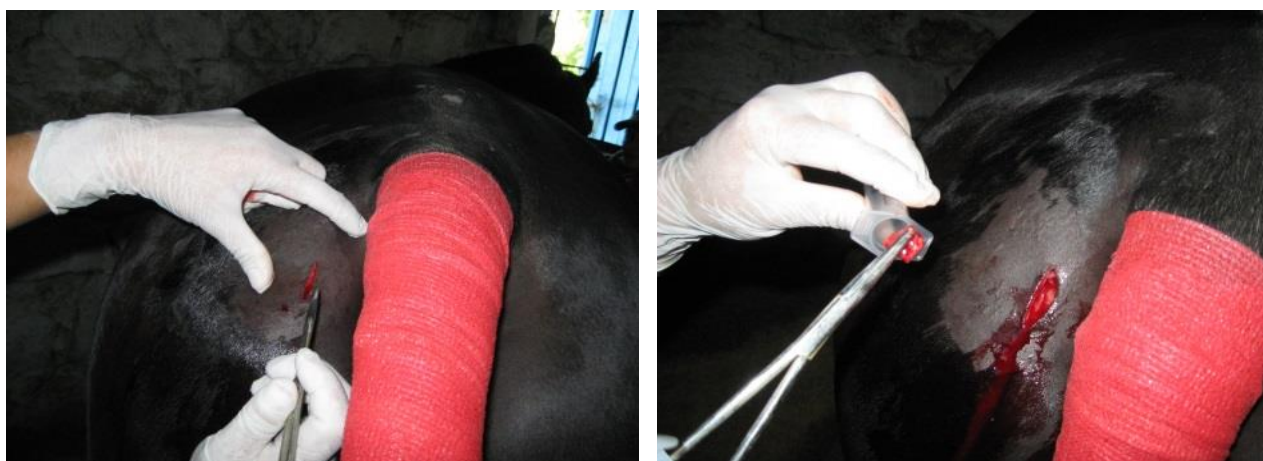


Рис. 2. Відбір підшкірної жирової тканини в коня між ділянкою сідниці і коренем хвоста

За запропонованого модифікованого методу експланта первинний матеріал подрібнювали ножицями на фрагменти розміром 1–3 мм³, які розміщували в культуральних чашках, накривали покривними скельцями, вносили 80–85 % середовища культивування Ігла, модифікованого Дюльбекко, 15–20 % фетальної сироватки телят, 1 % антибіотика-антимікотика. Первинний матеріал культивували за стандартних умов. На 2–3 добу культивування реєстрували адгезію стовбурових клітин до культурального посуду. На 5–6 добу культивування стовбурові клітини культури жирової тканини активно проліферували, що призводило до злиття колоній (рис. 3). На 10–12 добу культивування формувався моношар стовбурових клітин культури жирової тканини.

За конфлюентності моношару 70–90 % покривні скельця та фрагменти експланту механічно вилучали, культуру клітин промивали фосфатнобуферним розчином. Культивуванням отримували стовбурові клітини культури жирової тканини 2, 4, 7, 12 пасажів та досліджували їх морфологічні та функціональні властивості.

Отримання стовбурових клітин культури нервової тканини. Для отримання стовбурових клітин культури нервової тканини застосовували метод експланту в нашій модифікації. Первинний матеріал – підготовлену нервову

тканину головного мозку розділяли на фрагменти розміром 1–3 мм³, які розміщували в культуральних чашках, накривали покривними скельцями, вносили середовище культивування та культивували за стандартних умов у CO₂ інкубаторі за температури 37 °С, 5 % вмісту CO₂ та абсолютної вологості повітря.

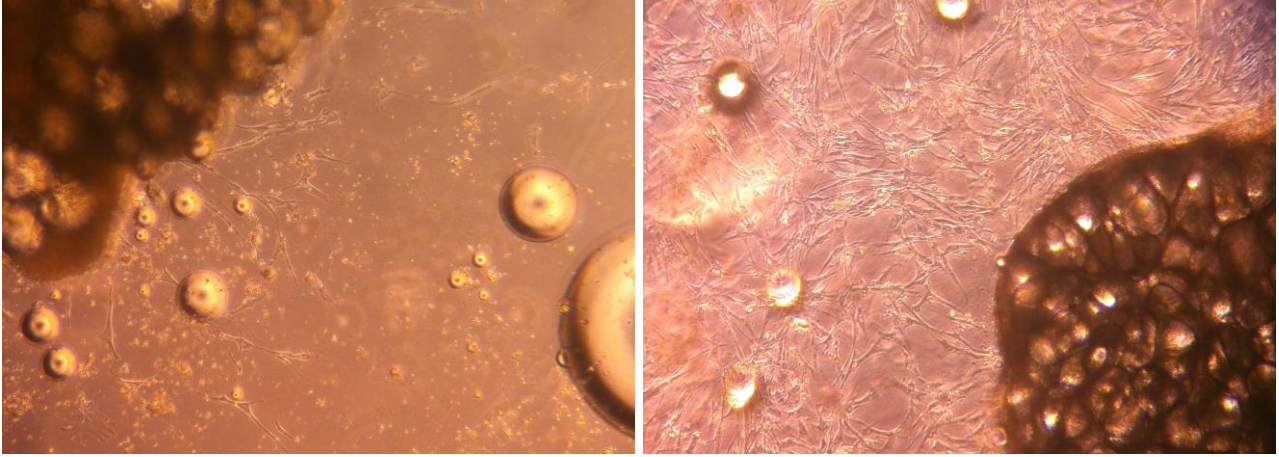


Рис. 3. Адгезія стовбурових клітин культури жирової тканини до культурального посуду та їх активна проліферація; нативний препарат, ×100

Кожну добу проводили візуалізацію прикріплення клітин до дна культурального посуду, оцінювали їх проліферацію, формування колоній, а також контролювали середовище культивування у чашках та раз на три доби повністю або частково замінювали його на свіже.

Вже на початкових етапах культивування спостерігали прикріплення до дна культурального посуду спочатку поодиноких клітин. На 5–6 добу культивування клітини культури нервової тканини активно проліферували, що призводило до злиття окремих колоній (рис. 4).

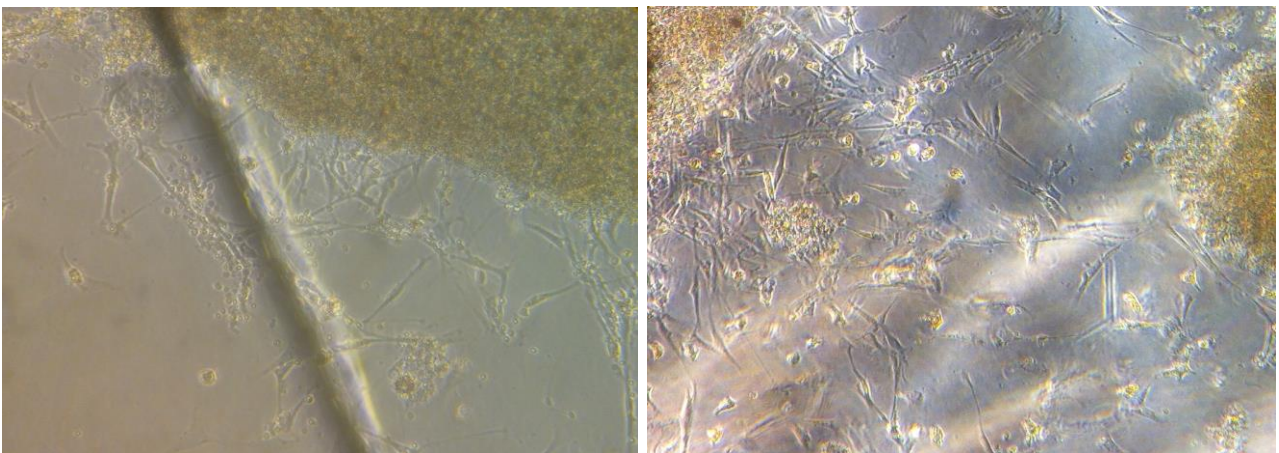


Рис. 4. Прикріплення поодиноких клітин культури нервової тканини до культурального посуду та їх проліферація навколо колонієформуючих одиниць; нативний препарат, ×100

На 10–12 добу культивування формувалася моношар стовбурових клітин культури нервової тканини. За формування моношару на 70–90 % покривні

скельця та фрагменти експланту механічно вилучали, клітини переводили в суспензію, промивали та здійснювали субкультивування для отримання культур різних пасажів.

Запропонований модифікований метод експланту культивування стовбурових клітин культури нервової тканини забезпечував уникнення пошкоджуючого механічного та хімічного впливу на клітини первинного матеріалу, збереження тканинних цитокінів і факторів росту та їх локальне надходження з фрагментів нервової тканини у середовище і тим створювалася необхідна концентрація, що мала вирішальне значення для адгезії та проліферації клітин, особливо у первинній культурі.

Функціональні показники стовбурових клітин культури підшкірної жирової тканини та більшого сальника залежно від умов обробки первинного матеріалу. Визначали функціональні показники стовбурових клітин за трьох способів обробки первинного матеріалу жирової тканини більшого сальника та підшкірної локалізації. А саме, ферментативної дезагрегації колагеназою типу II (група I), метод експланту (група II), метод експланту в нашій модифікації (група III) (табл. 1, 2).

Таблиця 1

Колонієутворююча активність стовбурових клітин культури підшкірної жирової тканини та більшого сальника залежно від умов обробки первинного матеріалу (шт., $M \pm m$, $n=6$)

Культура жирової тканини	Кількість колоній (4 доба культивування)		
	I група	II група	III група
Більшого сальника собаки	3,17±0,16*	5,17±0,16	8,67±0,2***^
Підшкірна собаки	1,83±0,16*	2,5±0,28	4,67±0,2***^
Підшкірна коня	2,83±0,16	2,0±0,01	5,16±0,1***^

Примітка. Достовірна різниця порівняно з II групою * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$; ^ $p < 0,05$ порівняно з першим дослідом

Таблиця 2

Функціональні показники стовбурових клітин культури підшкірної жирової тканини та більшого сальника залежно від умов обробки первинного матеріалу ($M \pm m$, $n=6$)

Культура жирової тканини	Умови обробки первинного матеріалу		
	I група	II група	III група
Кількість клітин, тис. (14 доба культивування)			
Більшого сальника собаки	501,5±14,2***	198,24±38,7	735,83±15,4***^
Підшкірна собаки	312,0±14,2***	152,83±6,82	492,0±21,3***^
Підшкірна коня	348,33±15,88	245,0±14,0	501,67±12,4***^
Життєздатність, % (14 доба культивування)			
Більшого сальника собаки	91,33±1,37**	96,33±0,81	98,17±0,31* ^
Підшкірна собаки	86,17±1,25	90,5±1,31	92,17±1,06*^
Підшкірна коня	89,67±0,75	92,33±1,18	96,67±0,50*^

Примітка. Достовірна різниця порівняно з II групою * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$; ^ $p < 0,05$, ^^ $p < 0,01$ порівняно з I групою

Встановлено, що застосування модифікованого методу експланту дозволяє отримати найбільшу кількість клітин з первинного матеріалу $735,83 \pm 15,41$ тис. ($p < 0,001$), які мають вищу життєздатність $98,17 \pm 0,31$ % ($p < 0,001$) та кількість колонієутворюючих одиниць $8,67 \pm 0,2$ ($p < 0,001$).

При порівнянні жирової тканини, відібраної з різних ділянок організму тварини, встановлено, що жирова тканина більшого сальника є джерелом стовбурових клітин з найвищими функціональними властивостями.

Встановлено, що оптимальним середовищем для кріоконсервування клітин культури жирової тканини була суміш 90 % фетальної сироватки телят та 10 % диметилсульфоксиду, що забезпечувало найбільшу збереженість, найкращу життєздатність та достовірно вищий індекс проліферації клітин при послідуєчому культивуванні *in vitro*.

Отримання та функціональна активність мезенхімних стовбурових клітин культури червоного кісткового мозку залежно від умов обробки та культивування первинного матеріалу. У серії досліджень визначено вплив градієнту щільності фіколу та середовищ культивування DMEM і RPMI на кількість отриманих мезенхімних стовбурових клітин, їх проліферативну активність та життєздатність при обробці первинного матеріалу. Встановлено, обробка первинного матеріалу шляхом центрифугування у градієнті щільності фіколу 1,074–1,076 забезпечує отримання найбільшої кількості клітин у культурі ($p < 0,01$), їх вищу життєздатність ($p < 0,05$) та проліферативну активність ($p < 0,01$, $p < 0,05$ відповідно).

Отримані стовбурові клітини різних пасажів культивування були досліджені на експресію антигенів CD34, CD90, CD117. На першому пасажі зареєстровано $15,42 \pm 0,05$ % при визначенні антигену CD34⁺; $15,68 \pm 0,04$ % – CD117⁺ та $12,21 \pm 0,03$ % – CD90⁺. Більшість клітин у культурі були негативними щодо експресії вказаних антигенів. Ми вважаємо, що це свідчить про існування в культурах клітин, різних за ступенем диференціювання та поліпотентності, тобто існування фракції стовбурових клітин та їх більш диференційованих нащадків.

На 4 пасажі культивування кількість CD34⁺ та CD117⁺ клітин достовірно знижувалася до $3,07 \pm 0,01$ ($p < 0,001$) та $4,11 \pm 0,02$ % відповідно ($p < 0,001$ та при порівнянні з клітинами першого пасажу). Тоді, як кількість CD90⁺ клітин зростала до $47,5 \pm 0,06$ % ($p < 0,001$). Таким чином, отримані результати підтвердили високий вміст CD90⁺ клітин та незначну кількість CD34⁺ і CD117⁺ клітин культури червоного кісткового мозку, на відміну від стовбурових клітин гемопоетичного походження.

Подібні дані було отримано за дослідження стовбурових клітин культури жирової тканини. Експресія антигенів на першому пасажі реєструвалася на 7–20 % МСК та становила $7,51 \pm 0,07$ % при визначенні антигену CD34⁺; $11,73 \pm 0,05$ % при визначенні антигену CD117⁺ і $20,71 \pm 0,03$ % при визначенні антигену CD90⁺. На четвертому пасажі культивуванні кількість CD34⁺ та CD117⁺ клітин достовірно знижувалася до $1,07 \pm 0,01$ ($p < 0,001$) та $3,11 \pm 0,02$ % ($p < 0,001$ при порівнянні з клітинами першого пасажу) відповідно. Тоді, як кількість CD90⁺ клітин зростала до $47,5 \pm 0,06$ % ($p < 0,001$).

Морфологічні показники мезенхімних стовбурових клітин культури кісткового мозку на ранніх та пізніх пасажах культивування та їх функціональна активність. Морфологія і функціональний стан стовбурових клітин культури червоного кісткового мозку змінювалися у процесі культивування, і реплікативне старіння починалося з четвертого пасажу (рис. 5).

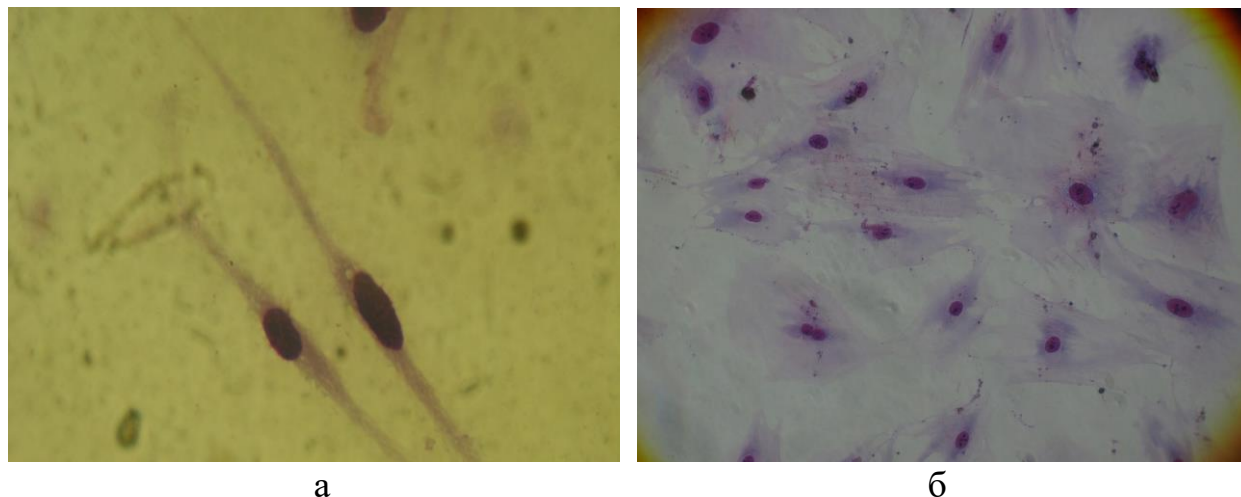


Рис. 5. Стівбурові клітини культури червоного кісткового мозку: а – 2 пасажу культивування; $\times 900$; б – 12 пасажу; $\times 400$. Фарбування за Папенгеймом

На перших пасажах культивування клітини мали веретеноподібну форму з двома довгими виростами цитоплазми, площею ядра $154,44 \pm 6,23$, площею клітини $749,34 \pm 21,16$, яка на пізніх – змінювалася на зірчасту з утворенням значної кількості виростів цитоплазми (подіїв), збільшенням площі клітин на 4 пасажі до $853,78 \pm 36,71$ ($p < 0,01$), на 12 до $2304,40 \pm 280,12 \mu\text{m}^2$ ($p < 0,001$) за рахунок цитоплазми (табл. 3).

Таблиця 3

Функціональна активність та морфологічні показники мезенхімних стовбурових клітин червоного кісткового мозку за різних пасажів культивування ($M \pm m$)

Параметр	Пасаж			
	2	4	7	12
Площа ядра, μm^2	$154,44 \pm 6,23$	$156,22 \pm 4,42$	$142,44 \pm 5,05$	$123,11 \pm 10,51^*$
Площа клітини, μm^2	$749,34 \pm 21,16$	$853,78 \pm 36,71^*$	$993,11 \pm 36,17^{***}$	$2304,40 \pm 280,12^{***}$
Ядерно-цитоплазмове співвідношення	$0,2598 \pm 0,0068$	$0,2262 \pm 0,0074^{**}$	$0,1682 \pm 0,0042^{***}$	$0,0608 \pm 0,0066^{***}$
Коефіцієнт проліферації	$3,5 \pm 0,2$	$3,1 \pm 0,3$	$2,6 \pm 0,2$	$2,1 \pm 0,2^*$
Життєздатність, %	$95,33 \pm 1,55$	$96,33 \pm 1,36$	$88,33 \pm 1,94^*$	$86,33 \pm 1,94^*$

Примітка. $^*p < 0,05$, $^{**}p < 0,01$, $^{***}p < 0,001$ порівняно з клітинами другого пасажу

Біля ядра візуалізувався комплекс Гольджі, що засвідчувало активний стан проліферуючих клітин. Щодо функціонального стану, знижувалася життєздатність клітин на 7 пасажі до $88,33 \pm 1,94$ % ($p < 0,01$) та їх стійкість до апоптозу, індукованого культивуванням у середовищі без додавання сироватки ($p < 0,01$).

На 4 пасажі зменшувався показник ядерно-цитоплазматичного співвідношення і становив $0,2262 \pm 0,0074$ ($p < 0,01$), на 12 пасажі більш, ніж у 4 рази до $0,0608 \pm 0,0066$ ($p < 0,001$) через збільшення площі цитоплазми клітини. У процесі культивування збільшувався вміст клітин у стані апоптозу, що проявляли чутливість до культивування без додавання ростових факторів на 7 та 12 пасажах та становив $20,67 \pm 1,55$ ($p < 0,01$) та $22,67 \pm 1,55$ % ($p < 0,01$) відповідно. Підвищення чутливості клітин до апоптозу прямо корелювало з індукованою відсутністю факторів росту $r = 0,81$ ($p < 0,01$). Встановлено пряму кореляційну залежність між кількістю пасажів та площею цитоплазми клітин з показником $r = 0,73$ ($p < 0,01$); та зворотною з показником ядерно-цитоплазматичного співвідношення $r = -0,87$ ($p < 0,001$).

Функціональні показники стовбурових клітин культури кісткового мозку характеризувалися зниженням коефіцієнту проліферації до $2,1 \pm 0,2$ ($p < 0,05$) та життєздатності клітин ($r = -0,70$; $p < 0,05$), збільшенням вмісту секретії ІЛ-6 у середовищі культивування стовбурових клітин – $158,73 \pm 2,53$ нг/мл ($p < 0,05$) у процесі культивування.

Розподіл мезенхімних стовбурових клітин червоного кісткового мозку різних пасажів культивування за фазами клітинного циклу. Ранні пасажі стовбурових клітин культури червоного кісткового мозку характеризувалися абсолютним вмістом диплоїдних клітин, що засвідчує сталість їх каріотипу. Кількість диплоїдних клітин знижувалась на 12 пасажі і становила $97,89 \pm 0,43$ % ($p < 0,05$) та, відповідно, з'являлися анеуплоїдні клітини.

Розподіл мезенхімних стовбурових клітин червоного кісткового мозку за фазами клітинного циклу характеризувався поступовим зменшенням кількості клітин у фазах G_2/M і S вже на 7 пасажі до $20,33 \pm 1,27$ % ($p < 0,01$) (табл. 4).

Таблиця 4

Розподіл мезенхімних стовбурових клітин червоного кісткового мозку різних пасажів культивування за фазами клітинного циклу ($M \pm m$, $n=3$)

Пасаж	G_0/G_1	S	G_2/M	$G_2/M + S$
2	$70,67 \pm 2,70$	$16,46 \pm 1,13$	$12,87 \pm 0,99$	$29,33 \pm 0,19$
7	$79,67 \pm 0,84^*$	$12,77 \pm 0,69^*$	$7,56 \pm 0,59^{**}$	$20,33 \pm 1,27^{**}$
12	$86,10 \pm 2,29^*$	$8,20 \pm 0,63^{**}$	$5,70 \pm 0,83^{**}$	$13,90 \pm 1,40^{***}$

Примітка. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ порівняно з клітинами 2 пасажу

Морфологічні показники мезенхімних стовбурових клітин культури жирової тканини на ранніх та пізніх пасажах культивування та їх функціональна активність. Стовбурові клітини культури жирової тканини змінювали свою морфологію і функціональний стан у процесі

культивування, що засвідчувало перші ознаки реплікативного старіння з 7 пасажу. Зміни характеризувалися наступним: на перших пасажах культивування клітини мали веретеноподібну форму з двома, трьома довгими виростами цитоплазми, площею ядра $161,11 \pm 5,65$, площею клітини $759,56 \pm 28,42 \mu\text{m}^2$ (рис. 6).

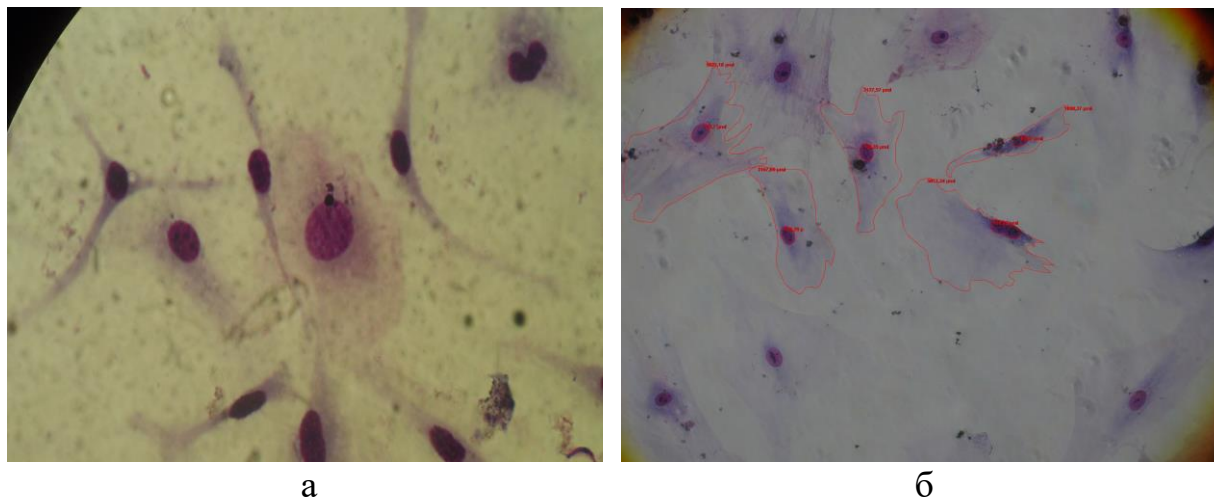


Рис. 6. Мезенхімні стовбурові клітини культури жирової тканини: а – 2 пасажу культивування; $\times 900$; б – 12 пасажу; $\times 400$. Фарбування за Папенгеймом

На пізніх пасажах форма клітин змінювалася на зірчасту з утворенням значної кількості виростів цитоплазми (подіїв), зменшенням площі ядра на 12 пасажі до $135,78 \pm 11,21$ ($p < 0,001$) та збільшенням площі клітин до $1416,90 \pm 151,97 \mu\text{m}^2$ ($p < 0,001$) за рахунок цитоплазми; біля ядра візуалізувався комплекс Гольджі, що засвідчував активний стан проліферуючих клітин (табл. 5).

Таблиця 5

Функціональна активність та морфологічні показники стовбурових клітин культури жирової тканини за різних пасажів культивування ($M \pm m$)

Параметр	Пасаж			
	2	4	7	12
Площа ядра, μm^2	$161,11 \pm 5,65$	$161,56 \pm 5,48$	$151,67 \pm 3,51$	$135,78 \pm 11,21^*$
Площа клітини, μm^2	$759,56 \pm 28,42$	$748,11 \pm 25,90$	$841,56 \pm 46,96$	$1416,90 \pm 151,97^{***}$
Ядерно-цитоплазмове співвідношення	$0,2689 \pm 0,0046$	$0,2756 \pm 0,0042$	$0,2189 \pm 0,0122^{**}$	$0,1111 \pm 0,0086^{***}$
Коефіцієнт проліферації	$2,92 \pm 0,02$	$3,02 \pm 0,03$	$2,79 \pm 0,09$	$2,55 \pm 0,01^{***}$
Життєздатність, %	$96,33 \pm 1,36$	$96,67 \pm 0,97$	$93,67 \pm 0,97$	$84,67 \pm 1,36^*$

Примітка. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ у порівнянні з 2 пасажем

Знижувалася життєздатність клітин на 12 пасажі до $84,67 \pm 1,36$ % ($p < 0,01$) та їх стійкість до апоптозу, індукованого культивуванням у середовищі без додавання сироватки. З 7 пасажу достовірно зменшувався показник ядерно-

цитоплазматичного співвідношення і становив $0,2189 \pm 0,0122$ ($p < 0,01$), а на 12 пассажі – більш, ніж у два рази – $0,1111 \pm 0,0086$ ($p < 0,001$) через достовірне збільшення площі цитоплазми клітини. Треба зазначити, що збільшувався вміст клітин у стані апоптозу, що проявляли чутливість до безсироваткового культивування на 7 та 12 пассажах з показниками $21,33 \pm 1,36$ ($p < 0,05$) та $23,67 \pm 0,97$ % ($p < 0,05$) відповідно.

Розподіл мезенхімних стовбурових клітин культури жирової тканини за фазами клітинного циклу за різних пассажів культивування. Культури мезенхімних стовбурових клітин на перших пассажах не мали абсолютного вмісту диплоїдних клітин, їх кількість становила $98,45 \pm 0,39$ % ($p < 0,05$ у порівнянні з клітинами культури кісткового мозку). На 12 пассажі їх кількість достовірно знижувалася до $96,51 \pm 0,38$ % ($p < 0,05$).

Як бачимо з табл. 6 кількість клітин проліферативного пулу на ранніх пассажах була високою і становила $29,51 \pm 3,56$ %.

Таблиця 6

Розподіл диплоїдних мезенхімних стовбурових клітин культури жирової тканини за фазами клітинного циклу за різних пассажів культивування, % ($M \pm m$, $n=9$)

Пасаж	Вміст диплоїдів	G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M	G ₂ /M + S
2	$98,45 \pm 0,39$	$70,49 \pm 3,17$	$20,58 \pm 1,94$	$8,93 \pm 1,63$	$29,51 \pm 3,56$
7	$98,28 \pm 0,56$	$73,52 \pm 5,01$	$17,43 \pm 0,91$	$9,05 \pm 1,16$	$26,15 \pm 0,29$
12	$96,51 \pm 0,38^*$	$81,07 \pm 0,61^*$	$13,42 \pm 0,82^*$	$5,5 \pm 0,52$	$18,93 \pm 0,66^*$

Примітка. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ порівняно з показниками 2 пассажу

Достовірне зниження кількості клітин проліферативного пулу до $18,93 \pm 0,66$ % ($p < 0,05$) зареєстрували на 12 пассажі культивування. Це засвідчувало на користь реплікаційного старіння культур та обумовлювало доцільність використання у подальших експериментах стовбурових клітин культури жирової тканини та кісткового мозку на ранніх етапах культивування.

Експресія антигенів стовбуровими клітинами культури жирової тканини за різних пассажів культивування. Експресія антигенів поверхневих мембран була визначена імуноцитохімічним методом в стовбурових клітинах культури жирової та нервової тканин. Отримані дані були близькими, хоча спостерігався нижчий рівень експресії в стовбурових клітинах культури нервової тканини (табл. 7, 8).

Визначено високу експресію віментину, актину (відображував рухову здатність, активні процеси прикріплення до пластику і формування моношару), антигенів PCNA і Ki-67 як маркерів високого рівня проліферативної активності (рис. 7, 8).

Характерною особливістю була експресія антигену CD44, що співпадає з даними інших авторів. Антиген CD44 бере участь у міжклітинній взаємодії як рецептор гіалуронової кислоти, що індукує активацію внутрішньоклітинних кіназ, сприяє проліферації, спрямовує хомінг та міграцію стовбурових клітин.

**Експресія антигенів стовбуровими клітинами
культури жирової тканини (M±m, n=3, бали)**

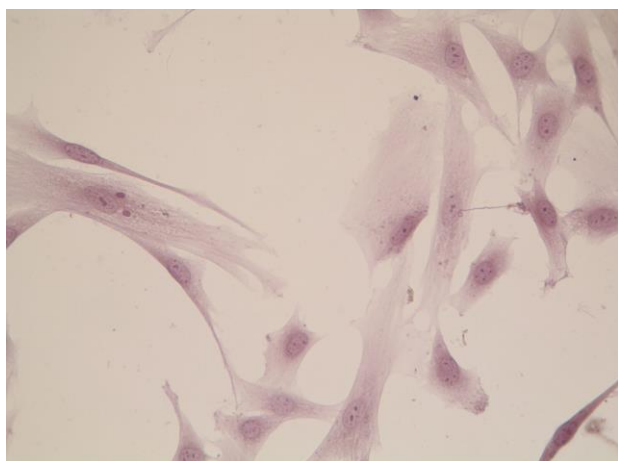
Антиген	4 пасаж	10 пасаж
Маркери проліферативної активності		
PCNA	275,0±9,0	208,0±11,0**
Ki-67	299,0±1,0	251,0±12,0*
Білки цитоскелету та міжклітинної адгезії		
Е-кадгерин	298,3±9,7	223,0±15,68**
N-кадгерин	0	0
β-катенін	98,0±9,0	64,0±4,0**
CD44	76,3±3,1	25,3±1,9*
Віментин	265,7±20,7	189±13,4*
Актин	299,0±0,58	261,3±10,8*
Апоптоз-асоційовані маркери		
Bcl-2	103,67±6,78	66,67±5,03*

Примітка. *p<0,05; **p<0,01 у порівнянні з 4 пасажем

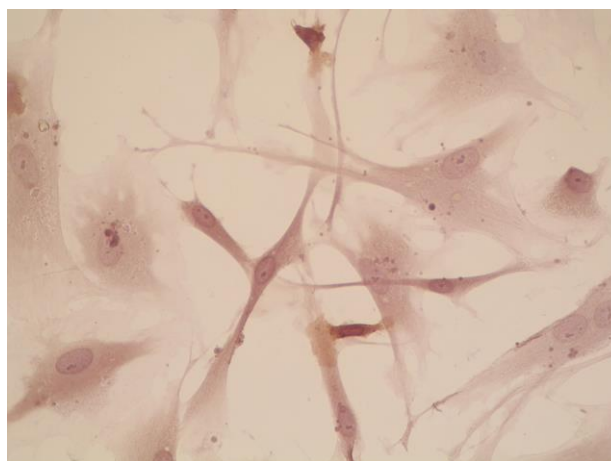
**Експресія антигенів стовбуровими клітинами
культури нервової тканини (M±m, n=3, бали)**

Антиген	2 пасаж	4 пасаж
Е-кадгерин	122,3±10,1	113,2±9,7
N-кадгерин	84,0±7,6	82,0±5,1
β-катенін	73,0±1,6*	57,0±2,1
CD44	76,0±1,6**	38,1±1,3
Віментин	299,07±2,6*	178,2±3,4
Актин	130,7±16,7*	98,3±2,8
PCNA	96,0±6,6	74,2±4,1

Примітка. *p<0,05; **p<0,01 у порівнянні з 4 пасажем



а



б

Рис. 7. Експресія PCNA стовбуровими клітинами культури жирової тканини собаки: а – контроль, б – PCNA-позитивні клітини, ×400

Наявність сумісної експресії β -катеніну та кадгеринів (E-кадгерину в стовбурових клітинах жирової тканини та E- і N-кадгеринів в стовбурових клітинах нервової тканини) свідчило про активний стан Wnt/ β -катенін сигнального шляху в них. Високий рівень експресії анти-апоптичного білка Bcl-2 на ранніх і зниження її на пізніх етапах культивування стовбуровими клітинами культури жирової тканини відображував зміни в чутливості клітин до індукції апоптозу.

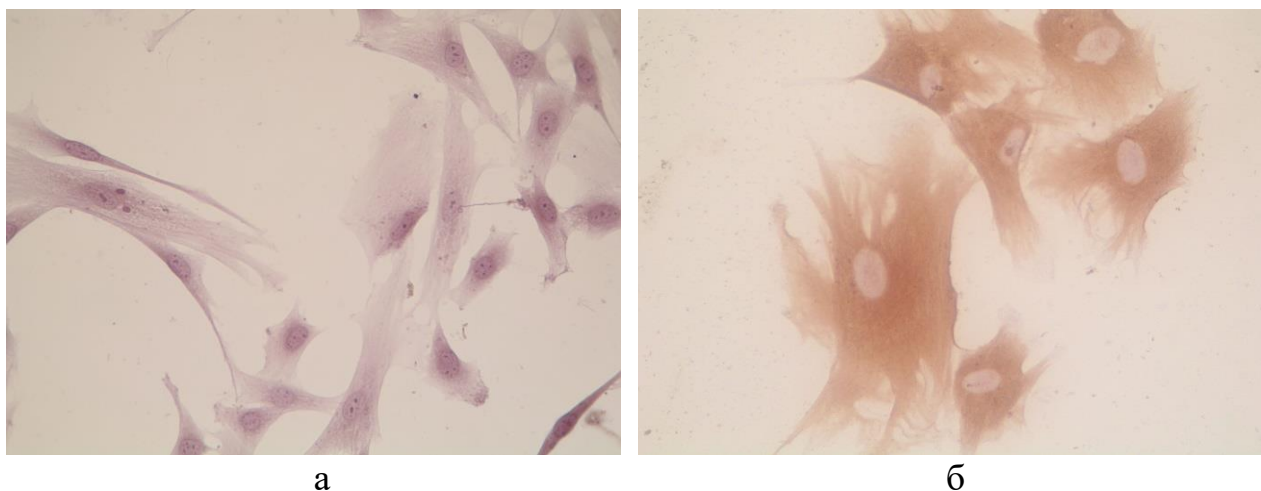


Рис. 8. Експресія віментину стовбуровими клітинами культури нервової тканини kota: а – контроль, б – віментин-позитивні клітини, $\times 400$

Вміст жирних кислот у ліпідах стовбурових клітин культури червоного кісткового мозку, жирової та нервової тканин. Вміст окремих насичених жирних кислот у ліпідах зростав у ряду в наступному порядку: C8:0 < C15:0 < C6:0 < C10:0 < C12:0 < C14:0 < C18:0 < C16:0 стовбурових клітин культури жирової та нервової тканин та в іншій послідовності у клітинах культури червоного кісткового мозку C15:0 < C8:0 < C6:0 < C10:0 < C12:0 < C18:0 < C14:0 < C16:0 (табл. 9).

У культурах стовбурових клітин різного походження переважали насичені жирні кислоти в діапазоні від C6:0 до C18:0. Співвідношення насичених і ненасичених жирних кислот становило 1,85; 1,91 та 2,1 у стовбурових клітинах культури кісткового мозку, жирової та нервової тканини відповідно.

З групи насичених жирних кислот переважала пальмітинова кислота. Насичені жирні кислоти C20:0, C22:0 і C24:0 не визначалися. Аналогічні дані отримали Tigistu-Sahle et al. (2017) при дослідженні стовбурових клітин культури кісткового мозку людини і зробили висновок про їх нездатність до подовження ланцюга насичених жирних кислот.

Основною моноеновою кислотою була олеїнова. За даними різних авторів, наявність в клітинах олеїнової кислоти асоційована з високою проліферативною активністю та резистентністю до індукції апоптозу (Fillmore et al, 2015; Mancini et al, 2018), здатністю до синтезу факторів росту судин при подальшому диференціюванні (Doronzo et al, 2013).

Вміст жирних кислот у ліпідах стовбурових клітин культури кісткового мозку, жирової та нервової тканин ($M \pm m$, $n=3$, %)

Жирна кислота	Масова частка жирної кислоти у стовбурових клітинах культури		
	кісткового мозку	жирової тканини	нервової тканини
Капронова, C8:0	1,36±0,01	1,26±0,02	1,21±0,05
Пентадеканова, C15:0	1,27±0,01	1,51±0,02	1,51±0,01
Масляна, C6:0	2,22±0,02	2,08±0,01	1,87±0,05
Капрінова, C10:0	2,90±0,01	2,76±0,01	2,28±0,08
Лауринова, C12:0	3,20±0,02	3,08±0,01	3,07±0,08
Міристинова, C14:0	10,92±0,06	10,18±0,04	9,88±0,06
Стеаринова, C18:0	10,59±0,07	11,12±0,07*	13,45±0,06*
Пальмітинова, C16:0	32,46±0,05	33,70±0,02*	34,53±0,58*
Пальмітолеїнова, C16:1n9c	1,58±0,01	2,02±0,01*	2,04±0,04*
Олеїнова, C18:1n9c	23,15±0,05	21,63±0,03*	20,20±0,93*
Гондоїнова, C20:1n9c	0,99±0,01	0,81±0,01	0,95±0,05
Лінолева, C18:2n6c	8,51±0,04	6,45±0,07*	6,27±0,01*
Ейкозадієнова, C20:2n6	0,06±0,01	0,04±0,01	0,05±0,01
Дігомоліноленова, C20:3n6	0,01±0,00	0,06±0,01	0,03±0,01
Докозадієнова, C22:2n6	0,12±0,01	0,31±0,01	0,52±0,00
Ейкозатрієнова, C20:3n3	0,31±0,01	0,69±0,02	0,55±0,03
Докозапентаєнова, C22:5n3	0,25±0,02	1,49±0,01*	1,07±0,06*
Докозагексаєнова, C22:6n3	0,15±0,01	0,86±0,04*	0,58±0,01*

Примітка. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ порівняно з масовою часткою жирної кислоти стовбурових клітин культури кісткового мозку

Співвідношення ненасиченої лінолевої до насиченої стеаринової кислоти (C18:1/C18:0), яке відображує активність фермента стеарол-СоА десатурази, було високим 1,5–2,18, значно перевищувало показник, типовий для сироватки крові тварин і людини (який у середньому становить 0,8), і наближувалося до показників, характерних для мезенхімних стовбурових клітин культури кісткового мозку людини – 1,6 (Attie et al., 2002; Montazersaheb et al., 2018).

Висока активність стеарол-СоА десатурази була обумовлена активацією Wnt/ β -катенін сигнального шляху (Lai et al., 2017; Torres et al., 2019) і це узгоджувалося з результатами імуноцитохімічного дослідження щодо активного стану Wnt/ β -катенін сигнального шляху в стовбурових клітинах.

Поліненасичені, або полієнові, жирні кислоти групи $\omega 6$ та $\omega 3$ відносяться до незамінних. Клітини тварин і людини не можуть синтезувати їх з простих речовин, хоча здатні до утворення довгих форм із коротко-ланцюгового попередника. У зразках стовбурових клітин у достатній кількості була присутня лінолева кислота (C18:2n6c), яка може виступати як субстрат для синтезу *de novo*, однак вміст проміжних форм шляху метаболічного перетворення лінолевої кислоти був незначним, а кінцеві продукти (арахідонова, C20:4n6, і докозататраєнова кислота, C22:4n6) були відсутні. Ці дані свідчать про відсутність синтезу *de novo* у стовбурових клітинах.

При утворенні $\omega 3$ жирних кислот первинний метаболіт альфа-ліноленова кислота (C18:3n3c) перетворюється в докозапентаєнову (C22:5n3) і докозагексаєнову (C22:6n3) кислоти. Виявили ці кислоти в більшій кількості в стовбурових клітинах культури жирової та нервової тканини, але не кісткового мозку (табл. 10).

Таблиця 10

**Сумарний вміст насичених, ненасичених жирних кислот,
 $\omega 3$ та $\omega 6$ у ліпідах стовбурових клітин (M \pm m, n=3, %)**

Жирна кислота	Масова частка жирної кислоти у стовбурових клітин культури		
	кісткового мозку	жирової тканини	нервової тканини
Сума (Σ) НЖК	64,88 \pm 0,02	65,65 \pm 0,02	67,75 \pm 0,02*
Σ ННЖК	35,12 \pm 0,02	34,35 \pm 0,02	32,25 \pm 0,02*
НЖК + ННЖК	100,00	100,00	100,00
Σ Моноєнові ННЖК	25,71 \pm 0,02	24,46 \pm 0,02*	23,19 \pm 0,02*
Σ Полієнові ННЖК	9,41 \pm 0,02	9,89 \pm 0,02	9,06 \pm 0,02
НЖК/ННЖК	1,85	1,91	2,10
$\omega 3/\omega 6$	0,08	0,46	0,35
$\omega 3$	0,71 \pm 0,02	3,04 \pm 0,02*	2,23 \pm 0,02*
$\omega 6$	8,7 \pm 0,02	6,86 \pm 0,02*	6,87 \pm 0,02*

Примітка. НЖК – насичені жирні кислоти; ННЖК – ненасичені жирні кислоти; *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001 у порівнянні з показниками зразків стовбурових клітин кісткового мозку

Крім того, сумарний вміст $\omega 3$ жирних кислот у ліпідах стовбурових клітин жирової та нервової тканин був достовірно вищим (p<0,05), а співвідношення $\omega 3$ і $\omega 6$ – достовірно нижчим порівняно зі стовбуровими клітинами культури кісткового мозку (p<0,05). Пов'язуємо це з особливостями отримання стовбурових клітин культури жирової і нервової тканин – культивуванням у присутності фрагментів тканин, які багаті на зазначені жирні кислоти.

Вплив алогенних мезенхімних стовбурових клітин культури кісткового мозку та жирової тканини на інтактних тварин-реципієнтів. За системного введення стовбурових клітин культури кісткового мозку та жирової тканини на 7 добу експерименту спостерігали значне збільшення відносної ваги тимусу та його клітинності, які достовірно перевищували показники групи інтактних тварин та плацебо на всіх термінах спостереження (табл. 11).

Провели порівняння впливу стовбурових клітин культури червоного кісткового мозку та жирової тканини на функціональний стан імунних органів. Отже, на 7 добу спостереження показники вагового індексу та клітинності тимусу за впливу стовбурових клітин культур кісткового мозку та жирової тканини не мали достовірних відмінностей. На 18 добу експерименту за введення стовбурових клітин культури кісткового мозку ваговий індекс тимусу і клітинність органа були достовірно вищими (p<0,05 та p<0,05

відповідно), ніж за введення стовбурових клітин культури жирової тканини. На 25 добу спостереження розбіжностей не виявлено.

Таблиця 11

**Вміст лімфоїдних клітин у тимусі та селезінці мишей C57Bl/6
за введення аlogenних стовбурових клітин культури кісткового мозку
та жирової тканини ($M \pm m$, $n=9$)**

Група тварин	Доба спостереження, тимус			Доба спостереження, селезінка		
	7	18	25	7	18	25
Інтактні	1,4±0,1	1,4±0,1	1,7±0,1	2,7±0,1	2,7±0,1	2,7±0,1
0,89 % NaCl	1,9±0,2	1,3±0,1	1,4±0,1	2,9±0,1	2,8±0,4	2,5±0,1
МСК КМ	2,5± 0,3** ^v	2,9± 0,1*** ^{vvv}	2,5± 0,2** ^{vv}	3,4± 0,1** ^v	3,4± 0,1* ^v	1,9± 0,2* ^v
МСК ЖТ	2,7± 0,1* ^v	2,2± 0,1* ^{v&}	2,6± 0,3** ^{vv}	3,6± 0,1** ^v	3,2± 0,1* ^v	2,9± 0,2

Примітка. МСК КМ – мезенхімні стовбурові клітини кісткового мозку; МСК ЖТ – мезенхімні стовбурові клітини жирової тканини; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ порівняно з показниками інтактних тварин; ^v $p < 0,05$, ^{vv} $p < 0,01$; ^{vvv} $p < 0,001$ порівняно з показниками тварин групи плацебо; & $p < 0,05$ порівняно з показниками тварин за введення стовбурових клітин червоного кісткового мозку

Аналогічні процеси відбувалися і в тканині селезінки. За впливу стовбурових клітин культури кісткового мозку та жирової тканини 7 та 18 добу спостереження ваговий індекс зростав ($p < 0,05$) порівняно з інтактними тваринами і групи плацебо, однак, на 25 добу спостереження – достовірно знижувався ($p < 0,01$). За введення стовбурових клітин культури кісткового мозку індекс маси селезінки і клітинність органа на 25 добу були достовірно нижчими за контрольні значення.

Таким чином, стовбурові клітини культури кісткового мозку і жирової тканини мають однаковий за спрямованістю вплив на імунну систему реципієнтів (первинна активація і наступне повернення до контрольних показників), однак, розрізняються за інтенсивністю впливу на окремі ланки імунної системи. Стовбурові клітини культури кісткового мозку були більш активні по відношенню до тимусу (Т-клітинний імунітет), а жирової тканини мали більш виразний вплив на селезінку як центральний орган В-ланки імунітету. У експерименті антигенний спектр тварин донорів і реципієнтів стовбурових клітин був однаковим, і навіть, за наявності антигенних розбіжностей стовбурові клітини нездатні викликати повноцінну імунну відповідь (Najar et al., 2014). Тому розцінюємо виявлені зміни як наслідок міграції стовбурових клітин у тимус та селезінку: активуючий вплив у перший період після трансплантації (достовірні зміни виникали завдяки індукції хомінгу лімфоцитів і дії жирних кислот $\omega 3$ групи) та прояв імуносупресивних властивостей стовбурових клітин в подальшому (підвищення секреції ІЛ-6). Баланс активуючих та імуносупресорних факторів пояснює динаміку змін імунних органів тварин-реципієнтів стовбурових клітин, а також деякі

розбіжності впливу стовбурових клітин різного походження – культури кісткового мозку та жирової тканини.

При визначенні маркерного ферменту мембран мітохондрій гепатоцитів в групах експериментальних тварин було показано підвищення активності сукцинатдегідрогенази за впливу стовбурових клітин культури жирової тканини в 1,3 та кісткового мозку в 1,2 раза порівняно з групою інтактних тварин. На 12 добу дослідження активність сукцинатдегідрогенази в тварин, яким вводили стовбурових клітин культури жирової тканини, становила $57,7 \pm 1,6$ мкмоль $K_3[Fe(CN)_6]/mg \cdot xв$ ($p < 0,001$), що достовірно вище за показники інтактних тварин і групи плацебо $45,9 \pm 0,7$ та $43,3 \pm 1,2$ мкмоль $K_3[Fe(CN)_6]/mg \cdot xв$ відповідно. Активність сукцинатдегідрогенази мітохондрій печінки в тварин, яким вводили стовбурові клітин культури кісткового мозку, була також достовірно вищою за показники контрольних груп і становила $53,3 \pm 1,4$ мкмоль $K_3[Fe(CN)_6]/mg \cdot xв$ ($p < 0,01$). Не виключаємо, що зміни активності сукцинатдегідрогенази можуть бути пов'язані з мітохондріальним транспортом від трансплантованих стовбурових клітин до клітин печінки тварин-реципієнтів за трансплантації стовбурових клітин культури жирової тканини та кісткового мозку.

З метою визначення впливу стовбурових клітин не тільки на органи лімфоцитогенезу, але і на макрофаги як центральну ланку системи вродженого імунітету, дослідили стан окиснювальних реакцій за НСТ-тестом. Вихідні показники оксигензалежної реактивності перитонеальних макрофагів засвідчили достовірне підвищення ($p < 0,001$) їх спонтанної активності порівняно з контролем.

Характер росту трансплантованої карциноми легені Льюїс у мишей лінії C57Bl/6 за впливу алогенних мезенхімних стовбурових клітин. Активний ріст і поява перших метастазів у легенях інокульованої карциноми легені Льюїс спостерігалися, починаючи з 8 дня трансплантації. На 18 добу показник маси первинної пухлини в мишей за впливу мезенхімних стовбурових клітин становив $2,57 \pm 0,21$ г ($p < 0,05$ у порівнянні з тваринами контрольної групи і плацебо).

На 18 добу метастази у легенях були виявлені в тварин усіх груп. Загальний об'єм метастазів був достовірно вищим за впливу стовбурових клітин і становив $41,52 \pm 7,9$ мм³ ($p < 0,05$). Однофакторним дисперсійним аналізом встановлено високу силу впливу на показники загального об'єму метастазів $\eta^2 x = 0,74$ ($p < 0,05$) за трансплантації алогенних мезенхімних стовбурових клітин (табл. 12).

У мишей за впливу алогенних мезенхімних стовбурових клітин було виявлено більшу кількість метастазів у легені діаметром 1,0–3,0 мм, водночас, у тварин контрольних груп більшість метастазів була діаметром до 1 мм. Сумарна кількість метастазів діаметром 1,0–3,0 мм у тварин за впливу стовбурових клітин становить 52,4 %, тоді як у тварин-пухлиноносіїв контрольних груп цей показник був нижчим і становив 31,4 % ($p < 0,05$) у контрольній групі та 28,6 % ($p < 0,05$) – плацебо.

Загальний об'єм метастазів у мишей C57BL/6 з трансплантованою карциномою легені Льюїс (M±m, n=8; мм³)

Доба	LLC	LLC + МСК	LLC + 0,89 % NaCl
18	10,28±0,85	29,62±6,50* [^]	9,68±0,95
24	17,94±6,59	41,52±7,9* [^]	16,43±5,32

Примітка. LLC – група мишей, яким трансплантували карциному легені Льюїс; LLC+МСК – група мишей, яким трансплантували карциному легені Льюїс і ввели алогенні мезенхімальні стовбурові клітини; LLC+0,89 % NaCl – група мишей, яким трансплантували карциному легені Льюїс і ввели 0,89 % розчин NaCl; *p<0,05 у порівнянні з групою LLC, ^p<0,05 у порівнянні з групою тварин LLC+0,89 % NaCl

Таким чином, за впливу алогенних мезенхімних стовбурових клітин в мишей з трансплантованою карциномою легені Льюїс пухлинний процес швидше переходить у васкулярну стадію, що є підтвердженням підвищення рівня злоякісності останнього. Більш агресивний характер росту карциноми Льюїс був підтверджений результатами гістологічного дослідження скелетної м'язової тканини, ураженої клітинами карциноми легені Льюїс (рис. 9). У цілому за впливу стовбурових клітин отримано ознаки більш інтенсивного метастазування з продовження та гематогенного метастазування. Новоутворена пухлина при застосуванні стовбурових клітин містила атипові клітини з інтенсивно базофільною цитоплазмою і не мала будь-якої виразної строми, що є свідченням високого ступеня її анаплазії і злоякісності. У первинній пухлинній тканині встановлено осередки девіталізації, клітини у стані дистрофії, з каріорексисом та каріолізисом, ділянки некрозу, оточені дегенеративно зміненими пухлинними клітинами, в 1,3 раза більшу щільність судин на одиницю площі, в яких виявлено гемостаз за типом сладжу еритроцитів.

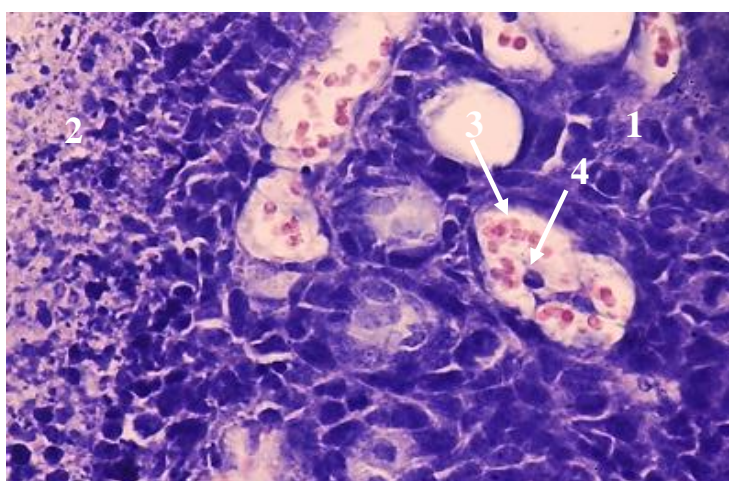


Рис. 9. Периферична частина пухлини на 18 добу при застосуванні стовбурових клітин: 1 – клітини пухлини; 2 – некроз клітин пухлини; 3 – кровоносна судина; 4 – клітина пухлини в просвіті кровоносної судини. Фарбування: гематоксилін Караці, еозин, ×400

Ще однією особливістю за впливу мезенхімних стовбурових клітин на організм мишей з трансплантованою карциномою легені Льюїс було збільшення кількості лімфоїдних клітин, асоційованих з пухлиною, які (за даними Palazon et al., 2017) беруть участь у активації ангиогенезу в пухлинній тканині як продуценти фактору росту ендотелію судин (VEGF) (табл. 13).

Таблиця 13

**Показники кількості пухлиноасоційованих лімфоцитів,
×10⁶/г пухлинної тканини (M±m, n=8)**

Група тварин	Кількість лімфоцитів
LLC	1,83±0,35
LLC + МСК	2,72±0,11* ^v
LLC + 0,89 % NaCl	1,79±0,29

Примітка. *p<0,05 відносно показників тварин контрольної групи; ^vp<0,05 порівняно з показниками тварин групи плацебо

Застосування аlogenних мезенхімних стовбурових клітин культури кісткового мозку в мишей C57BL/6 з трансплантованою метастатичною карциномою легені Льюїс призводило до порушення механізмів запрограмованої загибелі клітин первинної пухлини через зниження апоптозу до 41,82±1,37 % (p<0,001), $\eta^2_x=0,88$ (p<0,001), що засвідчує активізацію пухлинного процесу.

Вплив мезенхімних стовбурових клітин на генетичну стабільність та проліферативну активність клітин первинної пухлини в тварин з перещепленою карциномою легені Льюїс. Одним з механізмів набуття більш анапластичного фенотипу і злоякісного перебігу карциноми Льюїс за дії стовбурових клітин є індукція генетичної нестабільності в пухлинних клітинах. Встановлено, що за дії стовбурових клітин підвищувався рівень анеуплоїдії (p<0,001) клітин первинної пухлини та збільшувався проліферативний пул (p<0,05) анеуплоїдних клітин. Водночас, виявлено і різке зменшення проліферативного пулу серед диплоїдних клітин (p<0,001) (табл. 14).

Таблиця 14

**Вміст анеуплоїдів та розподіл клітин тканини первинної пухлини
за фазами клітинного циклу (M±m, n=8)**

Клітина	Вміст клітин, %	Фаза клітинного циклу			
		G ₀ /G ₁	G ₂ /M	S	G ₂ /M+ S
LLC					
Диплоїди	40,80±0,80	76,65±3,45	16,13±1,28	7,22±2,23	23,35±3,45
Анеуплоїди	59,20±0,80	43,82±2,89	10,58±0,05	45,59±2,90	56,17±2,90
LLC+ МСК					
Диплоїди	23,32±1,99***	93,18±2,01**	6,70±1,95**	0,12±0,09**	6,86±2,02***
Анеуплоїди	76,68±1,99***	31,98±3,42*	13,42±0,37**	54,59±3,31	68,02±3,42*

Примітка. *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001 відносно показників тварин контрольної групи

За дії мезенхімних стовбурових клітин встановлено зміну чутливості клітин первинної пухлини до апоптозу: відсоток апоптотичних клітин знизився в 1,4 раза і становив $41,82 \pm 1,37$ % ($p < 0,001$) проти $56,59 \pm 0,92$ % у тварин контрольної групи. Тому вважаємо, що резистентність пухлинних клітин до розвитку апоптозу є основною причиною збільшення маси пухлини за дії стовбурових клітин. Пов'язуємо це із секрецією мезенхімними стовбуровими клітинами ІЛ-6. ІЛ-6 викликає активацію JAK2/STAT3 сигнального шляху, підвищення транскрипції анти-апоптотичних молекул родини Bcl-2 (Bcl-2, Bcl-x-l) та пригнічення транскрипції про-апоптотичних молекул зазначеної родини (Bcl-x-s, Bax, Bag), що збільшує резистентність клітин до апоптозу (Hunter, Jones S. A., 2015).

Таким чином, виявили активуючий вплив алогенних мезенхімних стовбурових клітин на розвиток трансплантованої карциноми легені Льюїс та швидкість її метастазування, який реалізувався за декількома механізмами: резистентністю до апоптозу, збільшенням кількості клітин проліферативного пулу у фазах G₂/M та S, підвищенням кількості анеуплоїдів, збільшенням кількості лімфоїдних клітин, асоційованих з пухлиною, стимуляцією процесів ангиогенезу.

ВИСНОВКИ

У дисертації наведено вирішення важливої науково-практичної проблеми, а саме проведено комплексне дослідження морфологічних (площа ядра, цитоплазми, морфологія, ядерно-цитоплазмове співвідношення), функціональних (проліферативна активність, життєздатність, експресія ядерних, цитоплазматичних та мембранних білків, чутливість до індукції апоптозу за культивування у безсироватковому середовищі в системі *in vitro*, вплив на активність перитонеальних макрофагів, вміст жирних кислот у ліпідах, активність сукцинатдегідрогенази мітохондрій печінки, ваговий індекс, клітинність селезінки та тимусу) властивостей стовбурових клітин та їх вплив на пухлинний процес (розвиток первинної пухлини, метастазування, генетичну стабільність та розподіл за фазами клітинного циклу клітин первинної пухлини, морфологічні зміни м'язової тканини, ураженою клітинами трансплантованої карциноми легені Льюїс); розроблено нові методи отримання стовбурових клітин культури жирової та нервової тканини.

У відповідності до поставлених завдань і отриманих результатів дослідження зроблено такі висновки:

1. Основною відмінністю розроблених методів отримання стовбурових клітин культури жирової та нервової тканин від існуючих є культивування клітин у присутності фрагментів первинної тканини та збільшенням її контакту з поверхнею культурального посуду, що забезпечує активну адгезію, проліферацію, колонієутворювальну здатність, уникнення ушкоджуючого механічного та хімічного впливів на клітини.

2. Жирова тканина більшого сальника і підшкірна є придатною для отримання адгезивної фракції моноклеарних клітин з високою

проліферативною активністю. Найвища функціональна активність стовбурових клітин культури жирової тканини більшого сальника, що отримана модифікованим методом експланту, характеризується функціональними показниками: кількістю колонієутворюючих одиниць на 4 добу культивування – $8,67 \pm 0,2$ ($p < 0,001$), кількістю клітин у культурі на 14 добу культивування – $735,83 \pm 15,4 \times 10^3$ штук ($p < 0,001$), життєздатністю – $98,7 \pm 0,31$ % ($p < 0,05$).

3. Оптимальними умовами обробки та отримання стовбурових клітин культури червоного кісткового мозку мишей є: градієнт щільності фіколу $1,074$ – $1,076$, центрифугування 300 об./хв, що підтверджується найбільшою кількістю клітин ($p < 0,01$), найвищою їх життєздатністю ($p < 0,05$) та індексом проліферації ($p < 0,05$) у первинних культурах.

4. Оптимальний склад середовища для кріоконсервування стовбурових клітин культури жирової тканини містить 90 % фетальної сироватки телят, 10 % диметилсульфоксиду та забезпечує після 30 -добового зберігання виживаність $2,37 \pm 0,03$ млн клітин ($p < 0,01$), життєздатність $79,2 \pm 2,03$ % ($p < 0,01$) та індекс проліферації $1,94 \pm 0,03$ ($p < 0,01$) за послідуєчого культивування.

5. Морфологія і функціональний стан стовбурових клітин культури червоного кісткового мозку змінюються у процесі культивування, що засвідчує початок реплікативного старіння вже з 4 пасажу і характеризується наступним: на перших пасажах культивування клітини мають веретеноподібну форму з двома довгими виростами цитоплазми, площею ядра $154,44 \pm 6,23$, площею клітини $749,34 \pm 21,16$, яка на пізніх – змінюється на зірчасту з утворенням значної кількості виростів цитоплазми (подіїв), збільшенням площі клітин вже на 4 пасажі до $853,78 \pm 36,71$ ($p < 0,01$), на 12 – до $2304,40 \pm 280,12 \mu\text{m}^2$ ($p < 0,001$), за рахунок цитоплазми; біля ядра візуалізується комплекс Гольджі, що засвідчує активний стан проліферуючих клітин; знижується життєздатність клітин на 7 пасажі до $88,33 \pm 1,94$ % ($p < 0,01$) та їх стійкість до апоптозу, індукованого культивуванням у середовищі без додавання сироватки ($p < 0,01$); зменшується показник ядерно-цитоплазматичного співвідношення і становить на 4 пасажі $0,2262 \pm 0,0074$ ($p < 0,01$), на 12 – до $0,0608 \pm 0,0066$ ($p < 0,001$) через збільшення площі цитоплазми клітини; збільшується вміст апоптичних клітин, що проявляли чутливість до безсироваткового культивування, на 7 та 12 пасажах культивування та становить $20,67 \pm 1,55$ ($p < 0,01$) та $22,67 \pm 1,55$ % ($p < 0,01$) відповідно. Підвищення чутливості клітин до апоптозу прямо корелює з індукованою відсутністю факторів росту $r = 0,81$ ($p < 0,01$).

6. Стовбурові клітини культури жирової тканини змінюють свою морфологію і функціональний стан у процесі культивування, що засвідчує перші ознаки реплікативного старіння з 7 пасажу і характеризується наступним: на перших пасажах культивування клітини мають веретеноподібну форму з двома, трьома довгими виростами цитоплазми, площею ядра $161,11 \pm 5,65$, площею клітини $759,56 \pm 28,42 \mu\text{m}^2$, що на пізніх пасажах змінюється на зірчасту з утворенням значної кількості виростів цитоплазми (подіїв), зменшенням площі ядра на 12 пасажі до $135,78 \pm 11,21$ ($p < 0,001$) та збільшенням площі клітин на 12 пасажі до $1416,90 \pm 151,97 \mu\text{m}^2$ ($p < 0,001$) за рахунок цитоплазми; біля ядра візуалізується комплекс Гольджі, що засвідчує активний стан проліферуючих

клітин; знижується життєздатність клітин на 12 пасажі – до $84,67 \pm 1,36$ % ($p < 0,01$) та їх стійкість до апоптозу, індукованого культивуванням у середовищі без додавання сироватки; з 7 пасажу достовірно зменшується показник ядерно-цитоплазматичного співвідношення і становить $0,2189 \pm 0,0122$ ($p < 0,01$), а на 12 пасажі – $0,1111 \pm 0,0086$ ($p < 0,001$) через достовірне збільшення площі цитоплазми клітини; збільшення вмісту апоптичних клітин, що проявляють чутливість до безсироваткового культивування, на 7 та 12 пасажах культивування та становить $21,33 \pm 1,36$ ($p < 0,05$) та $23,67 \pm 0,97$ % ($p < 0,05$) відповідно.

7. Зміни, що відбуваються у клітинному циклі культури жирової тканини характеризуються великою кількістю диплоїдних клітин – $98,45 \pm 0,39$ %, з яких клітин проліферативного пулу $G_2/M+S$ – $29,51 \pm 3,56$ %, у фазі G_0/G_1 – $70,49 \pm 3,17$ % за ранніх пасажів та кількістю диплоїдів – $96,51 \pm 0,38$ % ($p < 0,05$), зменшенням кількості клітин проліферативного пулу до $18,93 \pm 0,66$ % ($p < 0,05$) за пізніх пасажів, що засвідчує високі функціональні властивості культури, але не абсолютну її генетичну стабільність.

У клітинному циклі культури кісткового мозку за ранніх пасажів встановлено абсолютний вміст диплоїдних клітин, з яких клітин проліферативного пулу $G_2/M+S$ – $29,33 \pm 0,19$ %, у фазі G_0/G_1 – $70,67 \pm 2,70$ %, а за пізніх пасажів кількість клітин проліферативного пулу зменшувалася до $20,33 \pm 1,27$ % ($p < 0,01$), зростала у фазі G_0/G_1 до $79,6 \pm 0,84$ % ($p < 0,05$), що засвідчує високі функціональні властивості культури та її генетичну стабільність.

8. За ранніх пасажів стовбурових клітин культури жирової тканини встановлено високу експресію віментину, актину, Ki-67, PCNA, CD44, анти-апоптичного білка Bcl-2; сумісна експресія кадгеринів і β -катеніну (у ядрі) засвідчує активний стан Wnt/ β -катенін сигнального шляху. Встановлено обернений кореляційний зв'язок між кількістю пасажів культури з експресією маркерів проліферації Ki-67, PCNA: $r = -0,78$ ($p < 0,05$). За збільшення пасажів культивування встановлено причинно-наслідкову залежність рівня експресії ядерних та цитоплазматичних білків стовбурових клітин: Ki-67 $\eta^2 = 0,83$ ($p < 0,05$), PCNA $\eta^2 = 0,83$ ($p < 0,05$), віментин $\eta^2 = 0,73$ ($p < 0,05$), актин $\eta^2 = 0,79$ ($p < 0,05$), E-кадгерин $\eta^2 = 0,87$ ($p < 0,01$), CD44 $\eta^2 = 0,74$ ($p < 0,05$).

9. За експресією ядерних, цитоплазматичних та мембранних білків стовбурові клітини культури нервової тканини характеризуються фенотипом: віментин – $299,0 \pm 0,6$ балів, E-кадгерин – $123,3 \pm 10,1$, актин – $130,7 \pm 16,7$, N-кадгерин – $84,0 \pm 7,6$, Ki-67 – $33 \pm 9,3$, CD 44 – 7 ± 16 , β -катенін $73 \pm 1,6$, bcl 2 – 64 ± 15 балів, що відрізняє їх від мезенхімних стовбурових клітин культури жирової тканини та кісткового мозку за проліферативною здатністю, рухливою активністю.

10. Стовбурові клітини культури червоного кісткового мозку, жирової та нервової тканини на ранніх пасажах мають спільні риси спектру жирних кислот: високий вміст олеїнової кислоти $23,15 \pm 0,05$ %, $21,63 \pm 0,03$, $20,20 \pm 0,93$ % відповідно, що характерно для клітин, резистентних до апоптозу та з високим проліферативним потенціалом; високе співвідношення

мононенасиченої олеїнової до насиченої стеаринової кислоти (C18:1/C18.0), яке відображує активність фермента стеарил-коензим А-десатурази та активний стан Wnt/ β -катенін сигнального шляху; нездатність до подовження ланцюга насичених жирних кислот.

11. Стівбурові клітини культури червоного кісткового мозку мають наступні відмінності за складом поліненасичених жирних кислот порівняно з такими жирової і нервової тканини: а саме, вищий вміст ненасичених жирних кислот ($p < 0,05$), менший вміст $\omega 3$ жирних кислот ($p < 0,05$) та вищий вміст $\omega 6$ жирних кислот ($p < 0,05$). Встановлені відмінності у складі поліненасичених жирних кислот забезпечують стівбуровим клітинам культури жирової тканини, активніше проявляти себе у впливі на імунні реакції, проліферації та диференціюванні клітин.

12. Трансплантація стівбурових клітин культури жирової тканини спричинює підвищення активності сукцинатдегідрогенази мітохондрій гепатоцитів мишей до $57,7 \pm 1,6$ ($p < 0,001$), тоді як стівбурові клітини культури кісткового мозку до $53,3 \pm 1,4$ ($p < 0,01$) порівняно з контролем – $45,9 \pm 0,7$ мкмоль $K_3[Fe(CN)_6]/mg \cdot xв$, що вказує на зростання їх мітотичної активності.

13. Внутрішньовенне введення мезенхімних стівбурових клітин культур жирової тканин та кісткового мозку на перших етапах призводить до короткочасного збільшення відносного індексу маси, вмісту лімфоїдних клітин у тимусі та селезінці тварин-реципієнтів, які поступово відновлюються до норми; підвищення активності НАДФ- H_2 -оксидази моноцитів, макрофагів.

14. За впливу стівбурових клітин у тварин-реципієнтів з трансплантованою карциномою легені Льюїс збільшується маса первинної пухлини до $2,57 \pm 0,21$ г ($p < 0,05$), загальний об'єм метастазів до $29,62 \pm 6,50$ мм³ ($p < 0,05$) із показником сили впливу $\eta^2_x = 0,74$, $p < 0,05$; відбувається швидший перехід пухлинного процесу в васкулярну стадію з показником кількості метастазів розміром 1,0–3,0 мм – 52,5 % ($p < 0,05$), що засвідчує активізацію пухлинного процесу.

15. Трансплантація алогенних мезенхімних стівбурових клітин культури кісткового мозку знижує рівень генетичної стабільності клітин первинної пухлини мишей C57BL/6 з перещепленою метастатичною карциномою легені Льюїс, що проявляється у збільшенні показника анеуплоїдів у первинній пухлині – $76,68 \pm 1,99$ % ($p < 0,001$) та їх кількості серед клітин проліферативного пулу G₂/M та S – $68,02 \pm 3,42$ % ($p < 0,001$), що засвідчує більш злякисний фенотип клітин первинної пухлини.

16. Застосування алогенних мезенхімних стівбурових клітин культури кісткового мозку мишам C57BL/6 з трансплантованою метастатичною карциномою легені Льюїс призводить до порушення механізмів запрограмованої загибелі клітин первинної пухлини з показником зниження апоптозу до $41,82 \pm 1,37$ % ($p < 0,001$), $\eta^2_x = 0,88$ ($p < 0,001$), що підтверджує активізацію пухлинного процесу; збільшення щільності судин на одиницю площі в первинній пухлинній тканині у 1,3 раза ($p < 0,05$), в яких виявлено гемостаз за типом сладжу еритроцитів; утворення осередків девіталізації пухлинної тканини, ділянок некрозу, оточених дегенеративно зміненими

пухлинними клітинами, клітин у стані дистрофії з каріорексисом та каріолізисом. Вказані морфологічні зміни засвідчують активізацію онкопроцесу.

ПРАКТИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ

1. Рекомендувати при отриманні стовбурових клітин культури жирової та нервової тканин проводити культивування у присутності фрагментів експланту за модифікованою методикою, щоб забезпечити активну адгезію, проліферацію, колонієутворювальну здатність, збереження тканинних цитокінів і факторів росту та їх надходження у поживне середовище.

2. Рекомендувати при отриманні мезенхімних стовбурових клітин культури кісткового мозку мишей проводити центрифугування первинного матеріалу в градієнті щільності фіколу 1,074–1,076. Це забезпечує отримання більшої кількості клітин з високою життєздатністю та проліферативною активністю.

3. Оцінювати морфофункціональні властивості мезенхімних стовбурових клітин перед їх використанням з науково-дослідною та терапевтичною метою. До основних параметрів, які повинні бути додержані, відносимо: фібробластоїдна морфологія клітин; ядерно-цитоплазмове співвідношення $>0,2$; висока проліферативна активність, життєздатність $>95\%$, вміст анеуплоїдних клітин $<5\%$ на 2 та 4 пасажах культивування; висока експресія антигенів CD44, β -катеніну, кадгеринів, віментину, актину та маркерів проліферації на більшості клітин.

4. Обстежувати тварин-реципієнтів перед застосуванням мезенхімних стовбурових клітин з терапевтичною метою. Слід проводити ретельне обстеження, спрямоване на виявлення прихованої онкологічної патології, враховуючи здатність мезенхімних стовбурових клітин активувати та прискорювати процеси канцерогенезу.

5. Рекомендувати застосовувати мезенхімні стовбурові клітини у лікуванні захворювань тварин, які супроводжуються ішемією тканин на підставі виявленої властивості мезенхімних стовбурових клітин активувати процеси ангиогенезу.

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Статті у наукових фахових виданнях України, включених до міжнародних наукометричних баз даних:

1. **Кладницька Л. В.,** Мазуркевич А. Й., Ковпак В. В. Життєздатність та проліферативна активність мезенхімальних стовбурових клітин лінійних мишей C57Bl/6 залежно від умов виділення первинного матеріалу. Науковий вісник Національного університету біоресурсів і природокористування України. Серія: Ветеринарна медицина, якість і безпека продукції тваринництва. 2013. Вип. 188. Ч. 3. С. 100–105. *(Здобувачем отримано первинний матеріал, виконано культивування клітин, визначено життєздатність та проліферативну активність клітин, підготовлено статтю до друку).*

2. Мазуркевич А. Й., **Кладницька Л. В.**, Ковпак В. В. Оптимальні умови виділення та культивування адгезивної фракції моноклеарних клітин кісткового мозку миші. Вісник Сумського національного аграрного університету. Серія: Ветеринарна медицина. 2013. Вип. 9 (33). С. 142–146. *(Здобувачем досліджено проліферативну активність та життєздатність клітин культури кісткового мозку миші в різних середовищах культивування).*

3. Мазуркевич А. Й., **Кладницька Л. В.**, Ковпак В. В. Отримання адгезивної фракції моноклеарних клітин кісткового мозку лінійних мишей С 57BL/6 за різних умов виділення первинного матеріалу та культивування у середовищі RPMI. Вісник Сумського національного аграрного університету. Серія: Ветеринарна медицина. 2014. № 1 (34). С. 19–22. *(Здобувачем досліджено життєздатність, проліферативну активність адгезивної фракції моноклеарних клітин кісткового мозку під час культивування у середовищі RPMI за різних умов обробки первинного матеріалу).*

4. **Кладницька Л. В.**, Мазуркевич А. Й., Гарманчук Л. В., Величко С. В., Ковпак В. В. Вплив алогенних мезенхімальних стовбурових клітин на експериментальний пухлинний ріст і процеси метастазування у мишей С57BL/6 з трансплантованою метастатичною карциномою легень Льюїс. Науковий вісник Львівського національного університету ветеринарної медицини та біотехнологій імені С. З. Гжицького. Серія: Ветеринарні науки. 2014. Т. 16. № 3 (60). Ч. 1. С. 138–145. *(Здобувачем визначено масу первинної пухлини, об'єм віддалених метастазів за пухлинного процесу за впливу стовбурових клітин культури кісткового мозку).*

5. **Кладницька Л. В.**, Мазуркевич А. Й., Величко С. В., Ковпак В. В., Джус О. І., Шелест Д. В. Вплив алогенних мезенхімальних стовбурових клітин на оксигензалежний метаболізм перитонеальних макрофагів мишей С57BL/6. Науковий вісник Львівського національного університету ветеринарної медицини та біотехнологій імені С. З. Гжицького. 2015. Т. 17. № 3 (63). С. 49–57. *(Здобувачем отримано первинний матеріал, виконано культивування клітин, отримано перитонеальні макрофаги та досліджено їх метаболічну активність).*

6. **Кладницька Л. В.**, Мазуркевич А. Й., Величко С. В., Ковпак В. В., Гарманчук Л. В., Джус О. І., Дасюкевич О. Й. Вплив алогенних мезенхімальних стовбурових клітин на процес метастазування у мишей С57BL/6 з трансплантованою карциномою легень Льюїс. Науковий вісник Національного університету біоресурсів і природокористування України. Серія: Ветеринарна медицина, якість і безпека продукції тваринництва. 2015. Вип 227. С. 124–131. *(Здобувачем досліджено кількість та розміри віддалених метастазів в мишей з трансплантованою карциномою легень Льюїс за впливу стовбурових клітин культури кісткового мозку).*

7. **Кладницька Л. В.**, Мазуркевич А. Й., Гарманчук Л. В., Величко С. В., Нікуліна В. В., Ніколаєнко Т. В., Ковпак В. В., Дасюкевич О. І., Скачкова О. В., Павлюкова А. О. Біологічні властивості клітин первинної пухлини мишей С57BL/6 з перещепленою карциномою легень Льюїс за впливу алогенних мезенхімальних стовбурових клітин. Біологія тварин. 2015. Т. 17. № 2. С. 82–88.

(Здобувачем досліджено клітинний цикл клітин первинної пухлини мишей C57Bl/6 з перещепленою карциномою легені Льюїс за впливу алогенних мезенхімальних стовбурових клітин культури кісткового мозку).

8. **Кладницька Л. В.**, Мазуркевич А. Й., Гарманчук Л. В., Величко С. В., Малюк М. О., Козицька Т. В., Данілов В. Б., Ковпак В. В., Харкевич Ю. О., Костюк А. В., Джус О. І., Шелест Д. В. Морфологічні показники первинної пухлини мишей C57Bl/6 з трансплантованою метастатичною карциномою легень Льюїс за впливу алогенних мезенхімальних стовбурових клітин. Вісник Білоцерківського національного аграрного університету. Серія: Ветеринарна медицина. 2016. № 1. С. 125–131. *(Здобувачем досліджено морфологічні особливості м'язової тканини мишей, ураженої карциномою легені Льюїс, за впливу алогенних мезенхімальних стовбурових клітин культури кісткового мозку).*

9. **Кладницька Л. В.**, Мазуркевич А. Й., Данчук В. В., Мідик С. В., Величко С. В., Данілов В. Б. Жирнокислотний склад ліпідів мезенхімальних стовбурових клітин кісткового мозку kota. Наукові доповіді Національного університету біоресурсів і природокористування України. 2016. № 61. *(Здобувачем виконано культивування клітин, підготовлено зразки культури стовбурових клітин кісткового мозку kota та визначено вміст жирних кислот).*

10. **Кладницька Л. В.**, Мазуркевич А. Й., Величко С. В. Метод отримання культури нейральних стовбурових клітин kota. Науковий вісник Національного університету біоресурсів і природокористування України. Серія: Ветеринарна медицина, якість і безпека продукції тваринництва. 2016. Вип. 237(38). С. 216–222. *(Здобувачем виконано обробку первинного матеріалу за запропонованим методом, проведено культивування стовбурових клітин культури нервової тканини, отримано стовбурові клітини культури нервової тканини).*

11. **Кладницька Л. В.**, Мазуркевич А. Й., Данчук В. В., Величко С. В., Мідик С. В. Вміст жирних кислот в ліпідах фетальних стовбурових клітин kota. Науковий вісник Львівського національного університету ветеринарної медицини імені С. З. Гжицького. 2016. Т. 18. № 3 (70). С. 136–140. *(Здобувачем отримано стовбурові клітини фетальної тканини kota, визначено вміст жирних кислот у зразках).*

12. **Кладницька Л. В.**, Мазуркевич А. Й., Величко С. В., Жигунова О. В. Отримання культури стовбурових клітин із жирової тканини собаки. Вісник Сумського національного аграрного університету. Серія: Ветеринарна медицина. 2016. Вип. 6 (38). С. 19–24. *(Здобувачем отримано стовбурові клітини жирової тканини собаки за власною методикою).*

13. **Кладницька Л. В.**, Мазуркевич А. Й., Величко С. В., Курганова Т. О., Величко В. С. Метод отримання первинного матеріалу та адгезивної фракції моноклеарних клітин з високою проліферативною активністю з жирової тканини коня. Вісник Сумського національного аграрного університету. Серія: Ветеринарна медицина. 2016. № 11 (39). С. 48–53. *(Здобувачем отримано*

первинний матеріал та адгезивну фракцію моноклеарних клітин з високою проліферативною активністю).

14. **Кладницька Л. В.,** Мазуркевич А. Й., Безденежних Н. О., Чехун В. Ф., Величко С. В., Малюк М. О., Козицька Т. В., Ковпак В. В., Данілов В. Б., Харкевич Ю. О. Експресія ядерних білків стовбуровими клітинами з жирової тканини собаки на різних пасажах культивування *in vitro*. Сумського національного аграрного університету. Серія: Ветеринарна медицина. 2017. № 1 (40). С. 3–7. *(Здобувачем визначено вміст ядерних білків стовбурових клітин культури жирової тканини за різних пасажів культивування).*

15. **Кладницька Л. В.,** Мазуркевич А. Й., Безденежних Н. О., Чехун В. Ф., Величко С. В., Малюк М. О., Козицька Т. В., Ковпак В. В., Данілов В. Б., Харкевич Ю. О. Цитоплазматичні та мембранні білки нейральних стовбурових клітин kota за різних пасажів культивування *in vitro*. Проблеми зооінженерії та ветеринарної медицини. Серія: Ветеринарні науки. 2017. № 34 (2). С. 64–70. *(Здобувачем визначено експресію цитоплазматичних та мембранних білків стовбурових клітин культури нервової тканини за різних пасажів культивування).*

16. **Кладницька Л. В.,** Мазуркевич А. Й., Безденежних Н. О., Чехун В. Ф., Величко С. В., Малюк М. О., Козицька Т. В., Ковпак В. В., Данілов В. Б., Харкевич Ю. О. Експресія цитоплазматичних білків стовбуровими клітинами із жирової тканини собаки на різних пасажах культивування *in vitro*. Науково-технічний бюлетень державного науково-дослідного контрольного інституту ветеринарних препаратів та кормових добавок Інституту біології тварин. 2017. № 18 (1). С. 48–55 *(Здобувачем досліджено експресію цитоплазматичних білків стовбурових клітин культури жирової тканини собаки за різних пасажів культивування).*

17. Кладницька Л. В. Особливості клітинного циклу мезенхімальних стовбурових клітин з жирової тканини собаки за різних пасажів культивування. Науковий вісник Львівського національного університету ветеринарної медицини імені С. З. Гжицького. 2017. Т. 19. № 78. С. 36–40.

18. Кладницька Л. В. Рівень експресії ядерного білка Ki-67 мезенхімальними стовбуровими клітинами з жирової тканини собаки за різних пасажів культивування *in vitro* Проблеми зооінженерії та ветеринарної медицини. Серія: Ветеринарні науки. 2017. № 35 (2). С. 147–151.

19. Кладницька Л. В. Клітинний цикл мезенхімальних стовбурових клітин з кісткового мозку собаки за різних пасажів культивування. Науковий вісник національного університету біоресурсів і природокористування України. Серія: Ветеринарна медицина, якість і безпека продукції тваринництва. 2017. Вип. 273. С. 82–90.

20. Кладницька Л. В. Взаємозв'язок пасажування та розподілу мезенхімальних стовбурових клітин за фазами клітинного циклу. Вісник Сумського національного аграрного університету. Серія: Ветеринарна медицина. 2017. № 11 (41). С. 46–51.

21. **Kladnytska L. V.**, Mazurkevych A. I., Velychko S. V., Kharkevych Y. O., Shelest D. V., Velychko V. S. The influence of allogeneic bone marrow derived mesenchymal stem cells on indicators of functional state of immune organs in mice C57Bl/6. Науковий вісник Національного університету біоресурсів і природокористування України. Серія: Ветеринарна медицина, якість і безпека продукції тваринництва. 2018. Вип. 285. С. 165–175. *(Здобувачем досліджено ваговий індекс, клітинність тимусу і селезінки на різних етапах імунної відповіді за впливу стовбурових клітин культури кісткового мозку).*

22. **Kladnytska L. V.**, Mazurkevych A. I., Khomych V. T., Mazurkevych T. A., Stegney Z. G., Maluk M. O., Garmanchuk L. V., Velychko S. V., Danilov V. B., Kharkevych Y. O., Shelest D. V., Velychko V. S., Stupak I. A. Functional activity and morphological peculiarities of mesenchymal stem cells during in vitro cultivation conditions. Науковий вісник Національного університету біоресурсів і природокористування України. Серія: Ветеринарна медицина, якість і безпека продукції тваринництва. 2018. № 293. С. 73–83. *(Здобувачем досліджено морфологічні особливості, ядерно-цитоплазмове співвідношення, функціональні властивості стовбурових клітин культури кісткового мозку за різних пасажів культивування).*

23. **Kladnytska L. V.**, Mazurkevych A. I., Maluk M. O., Danilov V. B., Kharkevych Y. O., Velychko S. V., Shelest D. V., Velychko V. S. The system influence of allogeneic adipose tissue derived mesenchymal stem cells on the functional state of immune organs. Науковий вісник Львівського національного університету ветеринарної медицини імені С. З. Гжицького. 2018. Т. 20. № 83. С. 347–351. *(Здобувачем досліджено ваговий індекс, клітинність селезінки та тимусу на різних етапах імунної відповіді за впливу стовбурових клітин жирової тканини).*

24. **Kladnytska L. V.**, Mazurkevych A. I., Khomych V. T., Mazurkevych T. A., Stegney Z. G., Maluk M. O., Garmanchuk L. V., Velychko S. V., Danilov V. B., Kharkevych Y. O., Shelest D. V., Velychko V. S., Stupak I. A. Morphological peculiarities and functional activity of adipose-derived mesenchymal stem cells during in vitro cultivation conditions. Науковий вісник Львівського національного університету ветеринарної медицини імені С. З. Гжицького. 2018. Т. 20. № 92. С. 79–82. *(Здобувачем досліджено морфологічні особливості, ядерно-цитоплазмове співвідношення, функціональні властивості стовбурових клітин культури жирової тканини за різних пасажів культивування).*

25. **Кладницька Л. В.**, Мазуркевич А. Й., Томчук В. А., Гарманчук Л. В., Малюк М. О., Калачнюк Л. Г., Величко С. В., Лозова О. В., Данілов В. Б., Харкевич Ю. О., Ткаченко Т. А., Бокотько Р. Р., Шелест Д. А. Активність сукцинатдегідрогенази мітохондрій печінки тварин-реципієнтів за впливу алогенних мезенхімальних стовбурових клітин. Ветеринарний часопис. Серія: Ветеринарна медицина. 2019. Т. 10. № 3. С. 48–53. *(Здобувачем досліджено активність сукцинатдегідрогенази печінки за впливу алогенних мезенхімальних стовбурових клітин культури кісткового мозку).*

Стаття у науковому виданні України,

включеному до міжнародної наукометричної бази даних

26. Мазуркевич А. Й., Кладницька Л. В., Ковпак В. В. Features conditions selection and cultivation mouse bone marrow adhesive fraction mononuclear cells. Вісник Київського Національного університету імені Тараса Шевченка. Серія: Біологія. № 2 (64). 2013. С. 41–43. *(Здобувачем досліджено проліферативну активність та життєздатність стовбурових клітин культури кісткового мозку за культивування у середовищі DMEM та за різних способів обробки первинного матеріалу).*

Статті у наукових виданнях інших держав

27. Kladnytska L. V., Nikulina V. V., Garmanchuk L. V., Mazurkevych A. Y., Kovpak V. V., Nikolaienko T. V., Shelest D. V., Dzhus O. I., Skachkova O. V., Stupak Y. A., Dasyukevich O. I. Influence allogeneic mesenchymal stem cells on the tumour growth parameters and metastatic potential in the transplantable carcinoma lung Lewis. Journal of Animal and Veterinary Sciences. 2014. Vol. 1. № 1. P. 1–5. *(Здобувачем досліджено вміст анеуплоїдів, клітин проліферативного пулу G₂M+S первинної пухлини мишей з трансплантованою карциномою легені Льюїс за впливу алогенних стовбурових клітин культури кісткового мозку).*

28. Кладницькая Л. В., Мазуркевич А. Й., Данчук В. В., Величко С. В., Мидык С. В., Данилов В. Б. Содержание жирных кислот в липидах стволовых клеток жировой ткани собаки. Сельское хозяйство – проблемы и перспективы. Серия: Ветеринария. 2016. Т. 33. С. 60–67. *(Здобувачем досліджено вміст жирних кислот у ліпідах стовбурових клітин культури жирової тканини собаки).*

29. Патафеев В. А., Кладницькая Л. В., Мазуркевич А. Й., Безденежных Н. А., Чехун В. Ф., Величко С. В., Козицкая Т. В., Данилов В. Б., Харкевич Ю. О. Экспрессия апоптоз-ассоциированного белка bcl-2 мезенхимальными стволовыми клетками из жировой ткани собаки при культивировании *in vitro*. Ветеринарный журнал Беларуси. 2018. № 1 (8). С. 65–68. *(Здобувачем досліджено експресію апоптоз-асоційованого білка bcl-2 мезенхімальними стовбуровими клітинами собаки культури жирової тканини).*

Патенти України на корисну модель

30. Кладницька Л. В., Мазуркевич А. Й., Величко С. В. Патент України на корисну модель №109148 МПК А61 К 35/35 (2015.01). Спосіб отримання мезенхімальних стовбурових клітин із жирової тканини собаки: заявник і патентовласник Національний університет біоресурсів і природокористування України; № u 2016 02329; заявлено 11.03.2016; опубліковано 10.08.2016; Бюл. № 15. 4 с. *(Здобувачем порівняно різні методи обробки первинного матеріалу – жирової тканини собаки та запропоновано спосіб отримання стовбурових клітин культури жирової тканини).*

31. Кладницька Л. В., Мазуркевич А. Й., Величко С. В. Патент України на корисну модель №109148 МПК (2016.01) А61 К35/12 (2015.01) А61 К35/28

(2015.01) A61 K35/30 (2015.01) A61 P25/00. Спосіб отримання нейральних стовбурових клітин kota: заявник і патентовласник Національний університет біоресурсів і природокористування України; № u2016 07080; заявлено 30.06.2016; опубліковано 12.12.2016; Бюл. № 23. 4 с. *(Здобувачем порівняно різні методи обробки первинного матеріалу – нервової тканини kota та запропоновано спосіб отримання стовбурових клітин культури нервової тканини).*

Методичні рекомендації

32. Мазуркевич А. Й., Малюк М. О., Стародуб Л. Ф., Ковпак В. В., **Кладницька Л. В.**, Харкевич Ю. О., Бобось О. Л., Кляп Н. І., Бокотько Р. Р., Савчук Т. Л., Ковпак О. С. Методи видоспецифічної оцінки стовбурових клітин та їх застосування у ветеринарній клітинній регенеративній терапії: методичні рекомендації. К., 2017. 64 с. *(Розглянуто та затверджено Вченою радою Національного університету біоресурсів і природокористування України, протокол № 5 від 27.12.2017 р. Здобувачем підготовлено розділ «Методи отримання та імунофенотипова характеристика стовбурових клітин культури жирової тканини»).*

Тези наукових доповідей

33. Mazurkevich A. Y., **Kladnytska L. V.**, Kovpak V. V. Features conditions selection and cultivation mouse bone marrow adhesive fraction mononuclear cells. Cell Technology Week 2013. Kyiv, Ukraine 14–17 May 2013. К., 2013. С. 94. *(Здобувачем порівняно способи обробки та культивування адгезивної фракції мононуклеарних клітин).*

34. Мазуркевич А. Й., **Кладницька Л. В.**, Ковпак В. В. Проліферативна активність мезенхімальних стовбурових клітин миші залежно від умов виділення первинного матеріалу. Фізіологічний журнал. 2014. № 60 (3). С. 14–15. *(Здобувачем порівняно проліферативну активність мезенхімальних стовбурових клітин миші залежно від умов обробки первинного матеріалу).*

35. Nikolaienko T. V., **Kladnytska L. V.**, Garmanchuk L. V., Influence of allogeneic mesenchymal stem cells on metastatic potential and tumor-infiltrating lymphocytes. Nikulina. Annals of Oncology. 2014. № 25 (4). P. 1652. *(Здобувачем визначено метастатичний потенціал та інфільтрацію лімфоцитами первинної пухлини мишею з трансплантованою карциномою легені Льюїс за впливу стовбурових клітин).*

36. **Kladnytska L. V.**, Mazurkevich A. Y., Ostrovska L. B., Garmanchuk L. V., Velychko S. V., Kovpak V. V., Nikulina V. V., Nikolaienko T. V., Dasyukevich O. I., Skachkova O. V. Effect of bone marrow derived mesenchymal stem cells on cell cycle of tumor cells in murine model of Lewis lung carcinoma. The 7th Annual Maryland Stem Cell Research Symposium, hosted by the Maryland Stem Cell Research Commission and Montgomery County will be held on Tuesday, December 2, 2014 at the Silver Spring Civic Center, Silver Spring MD. USA. P. 64. *(Здобувачем досліджено клітинний цикл клітин*

первинної пухлини мишей з трансплантованою карциномою легені Льюїс за впливу стовбурових клітин культури кісткового мозку).

37. **Кладницька Л. В.**, Жигунова О. В. Вплив застосування алогенних мезенхімальних стовбурових клітин на показники загального білка сироватки крові мишей C57Bl/6 з перещепленою карциномою легені Льюїс. Наукові здобутки молоді у вирішенні актуальних проблем виробництва та переробки сировини, стандартизації і безпеки продовольства: IV Міжнародна науково-практична конференція вчених, аспірантів і студентів УННІ якості біоресурсів та безпеки життя Національного університету біоресурсів і природокористування України, м. Київ, 15–16 травня 2014 року: тези доповіді. К., 2014. С. 38 *(Здобувачем досліджено вміст загального білка та його фракцій у сироватці крові мишей C57Bl/6 з перещепленою карциномою легені Льюїс).*

38. Dzhus O., **Kladnytska L.**, Garmanchuk L., Nikulina V., Stupak Y., Nikolaienko T. Increase of aneuploid tumor cells as a result of the influence of allogeneic mesenchymal stem cells. *Annals of Oncology* 2014. № 25 (4). P. 1660. *(Здобувачем досліджено підвищення рівня анеуплоїдів первинної пухлини мишей за впливу алогенних стовбурових клітин).*

39. Nikolaienko T. V., Garmanchuk L. V., **Kladnytska L. V.**, Nikulina V. V., Scachkova O. V., Dasykevich O. Y. Influence allogeneic mesenchymal stem cells on the tumour cells parameters. FEBS–EMBO 2014 Conference. European Molecular Biology organization Conference. 30 August – 4 September 2014. Paris, France. Vol. 281. P. 477–478. *(Здобувачем досліджено клітинний цикл первинної пухлини за впливу стовбурових клітин).*

40. **Kladnytska L. V.**, Mazurkevych A. Y., Dzhus O. I., Shelest D. V., Svitina G., Garmanchuk L. V., Velychko S. V., Kovpak V. V. Phagocytic activity of peritoneal macrophages under the influence of allogenic stem cells. 4th European Congress of immunology, Vienna, 6–9 September 2015. P. D.07.07. *(Здобувачем досліджено фагоцитарну активність перитонеальних макрофагів мишей за впливу алогенних стовбурових клітин).*

41. **Кладницька Л. В.**, Мазуркевич А. Й., Гарманчук Л. В., Величко С. В., Ковпак В. В. Вплив алогенних мезенхімальних стовбурових клітин на рівень генетичної стабільності клітин первинної пухлини мишей C57Bl/6 з перещепленою карциномою легені Льюїс. *Фізіологічний журнал*. 2015. № 61 (3). С. 134. *(Здобувачем досліджено рівень анеуплоїдії клітин первинної пухлини мишей C57Bl/6 з перещепленою карциномою легені Льюїс).*

42. **Кладницька Л. В.**, Мазуркевич А. Й., Величко С. В., Гарманчук Л. В. Оксигензалежний метаболізм перитонеальних макрофагів мишей C57Bl/6 за дії алогенних мезенхімальних стовбурових клітин. Проблеми ветеринарної медицини та якості і безпеки продукції тваринництва: XV Міжнародна науково-практична конференція професорсько-викладацького складу та аспірантів Національного університету біоресурсів і природокористування України, м. Київ, 19–20 травня 2016 року: тези доповіді. К., 2016. С. 50. *(Здобувачем досліджено оксигензалежний метаболізм перитонеальних макрофагів).*

43. **Кладницкая Л. В.**, Мазуркевич А. И., Величко С. В., Малюк Н. А., Безденежных Н. А., Козицкая Т. В. Иммунофенотипическая характеристика мезенхимальных стволовых клеток жировой ткани собаки на ранних пассажах культивирования *in vitro*. Современные технологии сельскохозяйственного производства: XX Международная научно-практическая конференция, г. Гродно, Республика Беларусь, 11 мая 2017 года: тезисы доклада. Гродно, 2017. С. 45–46. *(Здобувачем визначено експресію білків мезенхімальних стовбурових клітин жирової тканини собак на ранніх пасажах культивування in vitro).*

44. **Кладницька Л. В.**, Мазуркевич А. Й., Абраменко І. В. Вміст інтерлейкіну-6 у культуральному середовищі при культивуванні стовбурових клітин кісткового мозку мишей лінії C57Bl/6 за різних пасажів культивування. Досягнення та перспективи застосування гумінових речовин у сільському господарстві: Міжнародна науково-практична конференція, м. Дніпро, 19–20 жовтня 2017 року: тези доповіді. Дніпро, 2017. С. 51. *(Здобувачем досліджено вміст інтерлейкіну-6 у культуральному середовищі за культивування стовбурових клітин).*

45. **Кладницька Л. В.**, Мазуркевич А. Й., Кротенко В. В., Величко В. С. Вплив хімічного складу поживних середовищ на адгезію, формування колоній та проліферацію мезенхімальних стовбурових клітин з жирової тканини. Цілі сталого розвитку третього тисячоліття: виклики для університетів наук про життя: Міжнародна науково-практична конференція, присвячена 120-річчю Національного університету біоресурсів і природокористування України, м. Київ, 23–25 травня 2018 року: тези доповіді. К., 2018. С. 166–167. *(Здобувачем порівню вплив середовищ культивування на проліферативну активність, формування колоній стовбуровими клітинами культури жирової тканини).*

46. **Kladnytska L. V.**, Mazurkevych A. I., Velychko S. V., Danylov V. B., Kharkevych Y. O., Shelest D. V., Velychko V. S. Functional state of thymus in mice C57BL/6 and influence allogeneic bone marrow derived mesenchymal stem cells. Актуальні проблеми фізіології тварин: Міжнародна науково-практична конференція, м. Чернігів, 3–5 травня 2018 року: тези доповіді. Чернігів, 2018. С. 50. *(Здобувачем досліджено ваговий індекс, клітинність тимусу за впливу стовбурових клітин культури кісткового мозку).*

47. **Kladnytska L. V.**, Mazurkevych A. I., Velychko S. V., Danylov V. B., Kharkevych Y. O., Shelest D. V., Velychko V. S. Splin functional state in mice C57BL/6 on influence allogeneic bone marrow derived mesenchymal stem cells. Актуальні проблеми фізіології тварин: Міжнародна науково-практична конференція, м. Чернігів, 3–5 травня 2018 року: тези доповіді. Чернігів, 2018. С. 52. *(Здобувачем досліджено функціональний стан селезінки за впливу алогенних стовбурових клітин кісткового мозку).*

48. **Кладницька Л. В.**, Мазуркевич А. Й., Величко С. В., Данилов В. Б., Харкевич Ю. О., Устенко Ю. О. Вплив алогенних мезенхімальних стовбурових клітин з кісткового мозку на функціональний стан тимусу. Актуальні проблеми фізіології тварин: Міжнародна науково-практична конференція, м. Чернігів,

3–5 травня 2018 року: тези доповіді. Чернігів, 2018. С. 51. *(Здобувачем досліджено функціональний стан тимусу за впливу алогенних стовбурових клітин кісткового мозку).*

49. Kladnytska L. V., Mazurkevych A. Y., Maluk M. O., Tomchuk V. A., Danilov V. B., Kharkevych Yu. O., Melnyk O. O. Influence of transplanted bone marrow and adipose derived allogenic mesenchymal stromal cells on the biochemical parameters of C57Bl/6 mice blood. *Ukrainian Biochemical Journal*. 2018. Vol. 90. P. 78. *(Здобувачем досліджено біохімічні показники сироватки крові мишей C57Bl/6 за впливу алогенних стовбурових клітин культури жирової тканини та кісткового мозку).*

50. **Kladnytska L. V.**, Mazurkevych A. Y., Danilov V. B., Kharkevych Yu. O., Melnyk O. O. The influence of transplanted allogenic bone marrow and adipose derived mesenchymal stem cells on the immune organs of C57Bl/6 mice. *Experimental Oncology*. 2018. Vol. 40. Is. 2. P. 166–167. *(Здобувачем досліджено функціональний стан тимусу та селезінки мишей-реципієнтів за впливу алогенних стовбурових клітин культури жирової тканини та кісткового мозку).*

51. **Кладницька Л. В.**, Мазуркевич А. Й., Малюк М. О., Томчук В. А., Величко С. В., Данілов В. Б., Харкевич Ю. О., Скачкова О. В., Шелест Д. І., Величко В. С. Вплив алогенних мезенхімальних стовбурових клітин кісткового мозку на клітинний цикл первинної пухлини мишей C57Bl/6 з трансплантованою карциномою легені Льюїс. *Фундаментальна медицина: інтегральні підходи до терапії хворих з онкопатологією: науково-практична конференція молодих вчених, м. Київ 4–5 лютого 2019 року: тези доповіді*. К., 2019. С. 65–66. *(Здобувачем досліджено розподіл за фазами клітинного циклу клітин первинної пухлини мишей з трансплантованою карциномою легені Льюїс).*

52. **Кладницька Л. В.**, Мазуркевич А. Й., Малюк М. О., Томчук В. А., Величко С. В., Данілов В. Б., Харкевич Ю. О., Ткаченко Т. А., Скачкова О. В., Шелест Д. І., Величко В. С., Ступак І. А., Колотій О. В. Вплив алогенних мезенхімальних стовбурових клітин кісткового мозку на пухлинний ріст і процеси метастазування у мишей з трансплантованою карциномою легені Льюїс. *Фундаментальна медицина: інтегральні підходи до терапії хворих з онкопатологією: науково-практична конференція молодих вчених, м. Київ, 4–5 лютого 2019 року: тези доповіді*: К., 2019. С. 66–67. *(Здобувачем досліджено вагу первинної пухлини, кількість, об'єм, розміри метастазів мишей з трансплантованою карциномою легені Льюїс).*

53. **Kladnytska L. V.**, Mazurkevych A. Y., Tomchuk V. A., Maluk M. O., Garmanchuk L. V., Kalachnyk L. G., Velychko S. V., Lozova O. V., Danilov V. B., Kharkevych Yu. O., Bokotko R. R., Dovgopol N. I., Velychko V. S., Rzyzkova M. V., Negela A. O. The effect of allogenic mesenchymal stem cell transplantation on the activity of succinate dehydrogenase of recipient liver mitochondria. *Modern Aspects of Biochemistry and Biotechnology – 2019: Міжнародна конференція молодих учених, Kyiv, Ukraine 21–22 March 2019*. К., 2019. P. 14. *(Здобувачем досліджено активність сукцинатдегідрогенази мітохондрій печінки мишей за впливу стовбурових клітин).*

АНОТАЦІЯ

Кладницька Л. В. Морфофункціональні властивості стовбурових клітин та їх вплив на пухлинний процес. – На правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора ветеринарних наук зі спеціальності 16.00.02 «Патологія, онкологія і морфологія тварин». Національний університет біоресурсів і природокористування України. Київ, 2020.

Дисертацію присвячено вирішенню важливої науково-практичної проблеми, а саме дослідженню морфологічних, функціональних характеристик стовбурових клітин різного походження та їх системного впливу на пухлинний процес.

На основі проведених досліджень розроблено нові методи отримання стовбурових клітин культури жирової тканини собаки, коня, миші, нервової тканини kota, оптимізовано метод отримання стовбурових клітин культури червоного кісткового мозку миші.

Отримано нові наукові дані щодо морфології, функціонального стану стовбурових клітин культури червоного кісткового мозку та жирової тканини різної локалізації за ранніх та пізніх пасажів культивування.

Встановлено, що стовбурові клітини культури червоного кісткового мозку мають відмінності за складом поліненасичених жирних кислот порівняно з такими жирової і нервової тканини. Доведено, що стовбурові клітини культури червоного кісткового мозку, жирової та нервової тканини мають спільні риси спектру жирних кислот, що характерно для клітин з високим проліферативним потенціалом, резистентних до апоптозу; високе співвідношення мононенасиченої олеїнової до насиченої стеаринової кислоти (C18:1/C18:0), яке становить 1,50–2,18 і характеризує активність ферменту стеарил-коензим А-десатурази та активний стан Wnt/ β -катенін сигнального шляху; нездатність до подовження ланцюга насичених жирних кислот.

Встановлено клітинний цикл стовбурових клітин культури жирової тканини, червоного кісткового мозку за ранніх і пізніх пасажів культивування та визначено вміст анеуплоїдів у цих культурах. Отримано нові наукові дані щодо імунофенотипу стовбурових клітин культури жирової та нервової тканини.

У досліджах *in vivo* встановлено, що трансплантація стовбурових клітин культури жирової тканини та кісткового мозку спричинює підвищення активності сукцинатдегідрогенази мітохондрій гепатоцитів мишей-реципієнтів, що вказує на збільшення їх мітотичної активності; короткочасного збільшення відносного індексу маси тимусу і селезінки тварин-реципієнтів і вмісту в них лімфоїдних клітин, які поступово відновлюються до норми; підвищення активності НАДФ-N₂-оксидази моноцитів, макрофагів.

За результатами проведених досліджень встановлено, що за системного впливу алогенних мезенхімних стовбурових клітин у тварин-реципієнтів з експериментально змодельованою карциномою легені Льюїс збільшується маса первинної пухлини, загальний об'єм метастазів, відбувається швидший

перехід пухлинного процесу до васкулярної стадії, що засвідчує його активізацію. Доведено причинно-наслідкову залежність трансплантації стовбурових клітин на загальний об'єм метастазів із показником сили впливу $\eta^2x=0,74$ ($p<0,05$). Встановлено порушення механізмів запрограмованої загибелі клітин первинної пухлини через зниження апоптозу; збільшення кількості лімфоїдних клітин, асоційованих з пухлиною, які беруть участь у активації ангиогенезу в пухлинній тканині як продуценти фактору росту ендотелію судин; зміну генетичної стабільності клітин первинної пухлини мишей C57BL/6 з перещепленою метастатичною карциномою легені Льюїс за впливу стовбурових клітин, що характеризується збільшенням кількості анеуплоїдів у первинній пухлині, а також підвищенням їх умісту в фазах проліферативного пулу G₂/M+S клітинного циклу, що засвідчує зляксісний фенотип клітин первинної пухлини.

Ключові слова: стовбурові клітини, пухлинний процес, собаки, коні, коти, миші.

АННОТАЦІЯ

Кладницькая Л. В. Морфофункціональні властивості стовбурових кліток і їх вплив на опухольовий процес. – На правах рукописи.

Диссертация на соискание ученой степени доктора ветеринарных наук по специальности 16.00.02 «Патология, онкология и морфология животных». Национальный университет биоресурсов и природопользования Украины. Киев, 2020.

Диссертация посвящена решению важной научно-практической проблемы, а именно исследованию морфологических, функциональных характеристик стволовых клеток различного происхождения и их системного воздействия на опухолевый процесс.

На основе проведенных исследований разработаны новые методы получения стволовых клеток культуры жировой ткани собаки, лошади, мыши, культуры нервной ткани кота, оптимизирован метод получения стволовых клеток культуры красного костного мозга мыши.

Получены новые научные данные о морфологии, функциональных свойствах стволовых клеток культуры красного костного мозга и жировой ткани различной локализации на ранних и поздних пассажах культивирования.

Установлено, что стволовые клетки культуры красного костного мозга имеют различия по составу полиненасыщенных жирных кислот по сравнению с такими жировой и нервной ткани. Доказано, что стволовые клетки культуры красного костного мозга, жировой и нервной ткани имеют общие черты спектра жирных кислот, что характерно для клеток с высоким пролиферативным потенциалом, резистентных к апоптозу; высокое соотношение мононенасыщенной олеиновой к насыщенной стеариновой кислоты (C18:1/C18:0), которое составляет 1,50–2,18 и характеризует активность фермента стеарил-коэнзим А-дегидрогеназы и активное состояние Wnt/ β -катенин

сигнального пути; неспособность к увеличению цепи насыщенных жирных кислот.

Исследован клеточный цикл стволовых клеток культуры жировой ткани, красного костного мозга на ранних и поздних пассажах культивирования и определено содержание анеуплоидов в этих культурах. Получены новые научные данные об иммунофенотипе стволовых клеток культуры жировой и нервной ткани.

В опытах *in vivo* установлено, что трансплантация стволовых клеток культуры жировой ткани и костного мозга вызывает повышение активности сукцинатдегидрогеназы митохондрий гепатоцитов мышей-реципиентов, что указывает на увеличение их митотической активности; кратковременного увеличения относительного индекса массы тимуса и селезенки животных-реципиентов и содержания в них лимфоидных клеток, которые постепенно восстанавливаются до нормы; повышение активности НАДФ-Н2-оксидазы моноцитов, макрофагов.

По результатам проведенных исследований установлено, что при системном влиянии аллогенных мезенхимных стволовых клеток у животных-реципиентов с экспериментально смоделированной карциномой легких Льюис увеличивается масса первичной опухоли, общий объем метастазов, происходит быстрый переход опухолевого процесса в васкулярную стадию, что свидетельствует о его активации. Доказана причинно-следственная зависимость трансплантации стволовых клеток на общий объем метастазов с показателем силы воздействия $\eta^2x=0,74$ ($p<0,05$). Установлены нарушения механизмов запрограммированной гибели клеток первичной опухоли из-за снижения апоптоза; увеличение количества лимфоидных клеток, ассоциированных с опухолью, которые участвуют в активации ангиогенеза в опухолевой ткани как продуценты фактора роста эндотелия сосудов; изменение генетической стабильности клеток первичной опухоли мышей C57BL/6 с перевитой метастатической карциномой легких Льюис при влиянии стволовых клеток, что характеризуется увеличением количества анеуплоидов в первичной опухоли, а также повышением содержания в фазах пролиферативного пула G2/M + S клеточного цикла.

Ключевые слова: стволовые клетки, опухолевый процесс, собака, лошадь, кот, мышь.

ANNOTATION

Kladnytska L. V. Morphofunctional Properties of Stem Cells and their Influence on the Tumor Process. – The Manuscript.

The thesis for awarding a scientific degree of the doctor of veterinary sciences in specialty 16.00.02 «Pathology, Oncology and Animals Morphology». National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine. Kyiv, 2020.

The thesis is devoted to the decision of an important scientific and practical task – the study of morphological, immunophenotypic, functional characteristics

of mesenchymal stem cells of different origin and evaluation of their systemic influence on the tumor process in recipient animals.

New technologies for obtaining stem cells from the adipose tissue of the dog, horse, mouse, and from a cat's nervous tissue were proposed, and the technology for obtaining stem cells from the mouse red bone marrow was optimized.

New scientific data concerning morphology, functional state of mesenchymal stem cells from red bone marrow and the adipose tissue of the different origin on the early and late passages were obtained.

It was found that the stem cells of red bone marrow culture compared to adipose and nervous tissue have differences in the polyunsaturated fatty acids content. At the same time stem cells from red bone marrow culture, adipose and nervous tissue had common features of the fatty acid spectrum, which are characteristic for cells with high proliferative potential, resistance to apoptosis; a high ratio of unsaturated linoleic to saturated stearic acid ($C18:1/C18:0 = 1.5-2.18$), which reflects the activity of the stearyl-CoA desaturase enzyme and the active state of the Wnt/ β -catenin signaling pathway, inability to lengthen the chain of saturated fatty acids.

Cell cycle of stem cells and aneuploidy levels from cultures of adipose tissue, red bone marrow on the early and late passages were analyzed. New scientific data on immunophenotype of stem cells from adipose and nervous tissue culture were obtained.

In experiments *in vivo* it was established that transplantation of stem cells from adipose tissue and bone marrow cultures induced the elevation of the activity of succinate dehydrogenase in hepatocyte's mitochondria in recipient mice, which suggested of their increased mitotic activity; short-term increase in the relative mass index of the thymus and spleen of recipient animals and the content of lymphoid cells, which gradually recover to normal; increasing the activity of NADP-H₂-oxidase of monocytes, macrophages.

According to the results of the studies, it was established that under the systemic influence of allogeneic mesenchymal stem cells in animals with experimentally transmitted Lewis lung cancer, the mass of the primary tumor and the total volume of metastases increased. Furthermore, there was a faster transition of the tumor process to the vascular stage, which indicated its activation.

The causal relationship between stem cell transplantation and the total volume of metastases with an of influence $\eta^2_x=0.74$ ($p<0.05$) was proved.

In recipient animals with transplanted Lewis lung carcinoma under systemic influence of allogenic mesenchymal stem cells it were found disturbance of the mechanisms of programmed cell death of the primary tumor due to reduced apoptosis; an increase in the number of lymphoid cells associated with the tumor, which are involved in the activation of angiogenesis in tumor tissue as producers of vascular endothelial growth factor; alteration of genetic stability of primary tumor cells, characterized by an increase in the number of aneuploids in the primary tumor, as well as an their content among cells of proliferative G₂/M+S phases of cell cycle. All of the above indicates more malignant phenotype of primary tumor cells.

Key words: stem cells, tumor process, dog, horse, cat, mouse.

Підписано до друку 01.10.2020 р. Формат 60x84\16
Ум. друк. арк. 1,9 Обл.-вид.арк. 1,9
Наклад 100 прим. Зам. № 200518

Віддруковано у редакційно-видавничому відділі НУБіП України
вул. Героїв Оборони, 15, Київ, 03041, тел.: 527-81-55
Свідоцтво суб'єкта видавничої справи ДК № 4097 від 17.06.2011

