

МІНІСТЕРСТВО НАУКИ І ОСВІТИ УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ БІОРЕСУРСІВ І
ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ УКРАЇНИ

Кваліфікаційна наукова праця
на правах рукопису

КЛАДНИЦЬКА ЛАРИСА ВОЛОДИМИРІВНА

УДК 636.6:612:546.289:549.23

ДИСЕРТАЦІЯ

МОРФОФУНКЦІОНАЛЬНІ ВЛАСТИВОСТІ СТОВБУРОВИХ
КЛІТИН ТА ЇХ ВПЛИВ НА ПУХЛИННИЙ ПРОЦЕС

16.00.02 – патологія, онкологія і морфологія тварин
(ветеринарні науки)

Подається на здобуття наукового ступеня доктора наук

Дисертація містить результати власних досліджень.

Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на
відповідне джерело

Л. В. Кладницька

Науковий консультант:
Мазуркевич Анатолій Йосипович,
доктор ветеринарних наук, професор,
академік НААН,
Заслужений діяч науки і техніки України

Київ – 2020

АНОТАЦІЯ

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

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

Дисертаційна робота присвячена вирішенню важливого науково-практичного завдання – дослідженню морфологічних, функціональних характеристик стовбурових клітин різного походження та їх системного впливу на пухлинний процес у тварин-реципієнтів.

Культуральними методами та світловою мікроскопією встановлено, що застосування модифікованого методу експланту при обробці жирової тканини більшого сальника та підшкірної дозволило отримати найбільшу кількість клітин з первинного матеріалу, з вищою колонієутворювальною здатністю – $8,7 \pm 1,2$ колоній ($p < 0,001$), проліферативною активністю – $735,50 \pm 45,2$ тисяч клітин ($p < 0,05$) та життєздатністю – $98,20 \pm 0,13$ % ($p < 0,05$). Достовірно вищу функціональну активність демонстрували клітини культури жирової тканини більшого сальника.

Фізіологічними та культуральними методами визначено оптимальний склад середовища для кріоконсервування стовбурових клітин культури жирової тканини, який містить 90% фетальної сироватки бичків та 10 % диметилсульфоксиду, і забезпечує достовірно кращу виживаність $2,37 \pm 0,03$ млн. клітин ($p < 0,01$), життєздатність $79,2 \pm 0,01$ % ($p < 0,01$) та індекс проліферації клітин $1,94 \pm 0,03$ ($p < 0,01$) після 30-ти добового зберігання.

Морфологічними методами та світловою мікроскопією встановлено, що морфологія стовбурових клітин культури червоного кісткового мозку змінюються в процесі культивування, що засвідчує початок реплікативного

старіння вже з 4-го 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-му пасажі до $853,78 \pm 36,71$ ($p < 0,01$), а на 12-му до $2304,40 \pm 280,12 \mu\text{m}^2$ за рахунок цитоплазми; біля ядра візуалізується комплекс Гольджі, що засвідчує активний стан проліферуючих клітин; з 4-го пасажу достовірно зменшується показник ядерноцитоплазматичного співвідношення і становить $0,2262 \pm 0,0074$ ($p < 0,01$), а на 12-му пасажі більш, ніж у чотири рази $0,0608 \pm 0,0066 \mu\text{m}^2$ ($p < 0,001$) через достовірне збільшення площі цитоплазми клітини.

Цитологічними методами та світловою мікроскопією встановлено зміну функціонального стану стовбурових клітин культури червоного кісткового мозку в процесі культивування, що засвідчує початок реплікативного старіння і характеризується наступним: знижується життєздатність клітин на 7-му пасажі до $88,33 \pm 1,94 \%$ ($p < 0,01$); збільшується вміст апоптичних клітин, що проявляли чутливість до безсироваткового культивування, на 7-му та 12-му пасажах культивування – $20,67 \pm 1,55$ ($p < 0,001$) та $22,67 \pm 1,55 \%$ ($p < 0,001$) відповідно. Підвищення чутливості клітин до апоптозу прямо корелювало з індукованою відсутністю факторів росту $r = 0,81$, $p < 0,001$.

Морфологічними та фізіологічними методами встановлено, що функціональний стан і морфологія стовбурових клітин культури жирової тканини змінюються у процесі культивування, що засвідчує перші ознаки реплікативного старіння з 7-го пасажу і характеризується наступним: на перших пасажах культивування клітини мають веретеноподібну форму з двома, трьома довгими виростами цитоплазми, площею ядра $161,11 \pm 5,65 \mu\text{m}^2$, 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-му пасажі до $135,78 \pm 11,21$, збільшенням площі клітин 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-му пасажі – $84,67 \pm 1,36$ ($p < 0,05$) та їх стійкість до апоптозу, індукованого культивуванням у середовищі без додавання сироватки на 7-му та 12-му пасажах культивування та становить $21,33 \pm 1,36$ ($p < 0,05$) та $23,67 \pm 0,97$ % ($p < 0,05$) відповідно; з 7-го пасажу достовірно зменшується показник ядерноцитоплазмове співвідношення і становить $0,2189 \pm 0,0122$ ($p < 0,01$), а на 12-му пасажі більш, ніж у два рази $0,1111 \pm 0,0086$ ($p < 0,001$) через достовірне збільшення площі цитоплазми клітини.

Методом проточної цитофлуориметрії визначено вміст клітин за фазами клітинного циклу в процесі культивування: ранні пасажі МСК культури червоного кісткового мозку характеризуються абсолютним вмістом диплоїдних клітин, з яких кількість проліферативного пулу $G_2/M+S$ $29,33 \pm 0,19$ %, у G_0/G_1 фазі становить $70,67 \pm 2,70$, що на пізніх – з 7-го пасажу відображується зменшенням кількості клітин проліферативного пулу $G_2/M+S$ до $20,33 \pm 1,27$ ($p < 0,01$) та збільшенням кількості у фазі G_0/G_1 до $79,62 \pm 0,84$ % ($p < 0,05$). Ранні пасажі МСК культури жирової тканини характеризуються високим вмістом 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 – $70,49 \pm 3,17$ %, та пізні – зменшенням вмісту диплоїдів до $96,51 \pm 0,38$ % ($p < 0,05$) та кількості клітин проліферативного пулу $G_2/M+S$ до $18,93 \pm 0,66$ % ($p < 0,05$).

Методом імуноцитохімії досліджено імунофенотип стовбурових клітин культури жирової та нервової тканини за ранніх та пізніх пасажів. 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 віментин- β -катенін сигнального шляху. Встановлено обернений кореляційний зв'язок $r = -0,78$ ($p < 0,05$) між кількістю пасажів культури та експресією маркерів проліферації Ki-67, PCN. 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 $\eta^2 = 0,74$ ($p < 0,05$).

За експресією ядерних, цитоплазматичних та мембранних білків стовбурові клітини культури нервової тканини характеризуються фенотипом: віментин – $299,0 \pm 0,6$, 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 активністю, рухливістю.

Методом газорідинної хроматографії встановлено спільні риси спектру жирних кислот МСК різного походження за ранніх пасажів, які підтверджують їх належність до стовбурових клітин: високий вміст олеїнової кислоти, що характерно для клітин, резистентних до апоптозу та з високим проліферативним потенціалом; високе співвідношення ненасиченої лінолевої до насиченої стеаринової кислоти (C18:1/C18.0), яке відображує активність фермента стеарол-СоА десатурази та активний стан Wnt/ β -катенін сигнального шляху. Стовбурові 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 стовбуровим

клітинам культури жирової тканини, активніше проявляти себе у впливі на імунні реакції, проліферації та диференціюванні клітин.

Біохімічним методом визначено активність сукцинатдегідрогенази мітохондрій гепатоцитів тварин-реципієнтів за впливу алогенних мезенхімних стовбурових клітин культури жирової тканини – $57,7 \pm 1,6$ ($p < 0,001$) та культури кісткового мозку – $53,3 \pm 1,4$ ($p < 0,01$).

Морфометричними методами встановлено, що за впливу стовбурових 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 у васкулярну стадію з показником кількості метастазів розміром 1,0-3,0 мм – 52,5 % ($p < 0,05$), що засвідчує активізацію перебігу захворювання.

Трансплантація алогенних мезенхімних стовбурових 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 злоякісний фенотип клітин первинної пухлини.

Застосування алогенних мезенхімних стовбурових 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 ($p < 0,05$) рази більшу, в яких виявлено гемостаз за типом складжу еритроцитів, осередки девіталізації пухлинної тканини, клітини у стані дистрофії з каріорексисом та

каріолізисом, ділянки некрозу, оточені дегенеративно зміненими пухлинними клітинами. Вказані морфологічні зміни засвідчують активізацію онкопроцесу.

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

SUMMARY

Kladnytska L.V. Morphofunctional properties of stem cells and their influence on the tumor process. – Qualifying scientific work on the rights of the manuscript.

The thesis for awarding a scientific degree of the doctor of veterinary sciences in specialty 16.00.02 "Pathology, oncology and morphology of animals ". 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, 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.

The estimation of physiological properties of the obtained stem cells, their immunophenotype, morphological features, cell cycle phase distribution, aneuploidy content and level of apoptosis in early and late passages, influence on immunocompetent organs - thymus and spleen, activity of peritoneal macrophages of intact animals were presented.

A comprehensive evaluation of the development of the tumor process in animals under the influence of allogeneic mesenchymal stem cells on the model of Lewis mouse carcinoma was performed.

It was established that the adipose derived and bone marrow derived stem cells changed their physiological characteristics, immunophenotypical and, morphological features, differed in the influence on the immunocompetent organs of intact animals.

In animals with transplanted carcinoma Lewis cells intravenous infusion of mesenchymal stem cells caused stimulation of primary tumor growth and metastasis; strengthening of angiogenesis, and faster transition of metastases to a vascular phase; increased the morphological degree of anaplasia, impaired sensitivity to the induction of programmed cell death, reduced the level of genetic stability of primary tumor cells; increased the pool of proliferating aneuploid cells. These changes indicated a more malignant course of the oncological disease under the systemic influence of mesenchymal stem cells.

By physiological methods it was established that the use of the modified explant method in the treatment of abdominal and subcutaneous fatty adipose tissue made it possible to obtain the greatest number of cells from the primary material with a higher colony forming capacity $8,7 \pm 1,2$ colonies ($p < 0,001$), proliferative activity $735,50 \pm 45,2$ thousand cells and viability $98,20 \pm 0,13$ % ($p < 0,05$).

Cytological methods and light microscopy have determined the optimal composition of the medium for cryopreservation of stem cells of adipose tissue culture, which contains 90 % fetal bovine serum and 10 % dimethyl sulfoxide, and provides a significantly better survival of $2,37 \pm 0,03$ million cells ($p < 0,01$), viability $79,2 \pm 0,01$ % ($p < 0,01$) and cell proliferation index $1,94 \pm 0,03$ ($p < 0,01$) after 30 days of storage.

Physiological methods and light microscopy of research have established a change in the functional state of stem cells of the culture of red bone marrow in the

process of cultivation, which testifies to the beginning of replicative aging and is characterized by the following: the viability of cells in the 7th passage to $88,33 \pm 1,94$ % ($p < 0,01$); an increase in the content of apoptotic cells that exhibited sensitivity to non-serous cultivation on the 7th and 12th cultivation passages was $20,67 \pm 1,55$ ($p < 0,001$) and $22,67 \pm 1,55$ % ($p < 0,001$) respectively. Increasing the sensitivity of cells to apoptosis directly correlated with the induced absence of growth factors ($r = 0,81$; $p < 0,001$).

Morphological methods of research with the use of light microscopy found that the morphology and functional state of stem cells of the culture of bone marrow are changing in the process of cultivation from the 4th passage and is characterized by the following: in the first passages of cultivation cells have spindle-shaped form with two long cytoplasm germs, the core area $154,44 \pm 6,23$ μm^2 , the area of the cell is $749,34 \pm 21,16$ μm^2 , which at the later - changes on the star with the formation of a significant number of cytoplasmic germs (events), an increase in the cell area already and the 4th passage to $853,78 \pm 36,71$ ($p < 0,01$), and on the 12th to $2304,40 \pm 280,12$ μm^2 due to the cytoplasm.

The physiological features of stem cells of fatty tissue culture in the process of cultivation

By physiological methods it has been established that the functional state and morphology of the stem cells of the fatty tissue culture changed in the process of cultivation, which confirms the first signs of replicative aging from the 7th passage and is characterized by the following: in the first passages of cultivation, the cells have a spindle-shaped shape with two, three long cytoplasm germs, the area of the nucleus is $161,11 \pm 5,65$ μm^2 , the cell area is $759,56 \pm 28,42$ μm^2 , which changes on the star-like shape in the late passages with the formation of a significant number of cytoplasm germs, a decrease in the area of the nucleus and the 12th passage to $135,78 \pm 11,21$ μm^2 , an increase in the cell area already on the 12th passage to $1416,90 \pm 151,97$ ($p < 0,001$), and on the 12th to $2304,40 \pm 280,12$ μm^2

due to cytoplasm; a Golgi complex is visualized near the nucleus, which confirms the active state of proliferating cells; the viability of cells on the 12th passage is reduced by $84,67 \pm 1,36$ ($p < 0,01$) and their resistance to apoptosis induced by cultivation in the medium without adding serum; from the 7th passage the indicator of the nuclear-cytoplasm ratio is significantly reduced and is $0,2189 \pm 0,0122$ ($p < 0,01$), and on the 12th passage more than twice $0,1111 \pm 0,0086$ ($p < 0,001$) due to a significant increase in the area of the cytoplasm of the cell; an increase in the content of apoptotic cells that exhibited sensitivity to non-serial cultivation on the 7th and 12th cultivation passages was $21,33 \pm 1,36$ ($p < 0,05$) and $23,67 \pm 0,97$ % ($p < 0,05$) respectively.

Morphological methods and light microscopy revealed that the morphology of the stem cells of the culture of red bone marrow varies in the process of cultivation, which testifies to the beginning of replicative aging from the 4th passage and is characterized by the following: in the first passages of cultivation, the cells have a spindle-shaped shape with two long cytoplasm germs, an area nuclei $154,44 \pm 6,23$, cell area $749,34 \pm 21,16$, which in the late – changes on the star with the formation of a significant number of cytoplasmic germs (events), an increase in cell area. It is already on the 4th passage to $853,78 \pm 36,71$ ($p < 0,01$), and on the 12th to $2304,40 \pm 280,12 \mu\text{m}^2$ due to the cytoplasm; a Golgi complex is visualized near the nucleus, which confirms the active state of proliferating cells; from the 4th passage the indicator of the nuclear cytoplasm ratio is significantly reduced and is $0,2262 \pm 0,0074$ ($p < 0,01$), and on the 12th passage more than four times $0,0608 \pm 0,0066$ ($p < 0,001$) due to a significant increase in the area of the cytoplasm of the cell.

The changes in cell content during cell cycle phases were determined by the method of flow cytofluorometry: the early passages of MSCs of adipose tissue are characterized by a high content of diploid cells – $98,45 \pm 0,39$ % with high percent of G2/M+S proliferative pool – $29,51 \pm 3,56$ %. Diploid cell count $96,51 \pm 0,38$ % ($p < 0,05$) and cells of proliferative pool $18,93 \pm 0,66$ % ($p < 0,05$) decreased at late

passages. Early passages of MSCs of bone marrow culture are characterized by the absolute content of diploid cells, of which the large number of proliferative pool G2/M+S was $29,33 \pm 0,19$ % and cells in the G0/G1 phase was $70,67 \pm 2,70$ %. From the 7th passage a decrease of proliferative pool cells up to $20,33 \pm 1,27$ ($p < 0,01$) and a corresponding increase of cells in the G0/G1 phase to $79,62 \pm 0,84$ % ($p < 0,05$) were found.

The expression of nuclear, membrane and cytoplasmic proteins of stem cells of adipose tissue in early and past passages was investigated by immunocytochemistry.

The common features of MSCs of various origins in the early passages, which confirm their belonging to stem cells were found by gas-liquid chromatography: high content of oleic acid, typical for apoptosis-resistant cells with high proliferative potential; a high ratio of unsaturated linoleic to saturated stearic acid (C18:1/C18:0), which reflects the activity of the stearyl-CoA desaturase enzyme and the active state of the Wnt / B-catenin signaling pathway.

The activity of succinate dehydrogenase in mitochondria of hepatocytes of recipient animals under the influence of allogenic mesenchymal stem cells from adipose tissue culture $57,7 \pm 1,6$ ($p < 0,001$) and bone marrow cultures $53,3 \pm 1,4$ ($p < 0,01$) was determined by biochemical method.

By morphometric methods in mice with with transplanted carcinoma lung Lewis and injection of mesenchymal stem cells it was found an increase in the mass of the primary tumor $2,57 \pm 0,21$ g ($p < 0,05$), the total volume of metastases $29,62 \pm 6,50$ mm³ ($p < 0,05$), the number of metastases of 1,0-3,0 mm³ up to 52,5 % ($p < 0,05$) which indicate on faster transition into the vascular stage on tumor growth.

By flow cytofluorometry in animals with transplanted lung carcinoma of Lewis and injection of allogeneic MSCs more malignant phenotype of primary tumor cells was revealed: increased number of aneuploids up to $76,68 \pm 1,99$ %

($p < 0,001$); increased cells of proliferative pool up to $68,02 \pm 3,42$ % ($p < 0,001$), reduced sensitivity to apoptosis $41,82 \pm 1,37$ % ($p < 0,001$).

By morphological methods it have established that under influence of MSC the number of blood vessels in the primary tumor increased in 1.3 times. Signs of hemostasis, areas of necrosis surrounded by degenerative tumor cells, numerous cells with signs of cariorexis and carriolysis were detected.

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

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 мононуклеарних 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 мононуклеарних 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. Ґжицького. 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. Ґжицького. 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 C57Bl/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 C57Bl/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 легень 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 легень 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 природо-користування 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. **Кладницкая 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., **Кладницкая 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) А61 К35/30 (2015.01) А61 Р25/00. Спосіб отримання нейральних стовбурових клітин кота: 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 кота 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 мишей 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 природо-користування 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 порівно 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 Iu. O., Bokotko R. R., Dovgopol N. I., Velychko V. S., Ryzukova 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. Р. 14. *(Здобувачем досліджено активність сукцинатдегідрогенази мітохондрій печінки мишей за впливу стовбурових клітин).*

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СИМВОЛІВ, ОДИНИЦЬ, СКОРОЧЕНЬ	32
ВСТУП	35
 РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	 48
1.1 Визначення терміну стовбурових клітин Міжнародним товариством клітинної терапії	48
1.2 Джерела отримання стовбурових клітин	54
1.3 Методи отримання та обробки первинного матеріалу – джерела адгезивної фракції моноклеарних клітин з високою проліферативною активністю	60
1.4 Жирнокислотний склад ліпідів мезенхімних стовбурових клітин та його біологічне значення	68
1.5 Імуномодуючі властивості мезенхімних стовбурових клітин різного походження	71
1.6 Мезенхімні стовбурові клітини і пухлинний ріст	80
1.7 Пригнічення пухлинного росту за впливу мезенхімних стовбурових клітин	81
1.8 Активація пухлинного росту за впливу мезенхімних стовбурових клітин	85
1.9 Активація ангиогенезу у стромі пухлин за впливу мезенхімних стовбурових клітин	89
1.10 Вплив МСК на клітини імунної системи тварин-пухлиноносіїв	91
1.11 Активація епітеліально-мезенхімального переходу за впливу мезенхімних стовбурових клітин	93
1.12 Вплив мезенхімних стовбурових клітин на регуляцію	

процесів апоптозу в пухлинних клітинах	96
1.13 Вплив мезенхімних стовбурових клітин на індукцію пухлинного росту в організмі реципієнтів	102
Висновок до розділу 1	104
РОЗДІЛ 2. ВИБІР НАПРЯМКІВ ДОСЛІДЖЕНЬ, МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ	107
Висновок до розділу 2	145
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ВЛАСНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ	147
3.1. Отримання стовбурових клітин та їх морфофункціональні властивості	147
3.1.1. Обробка первинного матеріалу та отримання стовбурових клітин культури жирової тканини тварин.	147
3.1.2. Отримання стовбурових клітин культури нервової тканини	149
3.1.3. Функціональна активність мезенхімних стовбурових клітин культури жирової тканини більшого сальника собаки залежно від умов обробки та культивування первинного матеріалу	153
3.1.4. Функціональна активність мезенхімних стовбурових клітин культури підшкірної жирової тканини собаки залежно від умов обробки та культивування первинного матеріалу	159
3.1.5. Порівняльна характеристика функціональної активності мезенхімних стовбурових клітин культур жирової тканини більшого сальника та підшкірної	163
3.1.6. Отримання первинного матеріалу та функціональна активність мезенхімних стовбурових клітин культури підшкірної жирової тканини коня залежно від умов обробки та культивування первинного матеріалу	166
3.1.7. Функціональна активність мезенхімних стовбурових	

клітин кісткового мозку залежно від умов обробки та культивування первинного матеріалу	173
3.1.8. Функціональна активність, ядерно-цитоплазмове співвідношення мезенхімних стовбурових клітин кісткового мозку мишей за різних пасажів культивування	178
3.1.9. Клітинний цикл мезенхімних стовбурових клітин культури кісткового мозку за різних пасажів культивування	184
3.1.10. Морфологія та функціональна активність мезенхімних стовбурових клітин культури жирової тканини миші за різних пасажів культивування	188
3.1.11. Клітинний цикл мезенхімних стовбурових клітин культури жирової тканини за різних пасажів культивування	192
3.1.12. Імунофенотипова характеристика мультипотентних стовбурових клітин жирової тканини собаки на різних етапах культивування	196
3.1.13. Імунофенотипова характеристика стовбурових клітин культури нервової тканини kota за різних пасажів культивування	204
3.1.14. Імунофенотипова характеристика стовбурових клітин культури кісткового мозку мишей на різних етапах культивування	208
3.1.15. Жирнокислотний склад ліпідів стовбурових клітин культури кісткового мозку, жирової та нервової тканин	211
3.1.16. Біологічна активність мезенхімних стовбурових клітин культури жирової тканини за кріоконсервування методом вітрифікації при застосуванні кріосередовищ різного складу	231
Висновки до підрозділу 3.1	236
3.2. Вплив мезенхімних стовбурових клітин на стан	

інтактних тварин-реципієнтів	240
3.2.1. Вплив алогенних мезенхімних клітин кісткового мозку на функціональний стан імунних органів мишей лінії C57Bl/6	240
3.2.2. Вплив алогенних мезенхімних стовбурових клітин культури жирової тканини на функціональний стан імунних органів мишей лінії C57Bl/6	247
3.2.3. Характеристика впливу алогенних мезенхімних клітин кісткового мозку та жирової тканини на функціональний стан імунних органів мишей лінії C57Bl/6	252
3.2.4. Біохімічні показники сироватки крові мишей C57Bl/6 та функціональний стан гепатоцитів за трансплантації алогенних МСК культури червоного кісткового мозку та жирової тканини	255
3.2.5. Активність сукцинатдегідрогенази внутрішньої мембрани мітохондрій печінки тварин за впливу алогенних мезенхімних стовбурових клітин	257
3.2.6. Вплив трансплантації алогенних МСК на оксигензалежний метаболізм перитонеальних макрофагів мишей C57Bl/6	260
3.2.7. Вплив трансплантації алогенних МСК на розвиток пухлин у мишей C57Bl/6	261
Висновки до підрозділу 3.2	261
3.3. Вплив мезенхімних стовбурових клітин на канцерогенез на моделі метастазуючої карциноми легені Льюїс	263
3.3.1. Вплив мезенхімних стовбурових клітин на швидкість росту і метастазування перевивної карциноми легені Льюїс	263
3.3.2. Мікроскопічні зміни в скелетних м'язах мишей з	

трансплантованою карциномою легені Льюїс	269
3.3.3. Мікроскопічні зміни в скелетних м'язах мишей з трансплантованою карциномою легені Льюїс при застосуванні мезенхімних стовбурових клітин	280
3.3.4. Вплив алогенних мезенхімних стовбурових клітин на чутливість до індукції апоптозу та рівень генетичної стабільності клітин первинної пухлини мишей C57Bl/6 з перещепленою карциномою легені Льюїс	298
Висновки до підрозділу 3.3	302
РОЗДІЛ 4. АНАЛІЗ І УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕНЬ	304
ВИСНОВКИ	330
ПРАКТИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ	336
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	337
ДОДАТКИ	394

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СИМВОЛІВ, ОДИНИЦЬ, СКОРОЧЕНЬ

АлАт – аланін амінотрансфераза

АМФ – аденозин монофосфат

АсАт – аспартат амінотрансфераза

ДК – дендритні клітини

ДМСО – диметилсульфоксид

ДСН – додецилсульфат натрію

ЕМП – епітеліо-мезенхімний перехід

ЖК – жирні кислоти

ІЛ – інтерлейкін

мкАТ – моноклональні антитіла

МСК – мезенхімні стовбурові клітини

МСК ЖТ – МСК культури жирової тканини

МСК КМ – МСК культури кісткового мозку

НЖК – насичені жирні кислоти

НК – натуральні кілерні клітини

ННЖК – ненасичені жирні кислоти

НСТ – нітросиній тетразолій

НУБіП – Національний університет біоресурсів і природокористування

СДГ – сукцинатдегідрогеназа

СК– стовбурові клітини

СКП – стовбурові клітини пухлини

СМЧ– субмітохондріальні частинки

ФБР – фосфатно-буферний розчин

ФГА – фітогемаглютинін (phytohaemagglutinin)

ФМА – форбол-12-миристат-13-ацетата

ЦОГ – циклооксигеназа

ЯЦС – ядерно-цитоплазмове співвідношення

CAF – пухлино-асоційовані фібробласти (cancer-associated fibroblasts)

CCL2 – C-C мотив ліганду 2 (C-C motif ligand 2)

DAB – діамінобензидин (diaminobenzidine)

DMEM – середовище Ігла, модифіковане Дульбеко (Dulbecco's Modified Eagle Medium)

EDTA, ЕДТК – етилендиметилтетраоцтова кислота (ethylenedimethyltetraacetic acid)

ERK – кінза, яка регулюється позаклітинними сигналами (extracellular signal-regulated kinase)

FADD – білок, асоційований з Fas рецептором, що містить «домен смерті» (Fas-associated protein with death domain)

FBS – фетальна сироватка бичків (fetal bovine serum)

HIF-1 α – гіпоксія-індукований фактор 1-альфа (hypoxia-inducible factor 1-alpha)

HLA – антигени гістосумісності (Human Leukocyte Antigens)

H-score – гістохімічна оцінка (Histochemical score)

IDO – індоламін 2,3 діоксигеназа (indoleamine 2,3-deoxygenase)

iNOS – індукцйбельна синтаза окису нітрогену (inducible nitric oxide synthase)

ISCT – Міжнародне товариство клітинної терапії (International Society for Cellular Therapy)

LIF – фактор інгібіції лейкемії (leukemia inhibitory factor)

LLC – карцинома легені Льюїс (Lewis lung carcinoma)

MCP-1 – білок-1 хемоаттракції моноцитів (monocyte chemoattractant protein-1)

NADH – нікотинамідаденіндинуклеотид (nicotinamide adenine dinucleotide)

Nrf2 – фактор 2, асоційований з еритроїдним ядерним фактором 2 (nuclear factor erythroid 2-related factor 2)

PAFR – рецептор фактору, що активує тромбоцити (platelet-activating factor receptor)

PCNA – ядерний антиген проліферуючих клітин (proliferative cell nuclear antigen)

PD1-L – ліганд білка програмованої клітинної смерті (programmed cell death 1 ligand 1)

PI3K – фосфатадил-інозитол-3 кінза (phosphatidyl-inositol-3-kinase)

PKA – протеїн кінза А (protein kinase A)

PTEN – гомолог фосфатази і тензіну, делетований на хромосомі 10 (phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome ten)

JAK – (Janus Kinase) Сімейство асоційованих з рецепторами кінз

JAK / STAT – Сигнальний шлях – один з консервативних шляхів регуляції у вищих еукаріот, що відіграє важливу роль у різних процесах онтогенезу

SCD – стеарол-CoA десатураза (Stearoyl-CoA desaturase)

STAT – (Signal Transducer and Activator of Transcription) — активатор транскрипції, що бере участь у передачі сигналу

TCF – Т-клітинний фактор транскрипції (T-cell factor)

TGF- β – трансформуючий фактор росту бета (transforming growth factor beta)

Th17 – Т-хелпери 17; Т-клітини, які секретують ІЛ-17 (T helper 17 cells)

VEGF – фактор росту ендотелію судин (vascular endothelial growth factor)

$\lambda_{\text{еміс}}$ – довжина хвилі λ емісії

ВСТУП

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 [101, 117, 143, 281, 323, 335]. 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 [439, 475], ішемічної хвороби серця [246, 402]. Найбільш значущою для подальшого використання стовбурових клітин, крім їх здатності до комітації в різних напрямках, є імуномодельююча та імуносупресивна властивість [261, 267], що є підґрунтям для використання їх у лікуванні аутоімунних захворювань, хворобі трансплантат проти власника, хронічному гепатиті і цирозі печінки [88, 133, 216, 227, 311], запаленні легень [94, 303, 436], септичних процесах [89, 70, 296], 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 [116, 156, 160, 209, 301, 382]. 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 [2, 6, 8 – 18, 21, 22, 24, 25, 27, 29 – 46, 48, 49, 52 – 54, 56 – 58, 63, 65, 187 – 189, 238 – 241, 288, 289, 354, 371, 416, 435, 442, 443, 447].

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. Відсутні стандарти визначення критичних характеристик стовбурових клітин тваринного походження. Остаточно 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 [90, 93, 198, 284, 389].

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 злоякісно 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 [86, 87, 212, 262, 273, 297, 305, 327, 438], так і сприяти його промоції [108, 109, 111, 178, 213, 440]. 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 $G_2/M+S$.

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 $\eta^2=0,79$ ($p<0,05$), Е-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 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; 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±1,99 % ($p<0,001$) та їх кількості серед клітин проліферативного пулу G₂/M+S – 68,02±3,42 % ($p<0,001$), що засвідчує злякніший 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±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 кота».

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.); симпозіумі «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. Дніпро-петровськ, 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 природо-користування 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. Третьевича «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.

РОЗДІЛ І

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Визначення терміну стовбурових клітин Міжнародним товариством клітинної терапії

Мезенхімні стовбурові клітини (МСК) – мультипотентні клітини, які здатні до самооновлення та формування більш комітованих клітинних елементів мезенхімного (кісткової, жирової, хрящової тканини) та іншого походження. Історія дослідження МСК починається з робіт Фріденштейна та співавторів, які вперше ідентифікували стовбурові клітини у кістковому мозку та селезінці морської свинки [186]. В серії експериментів, проведених протягом 1960 - 1970-х років, автори показали, що такі клітини відрізняються від більшості клітин кісткового мозку наступними властивостями:

- адгезією до пластика;
- фібробластоїдною морфологією;
- здатністю формувати колонії фібробластів з однієї клітини, яка згодом отримала назву колонієутворююча одиниця фібробластів;
- здатністю до самопідтримування та регенерації в різноманітні клітини мезенхімного походження [363].

Вони дали їм назву – стромальні клітини кісткового мозку [185]. Термін «строма» широко використовується у морфології для позначення основної опорної структури тканин. Оскільки в досліджах Фріденштейна, Owen виявлені ними клітини формували колонії, здатні до утворення кісткової тканини, автори зробили слушний висновок, що завдяки проліферації цих клітин формується унікальний каркас, необхідний для підтримання життєдіяльності кровотворних клітин кісткового мозку. Однак, в подальшому, коли МСК були отримані не тільки з клітин кісткового мозку,

але і з інших джерел, цей термін значно звужував характеристику МСК і використовується лише при характеристиці МСК кісткового мозку.

З перших робіт Фріденштейна, значна увага приділялась морфології МСК. За даними більшості дослідників, МСК мають веретеноподібну фібробластоїдну форму з наявністю двох довгих симетричних виростів цитоплазми, чітко помітним ядром, ядерцями і цитоплазматичною перинуклеарною зернистістю, яка вказує на секреторну активність [140]. Клітини мають виражену адгезію до пластику, хоча у первинних культурах протягом перших діб культивування, можна спостерігати значну кількість округлих клітин, також прикріплених до пластику. Така картина найбільш характерна для первинних культур кісткового мозку, тоді як для первинних культур з жирової тканини протягом перших 3-4 діб культивування спостерігаються полігональні клітини з вакуолізованою цитоплазмою. Однак після 1-го пасажу морфологія МСК з кісткового мозку та жирової тканини подібна [51]. Інші результати отримані Анохіною і Буракіною [3]. Вони стверджують, що, навпаки, ранні культури МСК відрізняються гетерогенністю і представлені типовими веретеноподібними клітинами; зіркоподібними; округлими; гігантськими полігональними; з одним довгим виростом цитоплазми та іншими формами. На пізніх пасажах популяція МСК стає більш мономорфною. Автори вважають, що зміни морфології відображають проліферативну активність клітин та їх здатність до диференціювання у різних напрямках. За даними Волкова та співав., в культурах МСК з кісткового мозку зустрічаються веретеноподібні клітини; клітини з декількома виростами; округлі клітини з більш великими ядрами. В культурах МСК з жирової тканини переважають клітини фібробластоїдної морфології із значною кількістю вакуолей та гранул в цитоплазмі [62]. Є дані, що на морфологічні особливості МСК має вплив склад пластику, що зумовлює різний ступінь адгезії клітин та їх проліферативну активність. При цьому в культурах з високим проліферативним потенціалом переважають

фібробластоїдні і веретеноподібні клітини, а в культурах з низькою швидкістю росту – крупні розпластані та зіркоподібні клітини [50].

Термін «мезенхімні стовбурові клітини» був уведений 1991 р. Caplan [117]. У одній з нещодавно опублікованих робіт Caplan пояснює, що він запропонував цей термін, враховуючи клоногенність та мультипотентність при культивуванні *in vitro* вказаної популяції клітин [118]. В даний час, згідно рекомендаціям Міжнародного товариства з клітинної терапії, ці клітини прийнято називати мультипотентними мезенхімними стромальними (стовбуровими) клітинами [335]. Таким чином, в останній назві поєднані практично всі відомі характеристики даного типу клітин.

Пізніше піонерські дані Фріденштейна та співавторів були підтверджені в багатьох інших лабораторіях. Встановлено, що МСК мають потенцію диференціюватись в хондроцити, адипоцити, остеобласти, і присутні не тільки у тварин, але і у людини [130, 251]. За певних умов МСК можуть також диференціюватись у міобласти, гепатоцити, епітелій підшлункової залози, ендотелій судин, нейрони та астроцити [85, 321].

Така характеристика МСК як поліпотентність, здатність до диференціювання у різних напрямках, викликала великий інтерес дослідників, оскільки відкрились можливості до розробки нових підходів у регенераторній медицині (табл.1) [83, 84].

Водночас виникло питання щодо стандартизації культур МСК, враховуючи різні джерела і методи отримання, задля їх безпечного введення в організм реципієнта та отримання бажаного терапевтичного ефекту.

В 2006 р. на щорічному засіданні (Берлін, Німеччина) Міжнародного товариства клітинної терапії (International Society for Cellular Therapy, ISCT) було запропоновано мінімальні критерії для визначення популяції МСК людини [335, 439].

Нині, згідно вказаним рекомендаціям Міжнародного товариства з клітинної терапії, МСК людини, незалежно від походження (кістковий мозок,

жирова тканина, плацента тощо) мають характеризуватись наступними властивостями:

- здатністю до адгезії до культурального пластика;
- експресією антигенів CD105, CD73 і CD90;
- відсутністю експресії антигенів CD45, CD34, CD14/CD11b, CD79 α , CD19 і антигенів гістосумісності (HLA) II класу;
- здатністю до диференціювання у остеобласти, хондробласти та адипоцити.

Таблиця 1.

Характеристика стовбурових клітин

Потенціал диференціювання	Число клітинних типів	Приклад типу клітин	Результат диференціювання
Тотипотентність	усі	Зігота, бластомер	Усі типи клітин
Плюрипотентність	Майже усі (трофобласт)	Ембріональні стовбурові клітини	Клітини, похідні трьох зародкових листків
Мультипотентність	Багато	Гемопоетичні стовбурові клітини	Клітини крові
Олігопотентність	Декілька	Лімфоїдні клітини-попередники	Т- і В-лімфоцити
Уніпотентність	Один	попередники тучних клітин	Тучні клітини
Нуліпотентність	нуль	Немає поділу	Термінальне диференціювання

Жоден з перелічених антигенів не є специфічним саме для МСК, оскільки вони також виявляються і на інших типах клітин. Їх експресія скоріше відображає функціональні властивості МСК.

Антиген CD105 відомий також під назвою ендоглін, оскільки він експресується у найбільшій кількості на клітинах ендотелію судин. Відноситься до допоміжних рецепторів трансформуючого фактору росту бета (TGF- β , transforming growth factor beta). Крім ендотелію і МСК,

експресія CD105 виявлена на трофобластах плаценти, фібробластах, хондроцитах, гемопоетичних клітинах – попередниках. Експресія CD105 забезпечує аутокринну активацію МСК, оскільки вони також синтезують і секретують TGF- β [120]. Рівень експресії CD105 на МСК може бути різним. В літературі існують протилежні думки щодо зв'язку експресії CD105 зі здатністю МСК до диференціювання в різних напрямках. Так, за даними Jiang et al., Ishimura et al., МСК з високим рівнем експресії CD105 більш здатні до диференціювання в хондроцити [162, 377], тоді як МСК з низькою експресією антигену – у напрямку кісткових клітин [375]. Anderson et al. показали, що CD105-негативні МСК більш активно диференціюються у адипоцити і остеоцити та пригнічують проліферацію Т-клітин, ніж CD105⁺ МСК [119]. Водночас Cleary et al. не виявили розбіжності у здатності до диференціювання залежно від експресії CD105 [179].

Антиген CD73 – екто-5'-нуклеотідаза, яка перетворює позаклітинний аденозин монофосфат (АМФ) у аденозин [121, 151]. Крім МСК, антиген представлений на широкому колі клітин – фібробластах, лімфоцитах, ендотеліальних і епітеліальних клітинах, клітинах гладких м'язів. Аденозин активує специфічні G рецептори клітин, що підвищує рівень циклічного АМФ та впливає на функцію клітин. Зокрема, це призводить до пригнічення функції Т-лімфоцитів ефекторів, натуральних кілерних клітин, дендритних клітин; до зміни профілю секреції цитокінів моноцитами / макрофагами (активація синтезу антизапальних і пригнічення синтезу прозапальних цитокінів), активації утворення Т-регуляторних клітин; активації синтезу факторів росту судин у ендотеліальних клітинах тощо [80, 136, 151]. З експресією CD73 пов'язують імуносупресивні властивості МСК та здатність активувати ангіогенез. Tan et al. показали, що МСК жирової тканини мишей за рівнем експресії CD73 неоднорідні, і клітини з високою експресією CD73 мають більш виразні імуносупресивні властивості, ніж субпопуляція МСК з низькою експресією антигену [121, 344].

Антиген CD90 має другу назву – Thy1, оскільки вперше він був виявлений на тимоцитах. Відноситься до білків, представлених на поверхневих мембранах завдяки глікозилфосфатидилінозинному якорю. Приймає участь у процесах міжклітинної адгезії та взаємодії клітин з матриксом мікрооточенням [122, 401]. Накопичуються дані, що CD90 відіграє критичну роль у вирішенні долі МСК: експресія антигену, асоційована з остеогенним напрямком диференціювання і пригніченням утворення ади поцитів [449].

Нещодавно відкрито новий маркер МСК – експресію молекули GPCR5 (Lgr5), що відноситься до великої родини трансмембранних рецепторів, пов'язаних з G – білками [190]. Вважають, що зв'язування GPCR5 чисельними лігандами активує Wnt / ERK сигнальні шляхи в клітині та сприяє самопідтримці МСК. Крім того, МСК з гіперекспресією Lgr5 мають переваги у диференціюванні в остеоцити [265].

Вказані мінімальні характеристики МСК не відображають їх функціональні властивості у повній мірі. В медичній практиці МСК найчастіше використовуються у лікуванні захворювань з імунним (запальним) компонентом та при репарації / відновленні тканин. Тому у робочих групах ISCT активно розробляються критерії оцінки в культурі *in vitro* (до введення в організм реципієнта) вірогідного впливу МСК на функціональну активність клітин імунної та інших систем організму [421]. Зокрема, для визначення вірогідного впливу на ангіогенез пропонується дослідження синтезу (за рівнем експресії мРНК) та секреції (за концентрацією у культуральному середовищі) інтерлейкіну 8, ендотеліального фактору росту судин, лігандів рецепторів хемокінів, оскільки у попередніх експериментах встановлена чітка залежність між активністю вказаних факторів в МСК в культурах *in vitro* та відповідним ефектом в системі *in vivo* [159, 317].

При оцінці достовірного впливу МСК на імунну систему реципієнтів потрібно враховувати той факт, що функціональні властивості МСК значно залежать від спектру цитокінів і хемокінів у мікрооточенні. Тому використовують попередню активацію МСК в культурі за допомогою гама-інтерферону (10 нг/мл) як моноагента, або в комбінації з фактором некрозу пухлин альфа (15 нг/мл) протягом 40 годин [230]. В подальшому пропонується оцінювати вплив активованих МСК на різні популяції клітин імунної системи при спільному культивуванні і визначати:

- появу субпопуляції імунорегуляторних Т-клітин (за фенотипом CD4⁺/CD25⁴/FoxP3⁺/CD127⁻);
- ознаки активації моноцитів / макрофагів за підвищенням експресії антигенів CD80, CD86, антигенів гістосумісності II класу та зниженням експресії антигену CD14;
- функціональну активність макрофагів за секрецією у культуральне середовище інтерлейкінів та рівнем експресії мРНК індоламін 2,3 діоксигенази і простагландину E2;
- функціональну активність нейтрофілів за секрецією у культуральне середовище інтерлейкінів, виділенням супероксидних радикалів, підвищенням експресії на поверхневих мембранах антигенів CD16 та CD11b [244].

Van Balkom et al. пропонують оцінювати білковий вміст позаклітинних везикул, які продукують МСК [464].

Ці показники доклінічної оцінки функціональних властивостей МСК людини активно обговорюються, але вони поки ще не прийняті в якості обов'язкового тесту оцінки МСК [256, 272, 277, 322]. В доступній літературі ми не знайшли робіт щодо проведення аналогічного оцінювання функціональних властивостей МСК тварин.

Таким чином, одним з основних питань при застосуванні у клінічній практиці препаратів МСК є їх стандартизація та оцінка функціональних

властивостей до введення в організм реципієнта [67, 77, 126, 280]. По відношенні до МСК тварин подібні дослідження поки знаходяться у стадії розробки.

1.2. Джерела отримання стовбурових клітин

Джерелом для отримання МСК можуть бути різні органи і тканини, однак частіше це кістковий мозок, жирова тканина, пульпа зуба, пупковий канатик та інші органи і тканини [73, 75, 96, 139, 140, 144, 194, 278]. МСК різного походження мають спільні риси, притаманні саме стовбуровим клітинам, однак мають і певні відмінності. Наприклад, МСК, отримані з амніотичної рідини, мають більшу здатність до диференціювання у напрямку клітин кісткової і хрящової тканини, ніж МСК, отримані з жирової тканини [82].

Найбільш ретельно охарактеризовані МСК кісткового мозку. Порівняно з МСК, отриманих з інших джерел, вони мають довший період реплікації, в них раніше відбувається процес старіння в культурі, їх кількість серед інших клітин кісткового мозку незначна – 0,01 – 0,001 % усіх ядерних клітин [128].

МСК культури жирової тканини людини вперше були отримані у 2001 році Zuk et al. [346]. Виявилось, що жирова тканина містить приблизно у 500 разів більше стовбурових клітин, ніж кістковий мозок. Крім того, отримані з жирової тканини МСК секретують більшу кількість цитокінів і ростових факторів з протизапальними, антиапоптотичними та імунорегуляторними властивостями. Серед них – фактор росту ендотелію судин, фактор росту гепатоцитів, інсуліно-подібний фактор росту. Так, за даними Jervis et al., в культурах МСК ЖТ відбувалась більш виразне диференціювання клітин у напрямку ендотелію судин порівняно з культурами МСК КМ [138]. Тому функціональний вплив на організм реципієнтів МСК, отриманих з жирової

тканини, більш виразний, ніж МСК з кісткового мозку [272]. Nuaman et al. встановили більш низький рівень експресії антигенів гістосумісності I і II класу на МСК ЖК і зробили висновок щодо нижчої їх імуногенності порівняно з МСК з кісткового мозку [235]. Додатковою перевагою є відносно простий спосіб отримання первинного матеріалу шляхом ліпосакції, при проведенні якої кількість видаленої жирової тканини може досягати декількох літрів, життєздатність первинного матеріалу досягати 98 – 100 %, а частота ускладнень від проведення даної процедури не перевищує 0,1 % [75]. Підсумовуючі існуючі в літературі дані, Strioga et al. стверджують, що МСК з жирової тканини і кісткового мозку мають спільні фенотипові риси і функціональні властивості, однак дещо розрізняються за імунофенотипом, імуномодельюючою активністю, потенцією до диференціювання, і у більшості випадків застосуванні МСК ЖТ з терапевтичною метою є більш ефективним, ніж МСК КМ [403].

МСК, отримані з пульпи зуба, мають ектомезенхімальне походження. Тому, хоча вони переважно диференціюються в одонтобласти, які продукують дентин, за певних умов з них можливо отримати клітини нервової тканини, меланоцити, епітеліальні клітини рогівки ока, бета-клітини підшлункової залози [376, 392]. Terunuma et al. порівняли спектр генної експресії в МСК з пульпи зуба та з жирової тканини. Якщо в МСК ЖТ найбільш активними були гени, асоційовані з ангіогенезом та ростом волосяних фолікулів, то в МСК з пульпи зуба спектр експресії генів нагадував такий у нейронах [139]. Тому найбільш перспективним є застосування МСК з пульпи зуба при неврологічних захворюваннях, насамперед лікуванні наслідків гострого порушення мозкового кровообігу [316, 451, 463], а також для регенерації зубної тканини [350].

МСК синовіального походження характеризуються підвищеним проліферативним потенціалом і здатністю до диференціювання в остеогенному (за умов введення у кісткову тканину) та хондрогенному

напрямку (за умов введення у хрящову тканину). Тому їх застосування особливо перспективне при пошкодженнях зв'язувального апарату, остеоартритах, травмах меніску [103, 330]. Однак, інші автори не виявили суттєвих розбіжностей між МСК синовіального та кістково-мозкового походження стосовно напрямків диференціювання [144]. Утворення хондроцитів значно підвищується при культивуванні МСК синовіального походження у присутності TGF- β та морфогенетичного білка кісток [103].

МСК шкіри також мають високий проліферативний потенціал. Вони переважно диференціюються у клітини нейрогенного походження, гліальні, гладко-м'язові, інсулін-продукуючі клітини підшлункової залози, однак мають обмежену здатність до утворення клітин мезенхімної лінії [221, 281]. Такий напрям диференціювання пов'язаний з тим, що частина МСК шкіри відноситься до стовбурових клітин нервового гребінця і експресує антиген CD271 – низько-афінний рецептор фактору росту нейронів [434].

На відміну від людей, кількість досліджень, проведених по отриманню і характеристиці МСК дрібних домашніх тварин, значно менша. Відносно широко представлена інформація щодо отримання МСК коней з метою подальшого використання при лікуванні травматичних пошкоджень сухожилків, зв'язувального апарату, за артрозів [132]. Переважним чином МСК коней отримували з жирової тканини (МСК ЖТ) і кісткового мозку (МСК КМ). Remacha et al. порівняли функціональні характеристики таких клітин [180]. Встановлено, що обидва типи МСК експресують антигени CD90 і CD44, у змішаній культурі пригнічують проліферацію алогенних лімфоцитів, індуковану фітогемаглютиніном (ФГА), причому МСК ЖТ мають дещо більш виразні імуносупресивні властивості.

Longhini et al. вперше показали, що МСК кісткового мозку коней можуть бути успішно мобілізовані у периферичну кров за впливу на певні точки акупунктури [368]. Отримані з 60 мл периферичної крові клітини формували моношар фібробластоїдних клітин з експресією антигенів CD90,

CD73, CD146 і CD44; пригнічували ФГА-стимульовану проліферацію лімфоцитів у змішаній культурі та підвищували секрецію лімфоцитами протизапального цитокіна інтерлейкіна (ІЛ) 10. При внутрішньовенному введенні МСК у 21 з 24 тварин, хворих на остеоартроз, спостерігали значне зменшення хромоти.

У собак МСК, у більшості випадків, також були отримані з кісткового мозку та жирової тканини. У дослідженні Vieira et al. показано, що МСК, отримані з жирової тканини за ліпосакції, мають фібробластоподібну морфологію, тривалий час персистують в умовах *in vitro* зі стабільним показником подвоєння популяції і без суттєвих ознак старіння культури, мають мезенхімне походження за експресією антигенів поверхневих мембран і цитоплазми, здатні до диференціювання у жирові клітини, хондробласти, остеобласти і міобласти [251]. Автори роблять висновок, що жирова тканина собак є доступним джерелом для отримання МСК. Csaki et al. встановили, що МСК собак, похідні кісткового мозку, здатні до диференціювання за трьома основними напрямками за наявності відповідного культурального середовища [130]. Процес комітації у напрямку кісткової тканини супроводжується появою остеобластичної морфології, секрецією компонентів матриксу, бета-інтегринів, а на генетичному рівні – експресією фактора транскрипції Cbfa-1. При культивуванні у адипогенному середовищі МСК набувають морфології типових жирових клітин, продукують адипонектин, колаген І типу, бета-інтегрини, в них відбувається експресія специфічного фактору транскрипції PPAR- γ . За розвитку хрящової тканини в клітинах з'являється експресія фактора транскрипції Sox9, вони приймають округлу або овальну форму, продукують інтегрини та специфічні для хрящової тканини компоненти матриксу.

Russell et al. провели порівняння МСК, отриманих з хрящової тканини і кісткового мозку собак [128]. За їх даними, МСК ЖТ мають вищий проліферативний потенціал, але не відрізняються від МСК КМ за здатністю

пригнічувати проліферацію лімфоцитів у змішаній культурі та диференціюватись у напрямку адіпоцитів і остеобластів. Автори не змогли отримати доказів диференціювання обох видів МСК у хрящову тканину, незважаючи на чисельні модифікації культурального середовища. Стосовно експресії антигенів, МСК обох типів експресували антигени гістосумісності І класу, антигени CD44, CD90, CD73. Водночас, на більшості клітин була відсутня експресія антигенів гістосумісності II класу і антигена CD45. МСК з жирової тканини мали відносно високу експресію антигенів CD34 ($18,6 \pm 3,4$ %) і CD44 ($48,0 \pm 1,7$ %) порівняно з МСК кісткового мозку ($3,6 \pm 1,5$ % і $19,9 \pm 9,7$ %, відповідно).

Близькі дані були отримані Zhan et al. [67]. МСК з кісткового мозку, жирової тканини, плаценти і амніотичної рідини однієї і тої ж самої тварини мали однаковий профіль експресії антигенів (CD44 позитивність і відсутність експресії CD34 антигена) і були здатні до диференціювання у остеобласти і адипобласти, але не хондробласти. Найвища проліферативна активність була притаманна МСК з жирової тканини.

У дослідженні Sasaki et al. охарактеризовані функціональні властивості МСК собак, отриманих з чотирьох різних джерел: синовіальної тканини, жирової тканини в ділянці колінного суглоба, жирової тканини пахової ділянки і кісткового мозку [116]. Метою роботи було визначення джерела отримання МСК, найбільш придатного для здійснення комітації останніх в напрямку хрящової тканини, що важливо для лікування остеоартрозів. Автори встановили, що здатність до утворення хондробластів була найвища у МСК з синовіальної тканини, однак спостерігалась і у МСК іншого походження (найнижча – у МСК жирової тканини пахової ділянки). Диференціювання в напрямку клітин кісткової тканини було максимальним у МСК кісткового мозку та МСК жирової тканини пахової ділянки, а у напрямку адіпоцитів – у МСК жирової тканини пахової ділянки і колінного суглоба. Експресія антигену CD90 корелювала зі здатністю до хондрогенного

диференціювання. Найвищою проліферативної активністю характеризувались МСК синовіального походження.

Враховуючі розбіжності у визначенні антигенного спектру МСК різного походження, Mafi et al. провели мета-аналіз існуючих у літературі даних відносно експресії окремих антигенів на МСК різного походження людини [77]. Найчастіше як позитивні в дослідженнях вказувались антигени CD105, CD90, CD44, CD73, CD29, CD13, CD34, CD146, CD106, CD54 і CD166. Негативними маркерами найчастіше були визначені антигени CD34, CD14, CD45, CD11b, CD49d, CD106, CD10 і CD31. Однак, в окремих роботах виявлена експресія антигенів, які зазвичай вважаються негативними. Насамперед, це стосується антигенів CD10, CD34, CD44, CD45, CD49d і CD106. Автори роблять висновок щодо необхідності подальших досліджень і визначення особливостей антигенного спектру МСК залежно від їх походження та функціональних властивостей.

Аналіз експресії окремих антигенів поверхневих мембран та ядерної локалізації МСК різного походження у тварин ми не знайшли у сучасній літературі.

Таким чином, основними джерелами для отримання МСК тварин різних видів є жирова тканина і кістковий мозок. Визначення функціональних властивостей МСК переважно стосується експресії антигенів, здатності до диференціювання у різних напрямках, секреції біологічно активних речовин та впливу на імунну систему організму.

1.3. Методи отримання та обробки первинного матеріалу – джерела адгезивної фракції моноклеарних клітин з високою проліферативною активністю

Незважаючи на широке використання МСК як у медичній практиці, так і у ветеринарній медицині, методи отримання адгезивної фракції

мононуклеарних клітин з високою проліферативною активністю не є сталими, а постійно удосконалюються. Об'єктами дбостовірних модифікацій є спосіб дезагрегації тканин, склад та об'єм культурального середовища, умови культивування, спосіб відокремлення клітин з дна культурального посуду тощо.

Найбільша кількість публікацій стосується отримання МСК із кісткового мозку.

За рекомендаціями Міжнародного товариства з клітинної терапії процес отримання МСК, джерелом яких слугує кістковий мозок, повинен включати наступні етапи:

- отримання первинного матеріалу – пунктату кісткового мозку;
- центрифугування первинної суспензії в градієнті щільності;
- нарощування вторинної культури;
- оцінка якості отриманих МСК за показниками кількості клітин, їх життєздатності, імунофенотипових особливостей (експресія антигенів CD73, CD90 і CD105; відсутність експресії антигенів CD31 і CD45, низький рівень експресії антигенів гістосумісності II класу);
- проведення тестів на стерильність суспензії МСК, детекції мікоплазми, присутності ендотоксину, фарбування за Грамом [135].

При обробці первинної суспензії нефракціонованих клітин кісткового мозку, деякі автори не тільки проводять центрифугування, але і використовують метод ферментативної дезагрегації, фільтрації через дрібно ячеїстий фільтр [247].

Для підвищення адгезії МСК до пластику Yusop et al. пропонують обробляти поверхню культуральної плашки фібронектином [247], а Liu et al. – полімером 2 – метакрилоїлоксиетіл фосфорілхоліном [406]. Zheng et al. встановили, що адгезія, проліферація та диференціювання МСК у остеобласти підвищуються при нарощуванні на пористому риштуванні з

полікапролактону/гідроксіапатиту, особливо, у присутності фрагмента кісткового мозку [71].

Перспективним є проведення позитивної селекції МСК за допомогою часточок, на поверхню яких нанесено моноклональні антитіла, спрямовані проти антигену CD105. Клітини, що експресують антиген CD105, сорбуються на поверхню часточок, а потім при зміні рН середовища звільнюються від них і виходять до розчину. Такий спосіб був апробований Amiri et al. при отриманні МСК із сполучної тканини пуповини [375].

Багато робіт стосується складу середовища для культивування. Зазвичай використовується фетальна сироватка телят. Однак, вона має певні недоліки. По-перше, це не стандартизований склад, що стосується не тільки концентрації білків, ліпідів, варіацій у спектрі жирних кислот, але і вмісту та кількості цитокінів, факторів транскрипції, які впливають на адгезію і проліферативні властивості МСК при культивуванні. Другий аспект – можливість контамінації вірусами, пріонами, бактеріями, нанобактеріями, мікоплазмою, дріжджами, грибовою флорою, ендотоксином.

Існує також і етичний аспект проблеми: тільки в США щорічно гине один мільйон ненароджених телят, яких використовують для отримання 500 тис. літрів фетальної сироватки [66]. Тому на сучасному етапі все ширше використовуються замітники фетальної сироватки телят. У медичній практиці це алогенний та аутологічний альбумін сироватки крові, тромболізати, сироватки фетальної крові, синтетичні замітники [66, 252].

Головним завданням при отриманні первинного матеріалу від донора є мінімізація шкоди для фізіологічного стану тварини. Тому альтернативним джерелом стовбурових клітин є жирова тканина, яку також доцільно використовувати для отримання мезенхімних стовбурових клітин. Даних щодо методичних підходів отримання жирової тканини та її обробки з метою виділення адгезивної фракції клітин з високою проліферативною активністю у вітчизняній літературі ми не знайшли, проте методики, які застосовують у

своїй роботі зарубіжні автори, базуються переважно на використанні ферментних препаратів – колагенази I та II типів [73]. Такий спосіб є досить агресивним впливом для фракції стовбурових клітин, який негативно впливає на їх адгезивні властивості та процес проліферації. Alstrup T. et al. пропонують поєднувати механічне подріблення жирової тканини із ферментативним [250]. За їх даними такий спосіб суттєво підвищував кількість отриманих МСК.

У цьому контексті розробка нами модифікованого методу експлантату для отримання МСК з жирової тканини є вкрай актуальною.

Відкриття нейральних стовбурових/прогеніторних клітин є одним з найвидатніших досягнень у галузі нейробиології, яке вже знайшло застосування у клінічній практиці [129, 426]. Останнім часом все більше підтверджуються дані про постійний нейрогенез у певних ділянках мозку ссавців, який забезпечується за рахунок пулу стовбурових клітин [342].

Суттєвим кроком у дослідженні нейральних прогеніторних клітин стало їх виділення і культивування [64, 124, 334, 388].

Нейральні клітини попередники спочатку культивували як вільно плаваючі кулеподібні колонії (так звані нейросфери) у безсироватковому середовищі з додаванням різних ростових факторів, наприклад, епідермального фактора росту (EGF). Клонування нейросфер дало інструмент для встановлення властивості «стовбуровості» у тих чи інших первинних популяціях нейральних клітин.

За цими методами вилучали нервову тканину з гіпокампа ембріона миші, механічно подрібнювали, пропускали через клітинний фільтр, неодноразово відмивали, нашаровували на перкол, знімали та відмивали клітини, вносили їх у культуральне середовище з фактором росту фібробластів та культивували у CO₂ інкубаторі, за вмісту 5 % CO₂.

Як і у випадку механічно / ферментативного отримання МСК з жирової тканини, попередники нейральних клітин зазнавали значних ушкоджень, що

знижувало ефективність колонієутворення. Окрім того, ці методики передбачають застосування реактиву (фактора росту фібробластів), який має високу вартість, що призводить до збільшення вартості процедури їх отримання. Також процес виділення гіпокампа з головного мозку передбачає застосування додаткового устаткування, що в деяких випадках унеможлиблює використання вказаного способу.

Yang R., Xu X. запропонували метод отримання нейральних стовбурових клітин з волосяних фолікулів людини за допомогою їх адгезії на часточки, вкриті моноклональними антитілами проти антигену CD271 – низькоафінного рецептора фактору росту нейронів [481].

Стосовно умов культивування, зазвичай вони стандартні та не відрізняються від умов культивування МСК іншого походження. Однак, проводиться також і їх модифікація.

Shimomura et al. запропонували проводити культивування у двічі зменшеному обсязі культурального середовища [410]. Вони показали, що це підвищує відсоток життєздатних клітин, знижує кількість клітин з ознаками апоптотичної та некротичної загибелі. Водночас експресія антигенних маркерів, характерних для стовбурових клітин, залишається незмінною.

Li et al. провели порівняння чотирьох методів культивування МСК з пульпи зуба для індукції диференціювання у нейральні клітини: культури низької щільності (1000 – 3000 клітин на cm^3), стандартне культивування в повному середовищі з сироваткою, культивування у циліндрах і комбінацію культивування у циліндрах у повному середовищі з сироваткою. Останній метод виявився найбільш ефективним [142]

Культура нейральних клітин попередників є потужним інструментом для розкриття молекулярних і клітинних механізмів у галузі нейробіології.

Важливою властивістю нейральних клітин попередників є здатність підтримувати проліферативну активність в умовах *in vitro*, що дозволяє нарощувати їх кількість в культурі. Хоча велика увага приділяється

потенційному використанню цих клітин у клітинній терапії, культивування нейральних попередників може бути також важливим для дослідження механізмів нейрогенезу в контрольованих умовах *in vitro* [152, 183, 339].

Luzuriaga et al. запропонували підвищити ефективність отримання нейральних стовбурових клітин з МСК пульпи зуба. Вони показали, що в умовах культивування без сироватки ріст МСК з пульпи зуба є дуже повільним, але при цьому на клітинах відбувається гіперекспресія рецепторів нейротропіну. Тому додавання у без сироваткове культуральне середовище нейротропних факторів, зокрема BDNF (brain-derived neurotrophic factor) призводить до стимуляції диференціації клітин у нейральному напрямку [96]. Позитивний вплив нейротропних факторів росту на диференціацію МСК різного походження у нейрогенні стовбурові клітини відмітили також Cortes-Medina et al. [148], Heng et al. [412].

Модифікуючи склад культурального середовища, можна досягнути диференціювання МСК у різних напрямках. Наприклад, вирощування клітин у присутності бутірату натрія, епідермального і основного фактору росту фібробластів призводить до індукції гепатоцитів в культурах МСК [172], бутірату – диференціюванню МСК кісткового мозку у адіпоцити [113]. Більш ефективного дозрівання МСК у кардіоміоцити можна досягти за сумісного культивування клітин з ендотелієм судин [465], за застосування низькомолекулярних інгібіторів активності глікоген-синтаз кінази 3 [68]. Mahmoud et al. запропонували проводити спільне культивування МСК різного походження для отримання максимальної диференціації у клітини кісткової та хрящової тканини [134].

Для отримання достатньої кількості клітин для трансплантації застосовують культивування *in vitro*, під час якого на культуру клітин впливає значна кількість факторів. Зокрема, клітини проходять значну кількість мітотичних поділів у штучних умовах, які відрізняються від таких *in vivo*. За процесу культивування використовуються достатньо агресивні

реактиви, які можуть змінювати біологічні властивості МСК за різних пасажів, а отже і їх функції.

Процес поділу клітини здійснюється за фазами клітинного циклу. Клітинний цикл являє собою проміжок часу від моменту виникнення ядерної клітини до її загибелі або до наступного поділу, тобто серія подій між одним поділом клітини і наступним. Клітинний цикл складається з чотирьох фаз: фази G1 – інтенсивний синтез білка та ріст клітини, S-фази – реплікація ДНК, синтез білків хромосом, потовщення хромосом, G2-фази – інтенсивна підготовка до мітозу і М-фази – мітоз. М-фаза сама по собі складається з двох тісно пов'язаних процесів: мітозу, коли хромосоми клітини розподіляються між двома дочірніми клітинами, і цитокінезу, коли цитоплазма клітини фізично розділяється. G0 фаза – фазу спокою, у яку входять клітини, що тимчасово припинили ділитися. Старі клітини назавжди припиняють поділ через вік або через накопичення пошкоджень у ДНК. Деякі клітини у дорослому організмі, такі як клітини паренхіми печінки чи нирок, входять у G0-фазу майже назавжди. Вони можуть почати поділ знову тільки за дуже специфічних обставин; інші типи клітин, такі як клітини епітелію, продовжують ділитися протягом усього життя організму. Контроль проліферації клітин в онтогенезі здійснюється складною сіткою сигнальних шляхів, що інтегрують інформацію з позаклітинного та внутрішньоклітинного середовищ для регулювання циклін-залежних кіназ (Cdk) у комплексі з цикліном. Точна регуляція клітинного циклу під час розвитку є критичною для визначення розміру клітини, розміру і форми кожної тканини та подій, що ведуть до правильної клітинної диференціації. Для здійснення процесу диференціації клітини виходять з клітинного циклу під час фази G1 [263].

Відомо, що клітинний цикл МСК на ранніх та пізніх пасажах відрізняється вмістом клітин у фаз відносного спокою та проліферації. Сучасні дослідження засвідчують, що час подвоєння клітинної популяції

МСК з кісткового мозку та жирової тканини людини збільшується з кількістю пасажів. Крім того, в процесі культивування змінюється частота утворення колонієформуючих одиниць, секреція факторів росту, що синтезують самі клітини [106]. Є дані, що тривалість клітинного циклу стовбурових ембріональних клітин миші та людини відрізняються та становлять 12 та 16 годин відповідно. Також встановлено, що тривалість клітинного циклу ембріональних стовбурових клітин миші в умовах *in vivo* та *in vitro* відрізняється і становить 4, 7 та 12 год відповідно [432].

Є повідомлення про окремі морфологічні характеристики стовбурових клітин. При дослідженні мезенхімних стовбурових клітин коня і собаки встановлено, що на перших пасажах культивування мітохондрії локалізуються перичентрично, наявні ендосомні пухирці у клітинній цитоплазмі. В основному їх знаходили в перинуклеарній зоні, та перед поділом клітин вони переходили на протилежний полюс. У клітинах, що не діляться, були ендоплазматичні везикули, які інтенсивно рухались усередині клітини. Встановлено, що у процесі культивування змінюються морфологічні показники стовбурових клітин. Зокрема, було досліджено, що мезенхімні стовбурові клітини собаки та коня змінювали свою довжину та діаметр, як засвідчують автори публікації. За даними цих досліджень стовбурові клітини за 19-20 пасажів змінювали адгезивні властивості в бік зменшення, були більш розпластаними та «займали більше місця». Кількість клітин зменшувалася до $1,9 \times 10^6$ на чашку, що засвідчує зміну їх проліферативної активності. Також змінювався їх функціональний стан, що підтверджувалося зниженням життєздатності до 56 % [145].

Колектив інших дослідників встановив, що стовбурові клітини однієї культури мають морфологічні та функціональні відмінності. Зокрема, в культурі стовбурових клітин є клітини з різною товщиною, і проліферативна активність стовбурових клітин залежить від їх товщини. Клітини, що мали більшу товщину мали вищу проліферативну активність.

Клітини, як мали незначну товщину, експресували гени, пов'язані зі старінням клітини та мали низьку проліферативну активність [149].

Паралельно проведені дослідження вказують на те, що морфологічні показники мезенхімних стовбурових клітин за різних пасажів культивування мають достовірні відмінності. Було встановлено, що МСК кісткового мозку кота мали веретеноподібну форму, значну кількість цитоплазми, довжину $106,97 \pm 38,16$ і $177,91 \pm 71,61$ мкм на першому та третьому пасажах відповідно. Ширина клітин становила $30,79 \pm 16,75$ мкм і $40,18 \pm 20,46$ мкм на першому та третьому пасажах відповідно. Довжина ядра МСК кісткового мозку кота на першому пасажі становила 16,28 мкм (за 24 год культивування) та 21,29 мкм (за 120 год культивування), а на третьому – достовірно збільшилась та становила 26,35 мкм (за 24 год культивування) та 25,22 мкм (за 120 год культивування) [279].

Таким чином, методи отримання мезенхімних стовбурових клітин постійно вдосконалюються, оскільки ці клітини все ширше використовуються в медичній та у ветеринарній практиці [341]. Проведення досліджень у цьому напрямку є вкрай актуальним завданням.

1.4. Жирнокислотний склад ліпідів мезенхімних стовбурових клітин та його біологічне значення

Значення насичених (НЖК), мононенасичених (МНЖК) та поліненасичених жирних кислот (ПНЖК) для функціонування клітин, їх мембран та цілісного організму відомо давно і переоцінити його важко [167, 258, 319, 395, 399, 405].

Мезенхімні стовбурові клітини за спрямованістю свого енергетичного метаболізму у значній мірі нагадують злоякісно трансформовані клітини.

Концепція щодо асоціації енергетичного метаболізму з проліферативною активністю клітин була запропонована ще Отто Варбургом

у 1956 році. Для МСК, як і для інших клітин з ознаками «стовбуровості», характерним є активізація гліколізу замість окиснення субстратів у циклі Кребса [319]. Хоча гліколіз менш енергетично вигідний шлях, він супроводжується активізацією пентозо-фосфатного шунту і синтезу макромолекул, необхідних для швидко проліферуючих клітин. Аналогічну функцію у стовбурових клітинах виконує активізація процесу окиснення жирних кислот [167, 336].

Широко досліджується вплив жирних кислот і їх метаболітів на проліферативну активність та диференціацію стовбурових клітин. Насамперед, увага приділяється незамінним жирним кислотам. Незамінні жирні кислоти і їх метаболіти можуть чинити свою біологічну дію через кілька механізмів.

Перш за все, ПНЖК можуть бути включені у склад фосфоліпідів поверхневих мембран, що змінює їх хімічні та фізичні властивості і, таким чином, модулює активність асоційованих з мембранами функціональних білків, насамперед, рецепторів біологічно активних молекул [100]. Простагландин E₂, утворений з арахідонової кислоти, може зв'язуватись з рецепторами, які забезпечують активацію шляхів, що індукують ріст клітин і проліферацію [282]. За рахунок зв'язування з рецептором E, протанод 2, простагландин E₂, що секретують МСК, підтримує їх проліферацію аутокринним способом [385]. Важливими є дані, що ейкозаноїди і ліпідні медіатори можуть служити в якості лігандів або коактиваторами для ряду ключових транскрипційних факторів, таких як рецептори, що активуються пероксисомним проліфератором ядерного фактору каппа В тощо [282]. Активація зазначених сигнальних шляхів сприяє високій проліферативній активності клітин. Kota et al. виявили, що терапевтична ефективність МСК при лікуванні травматичних пошкоджень головного мозку корелює з рівнем секреції ними простагландину E₂ [385]. Особливо простагландин E₂ впливає на життєздатність дофамінергічних нейронів і з цим пов'язують ефективність

застосування МСК (які секретують простагландини) у пацієнтів на хворобу Паркінсона [387]. Є дані, що секреція простагландину E2 – основний механізм репрограмування макрофагів з M1 до M2 фенотипу під впливом МСК [72, 266], підвищення вмісту Т-регуляторних клітин [386].

ПНЖК можуть також впливати на структуру ліпідів у клітинній мембрані, а потім модифікувати клітинні процеси, такі як рецептор-опосередковану сигнальну трансдукцію. Ліпідні рафти клітинної мембрани відіграють важливу роль у регуляції стовбурових клітин до самооновлення, клітинного циклу, виживання та індукції апоптозу. Зокрема, саме у ліпідних рафтах локалізується білок CD133, який вважається одним із основних біомаркерів стовбурових клітин, що опосередковує їх здатність до самопідтримання і диференціювання у різних напрямках [203, 269]. Модифікація ліпідного складу клітин впливає на інтенсивність обмінних процесів і є тим компенсаторним механізмом, що забезпечує функціональні можливості мембран за змінених умов [351].

Доведено, що підвищення вмісту ненасичених жирних кислот та їх метаболітів у середовищі культивування призводить до підвищення коефіцієнту проліферації та процесів диференціації стовбурових клітин різних типів [391].

Поряд з цим є результати, які свідчать щодо негативного впливу насичених жирних кислот на життєздатність та підвищення чутливості до індукції апоптозу мезенхімних стовбурових клітин кісткового мозку людини. Так, з'ясовано, що пальмітинова кислота знижує проліферацію та індукує апоптоз МСК кісткового мозку людини, а також спричинює цитотоксичний стрес кардіальних міоцитів [480]. Ефект обумовлений тим, що пальмітинова кислота здатна підвищувати концентрацію в мітохондріях клітин реактивних форм кисню, пошкоджувати мітохондріальну ДНК та активувати каспазно-залежний шлях індукції апоптозу. Ці результати дають можливість припустити, що насичені жирні кислоти знижують виживання МСК

кісткового мозку в природних умовах, тобто *in vivo*. Це припущення знаходить підтвердження. Так, встановлено, що у хворих на цукровий діабет 2 типу та ожиріння концентрація пальмітинової кислоти значно підвищена, що має негативний вплив на життєздатність та функціональні властивості трансплантованих МСК [384, 484]. Водночас Boland et al. показали, що негативний вплив пальмітату може бути нівельований за введення IFN- γ і TNF- α [230].

Інший аспект впливу жирних кислот на фізіологічні властивості МСК – участь у синтезі біологічно активних молекул і речовин.

В експериментах, проведених Smith et al., до культур МСК кісткового мозку людини додавали 20 ммоль ненасичених жирних кислот – ліноленової або олеїнової [461]. Культуральне середовище змінювали через день, кожний раз додаючи нову порцію жирної кислоти. За 7 діб культивування в культуральному середовищі МСК під впливом олеїнової кислоти майже втричі збільшувалась концентрація ключових медіаторов ангіогенезу: фактора росту ендотелію судин, інтерлейкінів ІЛ-1, ІЛ-6, ІЛ-8, а також нітриту нітрогену. Під впливом олеїнової кислоти відбувалось підвищення тільки секреції фактора росту ендотелію судин.

Yaghooti et al. показали, що пальмітинова кислота не тільки знижує проліферативну активність МСК кісткового мозку людини, але і сприяє їх диференціюванню і підвищенню секреції ІЛ-6, фактора росту ендотелію судин. Цей процес супроводжується активацією сигнальних шляхів трансдукції і підвищенням фосфорилування кінази p38 і кінази позаклітинного матриксу [480]. Обробка МСК КМ бутановою (масляною) кислотою індукувала їх спонтанне диференціювання у хондроцити [258].

Таким чином, жирні кислоти впливають на різні аспекти фізіологічного стану мезенхімальних стовбурових клітин, визначаючи їх життєздатність, проліферативну активність, імуномодулюючі і ангіогенні властивості. З

огляду на вищевикладене актуальність визначення вмісту жирних кислот у складі ліпідів МСК різного походження не викликає сумніву.

1.5. Імуномодуючі властивості мезенхімних стовбурових клітин різного походження

Стан імунної системи, зокрема протипухлинної ланки імунітету, значної мірою визначає перебіг онкологічного захворювання. Чисельні експерименти з використанням МСК показали, що цим клітинам притаманна виражена імуномодуюча активність [126, 128, 201, 234]. Це є підґрунтям для використання МСК у лікуванні аутоімунних хвороб та хвороб, перебіг яких супроводжується аномальними імунними реакціями [78, 114, 216, 244, 320], однак вплив МСК на пухлинний процес може бути і негативним. Розглянемо, які властивості МСК можуть пригнічувати стан протипухлинного імунітету більш детально.

Відомо, що для активації Т-лімфоцитів необхідним є презентація чужорідного антигена в комплексі з антигенами гістосумісності І (CD8-позитивних Т-лімфоцитів) або ІІ класу (активація CD4-позитивних Т-лімфоцитів) та отримання другого сигналу за рахунок зв'язування костимуляторних молекул з відповідними лігандами (рис. 1.1).

Нині значення надається також третьому сигналу – цитокінам, присутнім у мікрооточенні, які переважно секретуються клітинами гістіоцитарно-макрофагального ряду. Так, наявність у середовищі ІЛ-12 сприяє розвитку Т-лімфоцитів хелперів І типу, ІЛ-4 – Т-лімфоцитів хелперів І типу, ІЛ-6 і ІЛ-23 – так званих Т-хелперів 17 (Th17; Т-клітин, які секретують ІЛ-17) [157, 364, 404, 418].

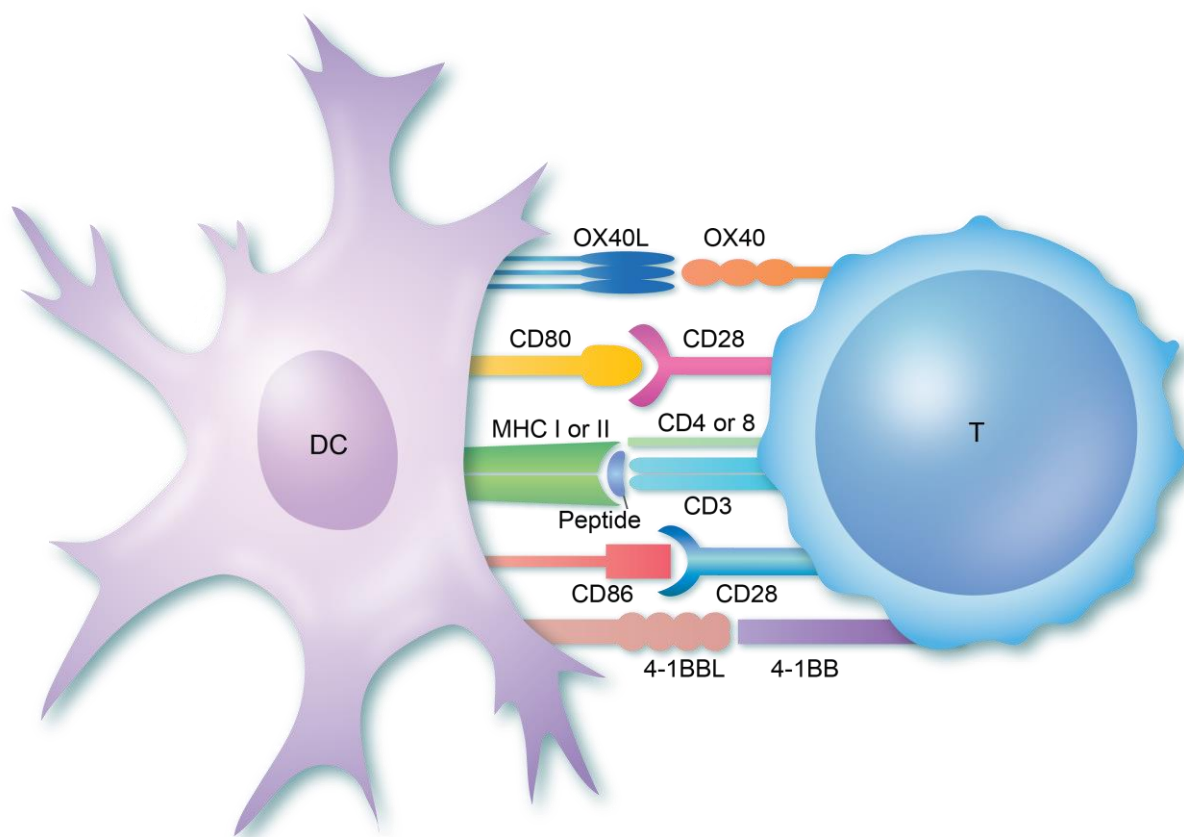


Рис. 1.1. Схематичне представлення механізму активації Т-лімфоцитів за М. Cavanagh (сайт доступу online: <https://www.immunology.org/public-information/bitesized-immunology/systems-and-processes/t-cell-activation>).

Як зазначалось вище, МСК експресують антигени сумісності І класу та не експресують антигени гістосумісності ІІ класу, костимуляторні молекули CD80 (B7-1), CD86 (B7-2), CD40 та CD40-ліганд, тому їх здатність стимулювати Т-лімфоцити істотно обмежена [335].

Di Nicola et al. вперше встановив, що при сумісному культивуванні МСК з лімфоцитами відбувається не активація імунної відповіді, а дозозалежне пригнічення проліферативної активності лімфоцитів [215]. Автори висловили припущення, що імуносупресивний ефект МСК не пов'язаний безпосередньо з імунологічними механізмами (оскільки він спостерігається і алогенних, і в аутологічних змішаних культурах), а опосередковується розчинними факторами, які секретують клітини. За своїми

імуномодельючими властивостями МСК значною мірою нагадують субпопуляцію В-регуляторних клітин [286].

Le Blanc et al. використовували в своїх дослідженнях МСК кісткового мозку практично здорових осіб донорів. Вони показали, що при змішаному культивуванні з алогенними та аутологічними лімфоцитами у присутності мітогенів вплив МСК на проліферацію Т-клітин розрізнявся залежно від співвідношення МСК до лімфоцитів [314]. За низької кількості МСК (до 1000 клітин на культуру) спостерігалась помірна активація лімфоцитів або відсутність ефекту, тоді як 10000 – 40000 МСК на культуру мали сильний інгібуючий вплив на лімфоцити. Найбільший інгібуючий ефект спостерігався, коли МСК додавали через кілька діб після початку мітогенної активації.

Механізми МСК-опосередкованої імуносупресії остаточно нез'ясовані. Передбачається внесок цитокінів (ІЛ-10, трансформуючого фактора росту бета 1), простагландинів [291, 357, 397].

Встановлено також, що МСК мають високу активність ферменту індоламін 2,3 діоксигенази (indoleamine 2,3-deoxygenase (IDO)), як катаболізує незамінну амінокислоту триптофан у кінуренін. Це призводить до зниження концентрації триптофану в культуральному середовищі, що негативно впливає на проліферативну активність лімфоцитів. Крім того, продукти подальшого розпаду кінуреніну мають токсичний вплив на клітини імунної системи [372].

Aggarwal, Pittenger провели спільне культивування МСК з очищеними популяціями клітин імунної системи – детритними клітинами (ДК), Т-лімфоцитами та натуральними кілерними клітинами [78]. На основі експериментально отриманих результатів вони запропонували наступну модель впливу МСК на імунну відповідь:

- пригнічення про-запального шляху, опосередкованого ДК І типу, Т-лімфоцитами хелперами І типу та НК-клітинами;

- активація анти-запального шляху, опосередкованого ДК II типу, Т-лімфоцитами хелперами II типу та Т-регуляторними клітинами (рис. 1.2).

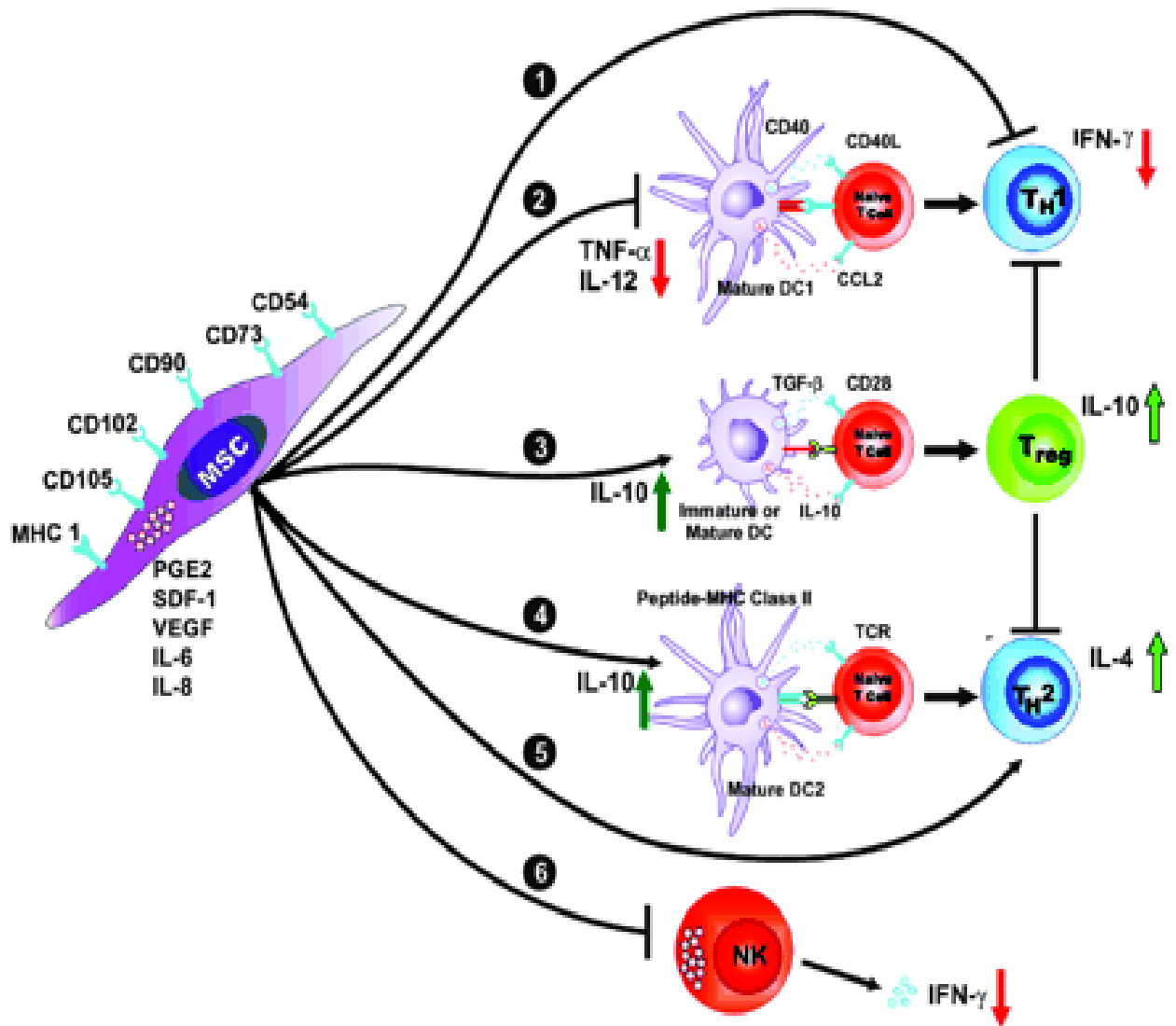


Рис. 1.2. Модель впливу МСК на імунну відповідь організму людини за Aggarwal, Pittenger [78].

Основне значення при цьому Aggarwal і Pittenger приділили секреції мезенхімними стовбуровими клітинами простагландинів, які пригнічують проліферацію Т-клітин і НК-клітин, викликають збільшення пулу регуляторних Т-клітин, стимулюють макрофаги до продукції ІЛ-10 та попереджують диференціацію моноцитів у ДК. Через вплив на Т-лімфоцити,

застосування МСК призводить до пригнічення проліферації В-лімфоцитів та антитілоутворення [214]. Ключова роль простагландинів в реалізації імуносупресорної функції МСК була підтверджена в роботі Manfredini et al., які показали їх значення для індукції секреції ІЛ - 10, пригнічення синтезу фактора некроза пухлин альфа та появи макрофагів М2 типу [72]. Ці дані підтверджують і інші автори [218, 460].

Серед інших молекул, які опосередковують імуносупресивну дію МСК, увага приділяється С-С мотив ліганду 2 (CCL2), галестинам, ІЛ-6 [223, 308, 326].

CCL2 – це амінокислотна послідовність із 76 залишків (містить парні залишки цистеїну, С, що і обумовлює назву), яка після зв'язування з рецептором поверхневих мембран активує хемотаксис моноцитів / макрофагів до вогнищ запалення, а також активує Th17 клітини, важливі для відповіді на аутоантигени [326, 404]. CCL2 відомий також під назвою MCP-1 (monocyte chemoattractant protein-1, білок 1 хемоаттракції моноцитів) [220]. Встановлено, що МСК секретують не тільки CCL2, але і металопротеїнази, які розщеплюють CCL2 і призводять до появи більш коротких форм молекули, які є не агоністами, а антагоністами відповідних рецепторів. В їх присутності відбувається блокада рецепторів CCL2, не відбувається фосфорилування АКТ кінази та фактора транскрипції STAT3, що призводить до пригнічення проліферації Th17 клітин і макрофагів [326].

МСК експресують значну кількість лектинів – білків, які зв'язують різноманітні вуглеводні залишки. Серед них увагу привертають галестини – лектини, які спрямовані проти залишків N-ацетиллактозамінів у складі глікопротеїнів поверхневих мембран. Sioud et al. показали, що галестини МСК взаємодіють з вуглеводними залишками у складі Т-клітинного рецептора, що унеможливорює його переміщення по мембрані і утворення кластерів - тобто, усувають передумови для активації Т-лімфоцитів [308].

Жодний з перелікованих чинників не діє ізольовано, тому імуносупресивна дія МСК залежить від типу клітин, їх походження, функціональних властивостей і стадії активації. Є дані, що МСК набувають імуносупресивні властивості саме за умов дії різних цитокінів (гамма-інтерферону, ІЛ-1, колоніє-стимулюючого фактору гранулоцитів, фактору росту стовбурових клітин та інших) [372, 381, 414, 422].

В МСК різних видів можуть бути задіяними різні механізми імуносупресії. Su et al. отримали МСК-КМ людини, мавпи, морської свинки, хом'яка, кролика, миши та криси і порівняли їх властивості [372]. Фенотипові характеристики МСК різних видів були подібні ($CD73^+$, $CD29^+$, $CD44^+$, $CD45^-$), за виключенням експресії антигена $CD105$, який був позитивний у МСК людини, мавпи, морської свинки, кролика, миши не визначався у МСК та криси і хом'яка. Здатність до імуносупресії оцінювали за рівнем проліферації у змішанній культурі МСК і лімфоцитів (співвідношення 1 : 10). Встановлено, що МСК-КМ людини, мавпи і морської свинки переважно використовували IDO-залежний шлях імуносупресії і за дії специфічного інгібітора IDO (1-метил-триптофану) імуносупресивного впливу МСК не спостерігали.

Навпаки, в МСК хом'яка, кролика, миши та криси більш активною була індукована синтаза оксиду азота (inducible nitric oxide synthase, iNOS), яка призводить до утворення оксиду азота. Останній пригнічує лімфоцити, хоча точний механізм дії остаточно невідомий [105, 306].

Кількість робіт, які стосуються механізмів імуносупресії, типових для МСК домашніх тварин, незначна. Дані, отримані Lee et al., свідчать на користь провідної ролі простагландинів в реалізації супресивної дії МСК-КМ [370]. Kang et al. при дослідженні МСК-ЖТ виявили вплив не тільки простагландинів, але і високої активності IDO [258].

Chow et al. порівняли імуносупресивну дію МСК-КМ і МСК-ЖТ, отриманих від одних і тих самих собак (всього досліджено трьох тварин)

[291]. МСК обох видів були подібні за морфологією клітин (фібробластоїдні), експресували віментин, антигени CD44, CD90, CD105. Експресії антигенів CD45, CD34 і CD73 не спостерігали. Для визначення впливу на лімфоцити, проводили спільне культивування МСК та лімфоцитів периферичної крові у співвідношенні клітин 1:10. Лімфоцити активували мітогеном конкавалін А. Оцінку проліферативної активності проводили через 96 годин культивування. Для визначення впливу того чи іншого шляху імуносупресії до культурального середовища додавали різні інгібітори, зокрема: аміногуанідин (інгібітор iNOS), індометацин (інгібітор циклооксигенази), 1-метил-триптофан (інгібітор IDO), низькомолекулярні інгібітори SB431542 і ZM241385 (GlaxoSmithKline, Велика Британія) трансформуючого фактору росту бета (transforming growth factor beta, TGF- β) і рецептора аденозину. На відміну від попередніх досліджень [372], автори не знайшли доказів задіяності iNOS та IDO в реалізації імуносупресивної дії МСК обох типів. В цьому дослідженні МСК-ЖТ переважно використовували TGF- β -залежний сигнальний шлях інгібіції Т-лімфоцитів, а МСК-КМ – TGF- β -залежний та опосередковані рецептором аденозину і простагландінами. TGF- β викликає пригнічення передачі сигналу через Т-клітинний рецептор [182]. Аденозин, який секретують МСК, зв'язується з рецептором на мембрані Т-лімфоцитів, активує протеїн кіназу А (protein kinase A, PKA). PKA, в свою чергу, фосфорилує декілька кіназ, що різко зменшує рівень внутрішньоклітинної передачі сигналу через Т-клітинний рецептор [270, 428].

В роботі Crain et al. отримані аналогічні дані [182]. Автори показали, що МСК-КМ собак використовують як TGF- β -залежний так і опосередкований рецептором аденозину шляхи пригнічення активності Т-лімфоцитів. Додавання в культуральне середовище змішаної культури МСК і лімфоцитів відповідних інгібіторів відміняло супресивну дію МСК. Крім того, TGF- β і аденін були виявлені в екстраклітинних везикулах, які виділяли МСК.

Однак, на відміну від Chow et al. [291], в іншому дослідженні імуносупресивна дія МСК-ЖТ собак була пов'язана не тільки з TGF- β -залежним сигнальним шляхом, але і з секрецією ними оксиду азота, простагландинів, аденозину, а також з індукцією на поверхні лігандів білка програмованої клітинної смерті (PD1-L) [422].

Parys et al. дослідили імуномодельюючі властивості МСК котів [367]. Нестимульовані МСК (без впливу цитокінів) секретували незначну кількість цитокінів, ІЛ-10 не визначався, рівень активності iNOS і IDO був низьким. Вплив гама-інтерферону призводив до підвищення експресії IDO, PD1-L, ІЛ-6, ЦОГ. Стимуляція МСК фактором некрозу пухлин альфа підвищувала експресію ІЛ-6 і ЦОГ на рівні мРНК та білка. За сумісного впливу гама-інтерферону та фактора некрозу пухлин МСК активно секретували простагландини. Таким чином МСК котів використовують декілька механізмів імуносупресивного впливу, причому така активність притаманна переважно стимульованим (активованим) МСК.

An et al. проаналізували склад лімфоцитів периферичної крові мишей з експериментальним колітом при інтраперітонеальному введенні їм МСК-ЖТ котів [386]. Вони встановили значне клінічне поліпшення перебігу захворювання, яке корелювало з секрецією МСК простагландинів і підвищенням вмісту Т-регуляторних лімфоцитів (CD4⁺, CD25⁺, FoxP3⁺, CD127⁻). Автори роблять висновок, що МСК-ЖТ опосередковують імуносупресивну дію переважно через синтез простагландинів, які змінюють співвідношення окремих субпопуляцій в бік превалювання анти-запальних тенденцій.

Важливі результати отримали Luk et al. Вони встановили, що імуносупресивну дію мають не тільки життєздатні МСК, здатні до секреції імуноактивних речовин, але і МСК із втраченою секреторною активністю внаслідок термічної обробки [274]. За введення мишам з експериментальним сепсисом, обидва типи клітин підвищували концентрацію у сироватці крові

ІЛ-10, зменшували рівень гамма-інтерферону та модулювали відповідь моноцитів на активацію ліпополісахаридами. Таким чином, авторами встановлено, що за певних умов імуномодельючі властивості МСК реалізуються незалежно від їх секретому (спектру цитокінів, хемокінів, які секретують МСК), а забезпечується розпізнаванням поверхневих антигенів МСК клітинами макрофагально-гістіоцитарного походження. Аналогічний вплив загиблих МСК на функцію клітин моноцитарної ланки (але не на Т-лімфоцити у змішаній культурі) проаналізований в огляді Weiss, Dahlke [474].

Підсумовуючі, механізми здійснення мезенхімальними стовбуровими клітинами імуносупресії різноманітні. Більшість з таких механізмів досить ретельно охарактеризовано, однак у повній мірі вони ще не розкриті. Слід зазначити, що МСК різних видів та різного тканинного походження розрізняються спектром імуномодельючих властивостей за рахунок експресії різної комбінації антигенів і рецепторів поверхневих мембран, синтезу хемокінів і цитокінів. Додатковий вплив має стан активації МСК, який впливає на їх здатність продукувати біологічно активні речовини. Тому в різних експериментальних моделях отримані результати дещо розрізняються.

1.6. Мезенхімні стовбурові клітини і пухлинний ріст

МСК мають унікальні характеристики і здатні мігрувати практично в усі органи і тканини організму, в яких відбуваються процеси їх подальшого диференціювання залежно від властивостей мікрооточення. Тому вже на перших етапах дослідження МСК з'явилися спроби використовувати їх при лікуванні пухлин різного походження в експерименті.

Відомо, що канцерогенез – складний поступовий процес. Розрізняють декілька стадій канцерогенезу: ініціація, промоція, втрата здатності до

диференціювання, прогресія. На першій відбуваються ушкодження генетичного апарату клітин, що призводять до активації онкогенів або пригнічення генів супресорів пухлинного росту. Наслідком є зміна каскаду внутрішньоклітинних шляхів передачі сигналів та створення умов для неконтрольної проліферації клітин. Конкретні механізми дуже різноманітні та залежать від типу пухлин. На стадії промоції відбувається активація проліферативного каскадного механізму. Наступна стадія – порушення процесів диференціювання, що призводить до накопичення клону низько диференційованих клітин з високою проліферативною активністю. Остання стадія прогресії пухлини супроводжується розвитком вторинних генетичних аномалій, змінами морфології клітин, синтезом аутокринних факторів росту, факторів ангіогенезу, пригніченням функції імунокомпетентних клітин організму, тощо.

Внесок МСК в процес канцерогенезу вивчається на трьох основних моделях:

- при спільному культивуванні пухлинних клітин і МСК,
- за культивування пухлинних клітин з додаванням культурального середовища від МСК,
- при введенні в організм тваринам-пухлиноносіям.

В якості моделей пухлинного росту зазвичай використовуються перевивні та індуковані пухлини експериментальних тварин – карцинома легень Льюїс, гепатоцелюлярна карцинома мишей, інші пухлини.

В результаті проведених експериментів стосовно впливу МСК на процеси канцерогенеза отримані протилежні дані, які вказують як на здатність МСК пригнічувати пухлинний ріст, так і на його активацію за впливу МСК [191, 292, 450]. Кількість останніх робіт переважає. Oloyo et al. провели аналіз доступної літератури стосовно впливу МСК на пухлинний ріст [361]. Вони встановили, що у період 2000–2017 рр. було опубліковано 186 оригінальних статей, причому у 56 % з них виявлено активуючий вплив

МСК на ріст пухлин та / або процеси метастазування. Однак, за використання МСК з пуповинної крові у 80 % досліджень спостерігали пригнічення росту пухлин, тоді як за використання МСК кісткового мозку або жирової тканини, навпаки, частіше відбувалась промоція пухлинного процесу (в 64 % і 57 %, відповідно).

1.7. Пригнічення пухлинного росту за впливу мезенхімальних стовбурових клітин

Ohlsson et al. проводили підшкірну трансплантацію клітин карциноми товстого кишечника щурів у складі желатинового матриксу, що дозволило авторам точно оцінити характер роста, інфільтрацію іншими клітинами тощо [297]. Було встановлено, що при трансплантації пухлинних клітин сумісно з МСК ріст пухлини значно пригнічувався, а при рівному співвідношенні пухлинних клітин і МСК (1 : 1) він був повністю інгібований, що супроводжувалось інфільтрацією трансплантата моноцитами і нейтрофілами.

В дослідженні Lu et al. МСК отримували з кісткового мозку мишей та проводили серію експериментів *in vitro* (спільне культивування з клітинами лініями гепатоми мишей H22, лімфоми мишей YAC-1 і EL-4, інсуліноми щурів INS-1) і *in vivo* (введення у черевну порожнину спільно з клітинами гепатоми мишей, яка викликає асцит) [438]. В обох випадках встановлено дозо-залежне пригнічення пухлинного росту, причому пухлинні клітини мали морфологічні ознаки апоптозу і підвищений рівень експресії апоптоз-асоційованої каспази 3. При цитофлуориметричному аналізі виявлено підвищення кількості пухлинних клітин у стані апоптозу та зупинку решти клітин у фазі спокою клітинного циклу (G_0 / G_1).

Nakamura et al. ввели МСК щурам на межу між пухлиною (гліома 9L щурів) та нормальною паренхімою мозку, що призвело до пригнічення росту

пухлини і підвищення виживання тварин. Генетична модифікація МСК за введення гена ІЛ-2 підвищила протипухлинний ефект МСК [86].

Sun et al. використали МСК, отримані з клітин пупкового канатика та жирової тканини людини, для введення мишам з трансплантованою карциномою молочної залози людини. Спостерігали значний протипухлинний ефект у вигляді зменшення розмірів первинної пухлини, кількості та об'єму легневих метастазів, збільшення кількості у стані апоптозу [448].

Важливі результати щодо механізмів протипухлинного впливу МСК отримані Khakoo et al., які проводили дослідження у двох модельних системах *in vitro* і *in vivo* [217].

По-перше, автори показали, що за трансплантації імуноскомпроментованим безтимусним мишам підшкірно клітин лінії саркоми Капоші людини і одночасному введенні МСК з кісткового мозку людини відбувається значна інгібіція росту пухлини. В цьому експерименті два типи клітин вводили одночасно: $0,4 \times 10^6$ МСК вводили у хвостову вену, а $0,4 \times 10^6$ клітин імплантували підшкірно в ділянці правої кінцівки. Мезенхімні стовбурові клітини були виявлені серед пухлинних клітин вже за 48 годин. За впливу МСК загальний об'єм пухлини на всі терміни спостереження (16-й, 19-й, 23-й і 29-й день) був вдвічі меншим за об'єм пухлини у тварин контрольної групи. МСК у складі пухлинної тканини мали фібробластоїдну морфологію, зберігали експресію молекул адгезії, не диференціювались в інші типи клітин і не пригнічували синтез фактору росту ендотелія судин пухлинними клітинами. Вірогідний механізм пухлиноінгібуючої дії автори спробували з'ясувати в експериментах *in vitro*.

При сумісному культивуванні *in vitro* пухлинних клітин і МСК, тільки при прямому міжклітинному контакті (не через мембрану, що пропускає розчинні речовини) та у середовищі, збіднілому на поживні речовини (відтворення пухлинного середовища) спостерігається специфічне

пригнічення фосфорилювання Akt кінази, але не інших кіназ. Фосфорильована форма Akt кінази є необхідною ланкою передачі сигналів проліферації для клітин саркоми Капоші, тому її відсутність в умовах, коли клітини не отримують достатню кількість ростових факторів через їх нестачу у культуральному середовищі, призводить до загибелі пухлинних клітин. Крім того, автори встановили, що для здійснення ефекту необхідним є присутність молекул кадхеринів як на мембрані МСК, так і на мембрані пухлинних клітин, для здійснення гомологічної адгезії. Застосування антитіл проти кадхеринів відмінняє протипухлинну дію МСК. Однак, протипухлинний ефект МСК та пригнічення фосфорилювання Akt кінази не спостерігались при спільному культивуванні МСК та клітинних ліній інших пухлин (лінія PC-3 карциноми передміхурової залози і лінія MCF-7 рака молочної залози). Таким чином, можна зробити висновок, що вихідна активність різних сигнальних шляхів пухлинних клітин розрізняється і визначає спрямованість реакції на дію МСК.

Отримані докази щодо існування також і іншого механізму впливу МСК на активність Akt кінази в пухлинних клітинах.

Загально відомо, що фосфорилювання Akt здійснюється фосфатиділ-інозитол-3 кіназою (phosphatidyl-inositol-3-kinase, PI3K). Ген *PTEN* (phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome ten; гомолог фосфатази і тензіна, делетований на хромосомі 10) кодує фосфатазу, що дефосфорилює фосфатиділ-інозитол-3, 4, 5 трифосфат та конвертує його у фосфатиділ-інозитол-4, 5 біфосфат, що унеможлиблює фосфорилювання Akt кінази.

Встановлено, що спільне культивування МСК з клітинами ліній гліом призводить до підвищення активності фосфатази PTEN, пригнічення формування монослою та міграції сфероїдів пухлини за експериментів *in vitro*, та пригнічення росту пухлини при трансплантації імуноскомпроментованим мишам [462].

МСК можуть викликати інгібіцію і інших внутрішньоклітинних шляхів передачі сигналу. Так, в експериментах з культивування клітинної лінії С6 гліоми людини у присутності МСК людини з пупкового канатику або культурального середовища МСК, спостерігались пригнічення росту пухлинних клітин, їх зупинка у G_0/G_1 фазі клітинного циклу, зниження експресії бета-катеніна і онкогена с-Мус. Зазначені ефекти були опосередковані здатністю МСК до секреції молекули DDK-1 – інгібітора Wnt - сигнального шляху [222].

В дослідження Ryu et al. МСК, які вирощувались у культурах з високою щільністю клітин, у значній кількості секретували цитокін бета – інтерферон, що має протипухлинні властивості, та пригнічували ріст карциноми молочної залози MCF-7 [74].

Обробка МСК іншим цитокіном (гамма – інтерфероном) значно підвищувала їх протипухлинну активність через експресію на них ліганда, що зв'язує відповідний рецептор «смерті» на поверхні пухлинних клітин та індукує апоптоз останніх [164].

Однак, водночас МСК здатні до секреції цитокінів, які активують сигнальні шляхи, необхідні для проліферації пухлинних клітин. Тому, здатність МСК прискорювати або пригнічувати пухлинний ріст залежить насамперед від фенотипових особливостей пухлинних клітин: експресії рецепторів поверхневої мембрани, активності окремих шляхів сигнальної трансдукції, наявності генетичних аномалій, які призводять до рецептор-незалежного стану активації окремих сигнальних шляхів [453].

Крім того, має значення і характеристика МСК. Це стосується їх здатності секретувати різний спектр цитокінів і хемокінів; факторів, що активують Akt і інші кінази, та навпаки, інгібіторів окремих сигнальних шляхів, тощо.

1.8. Активація пухлинного росту за впливу мезенхімних стовбурових клітин

Ефект прискорення росту за впливу МСК був виявлений для пухлин різного походження.

При введенні імуноскомпроментованим мишам суміші клітин лінії KM12SM рака товстого кішківника людини з МСК людини Shinagawa et al. зареєстрували значне збільшення маси первинної пухлини у місці інокуляції та появу віддалених метастазів у печінку, які були відсутні у тварин контрольної групи (введення тільки клітин лінії KM12SM). Крім того, за впливу МСК пухлинні клітини мали вищу проліферативну активність (яку визначали за експресією ядерного антигена проліферуючих клітин), нижчий апоптотичний індекс, а в тканині пухлини була збільшена щільність мікосудинного русла [411]. Автори висловили припущення щодо можливого диференціювання МСК у стромальні клітини, які створюють умови для успішної проліферації клону пухлинних клітин.

De Voeck et al. провели аналогічні за дизайном експерименти щодо росту клітин лінії рака товстого кішківника в культурі та в організмі мишей – реципієнтів за впливу МСК кісткового мозку [108]. За їх даними, ефект стимуляції росту пухлинних клітин був опосередкований експресією на мембранах МСК білка нейрорегуліну 1, який є лігандом рецепторів родини епідермального фактору росту людини HER2 / HER3. Зв'язування нейрорегуліну 1 з відповідними рецепторами на мембрані пухлинних клітин призводить до активації PI3K/АКТ кіназного шляху, який сприяє проліферативній активності і обумовлює ріст пухлини.

У дослідженні Nishikawa G. et al. показано, що ефект стимуляції росту клітин лінії HCT116 раку товстого кішківника за впливу МСК обумовлений взаємодією рецепторів хемокінів CCR5 на поверхні пухлинних клітин з відповідними лігандами, які секретують МСК [109]. Така взаємодія рецептора і ліганда призводить до структурних змін рецептора і приєднання до його цитоплазматичної частини білків адаптерів, які викликають активацію низки кіназ і, відповідно, також призводить до активації внутрішньоклітинних шляхів передачі сигналу, асоційованих з проліферативною активністю пухлинних клітин.

Прогресія інокульованої мишам гепатоцелюлярної карциноми людини (лінії 7402 і Hep3b) за дії МСК також була обумовлена розчинними факторами, що секретували мезенхімні клітини. Серед них найбільше значення мала секреція простагландину E2, який активував на мембрані пухлинних клітин рецептор YAP, AKT/mTOR/SREBP1 і Hhpo шляхи внутрішньоклітинної передачі сигналів, окиснення жирних кислот, репрограмування енергетичного метаболізму пухлини [430]. Ефект був більш виразним, якщо МСК попередньо вирощували у гіпоксичному культуральному середовищі, що підвищувало секрецію простагландину E2.

Встановлено, що клітини лінії MCF7 рака молочної залози при спільному культивуванні активно захоплюють екзосоми (фрагменти цитоплазми клітини, оточені поверхневою мембраною), які секретують мезенхімні стовбурові клітини. Це призводить до активізації в пухлинних клітинах Hhpo сигнального шляху, підвищенню проліферативної активності та зниженню чутливості до індукції апоптозу [178]. Нажаль, який компонент екзосом відповідальний за подібні ефекти, не з'ясовано.

В іншому дослідженні екзосоми МСК кісткового мозку прискорювали ріст клітин лінії U2OS остеосаркоми людини за рахунок активації PI3K/AKT сигнального шляху, підвищення експресії гіпоксія-індукованого фактору 1 –

альфа, стимуляції гліколізу та перебудові енергетичного обміну (Hypoxia-inducible factor 1 - alpha, HIF - 1 α) [333].

Значення екзосом, які секретують мезенхімні стовбурові клітини, для промоції росту гліом підкреслюють також Pavon et al. [455].

Стимуляція росту клітин лінії рака яєчників за впливу МСК обумовлена активацією проліферативних сигнальних внутрішньоклітинних шляхів внаслідок зв'язування рецепторів фактору, що активує тромбоцити (platelet-activating factor receptor, PAFR), які гіперекспресуються пухлинними клітинами, з лігандами PAFR, які секретують мезенхімні клітини [192].

Інший механізм набуття більш злоякісних властивостей клітинами раку яєчників під впливом МСК пов'язаний з секрецією останніми ІЛ-6 і фактора інгібіції лейкемії (leukemia inhibitory factor, LIF), які активують STAT3 – залежну активацію проліферації [264].

Chen et al. показали, що МСК секретують у культуральне середовище біологічно активні речовини, які активують в клітинах лінії рака шлунку протоонкоген *c-Myc* та поглиблюють прояви їх злоякісного фенотипу [213].

Баланс між стимуляцією та активацією пухлинного росту в значній мірі залежить від стану преактивації окремих шляхів сигнальної трансдукції в пухлинних клітинах, який різний в пухлинах різного походження [313, 469].

Здатність генерувати проліферативні сигнали, що забезпечують постійну ініціацію нових мітотичних циклів, – це найважливіша, головна, властивість неопластичних клітин, яка лежить в основі їх неконтрольованої проліферації [202, 224, 275, 345, 425]. Процеси поділу і диференціювання клітин регулюються не тільки генетичною детермінованістю активації тих чи інших сигнальних шляхів залежно від гістогенезу клітини і наявності певних генетичних порушень у ній, але і зовнішніми сигналами: різноманітними розчинними факторами (в першу чергу, цитокінами і, крім того, в деяких типах клітин гормонами), а також взаємодією клітин між собою і з білками оточуючого їх позаклітинного матриксу [154, 210]. Тому мезенхімні

стовбурові клітини, які насамперед є клітинами матриксу, строми пухлини, входять до складу мікрооточення пухлини і впливають на баланс про- і антипроліферативних сигналів у ньому.

Крім того, МСК можуть впливати на пухлинні клітини і індукувати синтез ними аутокринних факторів росту [310]. Це було показано в моделі гепатоцелюлярної карциноми собак. При обробці пухлинних клітин середовищем від МСК-ЖТ собак вони починали виробляти такі фактори росту, як фактор росту гепатоцитів, інсуліно-подібні фактори росту, епідермальний фактор росту, фактор росту судин та підвищували секрецію металопротеїназ, що важливо для розщеплення білків матриксу та полегшення метастазування [430].

Таким чином, вищенаведені роботи свідчать, що вплив на процеси внутрішньоклітинної передачі сигналів в пухлинних клітинах різноманітних факторів, які синтезують мезенхімні клітини, є одним із центральних механізмів промоції пухлинного росту за дії МСК.

Значна увага приділяється механізмам впливу МСК на канцерогенез. До основних механізмів відносять:

- стимуляція ангіогенезу;
- вплив на імунокомпетентні клітини;
- зміна біологічних властивостей пухлинних клітин, зокрема чутливості до індукції апоптозу;
- модуляція епітеліально-мезенхімального переходу [431].

1.9. Активація ангіогенезу у стромі пухлин за впливу мезенхімних стовбурових клітин

Стосовно впливу МСК на ангіогенез, він може здійснюватись декількома шляхами. По-перше, МСК здатні до диференціації в стромальні

клітини судин (періцити, фібробласти) і тим самим сприяти новоутворенню судин [131, 299, 328, 483].

Spaeth et al. показали, що культивування МСК у середовищі, в якому попередньо культивувались пухлинні клітини, змінює функціональні властивості мезенхімних клітин. Через 16 діб культивування МСК починають експресувати антигени FSP, TSP-1, Tn-C, зазвичай характерні для пухлино – асоційованих фібробластів (cancer – associated fibroblasts, CAF) [299]. В них також розпочинається експресія десміну і альфа – актину гладких м'язів – білків цитоскелету, характерних для міофібробластів, що формують капілярне русло. Третя особливість – секреція зміненими МСК фактора росту ендотелію судин (vascular endothelial growth factor, VEGF), інгібітору активатора плазміногена, металлопротеїназ (для розщеплення матриксу).

У 2004 – 2008 рр. була виконана переважна більшість експериментальних робіт, в яких отримані факти, що свідчать про диференціацію МСК у CAF в культурі під впливом розчинних факторів пухлини та в організмі тварин. На теперішній час трансформація МСК → CAF вважається повністю доведеною [398, 409, 411, 431].

По-друге, МСК синтезують та секретують різноманітні проангіогенні фактори: фактор росту ендотелію судин, ангіопоеїн 1, фактори росту фібробластів 2 і 7, ростовий фактор, похідний тромбоцитів, фактор 1, похідний строма, ІЛ-8 [110, 283, 467]. МСК собак також продукують проангіогенні фактори. Зокрема, МСК-ЖТ собак при спільному культивуванні з ендотеліальними клітинами лінії EA.hy926 підвищували швидкість проліферації і міграції останніх [115], а МСК-КМ собак збільшували щільність капілярів при їх використанні з метою загоєння ран шкіри [437]. Ці проангіогенні властивості МСК сприяють васкуляризації судин і пришвидшенню росту пухлин, але водночас вони можуть бути використані при застосуванні МСК з іншою метою – для поліпшення васкуляризації зон ішемії. Тому в літературі можна зустріти роботи, в яких

створюються умови для підвищення здатності МСК до синтезу вазоактивних речовин [171, 468].

Ще один механізм, відкритий відносно нещодавно, за яким здійснюється активація ангіогенезу за впливу МСК, пов'язаний з секрецією ними позаклітинних везикул (екзосом) [196, 304]. За своїм розміром і біогенезом позаклітинні везикули розділяються на 1) мікровезикули або екзосоми – часточки розміром 100 – 1000 нм, які є фрагментами зовнішньої плазматичної мембрани; 2) власно екзосоми – часточки розміром 40 – 100 нм, які утворюються з ендосомального компоненту клітини [181, 294, 324].

Так, Gangadaran et al. показали, що обробка ендотеліальних клітин мишей лінії SVEC-4 екзосомами МСК підвищує в них активність внутрішньоклітинних сигнальних шляхів, опосередкованих кіназами SRC, АКТ і ERK, і рівень експресії рецепторів до факторів росту ендотелія судин I і II типу [181]. Saromassio et al. охарактеризували вміст екзосом МСК ЖТ коней і виявили збільшення кількості мікроРНК, що мають про-ангіогенні властивості [174].

Близькі результати були отримані Ophelders et al., які встановили збільшення щільності капілярного русла при обробці екзосомами, похідними від МСК [324].

Екзосоми МСК можуть містити різноманітні біологічно активні речовини. Однак, значна роль також відводиться мікроРНК, які у великій кількості виявлені у складі екзосом [317, 390]. Всього було виявлено 413 мікроРНК у екзосомах МСК різного походження, причому концентрація окремих мікроРНК (miR-183, miR-378, miR-140-3p, miR-222) у екзосомах була вищою, ніж у МСК. Ці мікроРНК зв'язуються з факторами транскрипції та модулюють рівень експресії у клітинах, які їх поглинули.

Baglio et al. привели порівняння концентрації мікроРНК у екзосомах МСК з кісткового мозку та з жирової тканини. Вони встановили, що для екзосом МСК з жирової тканини характерними були miR-486-5p, miR-10a-5p,

miR-10b-5p, miR-191-5p і miR-222-3p. Напроти, в екзосомах МСК з кісткового мозга найвищими були концентрації miR-143-3p, miR-10b-5p, miR-486-5p, miR-22-3p і miR-21-5p [211]. Такі розбіжності можуть пояснювати особливості біологічної дії МСК різного походження та відкривають можливості до модифікації складу екзосом у заданому напрямі під впливом різноманітних факторів культурального середовища. Однак, слід зазначити, що окремі автори наводять результати відносно здатності МСК за певних умов пригнічувати ангіогенез [145].

1.10. Вплив МСК на клітини імунної системи тварин-пухлиноносіїв.

Вплив МСК на імунокомпетентні клітини в культурі і в організмі тварин, які не є носіями пухлин, та чисельні механізми такого впливу охарактеризовані нами вище. В даному підрозділі ми зосередили увагу на стані імунної системи тварин – пухлиноносіїв за застосування МСК. Однак, в літературі ми виявили тільки поодинокі роботи, присвячені цьому питанню.

Gazdic et al. проводили експерименти на мишах лінії C57Bl/6, яким внутрішньовенно вводили клітини карциноми легень Льюїс та через один тиждень – суспензію МСК (дослід) або сольовий розчин (контроль). Автори встановили збільшення кількості метастатичних вогнищ у легенях тварин та пригнічення як вродженої (супресія ДК та НК-клітин), так і адаптивної (супресія активності CD4⁺ Т-лімфоцитів хелперів та цитотоксичних CD8⁺ лімфоцитів) ланки імунітету. Часткове відновлення функціональних властивостей імунокомпетентних клітин відбулось за застосування інгібіторів iNOS і IDO. Крім того, МСК секретували значну кількість простагландинів та TGF- β , які також мають виразні імуносупресивні властивості. Автори зробили висновок, що зазначені механізми - IDO-залежний шлях імуносупресії, утворення токсичного оксиду азоту внаслідок підвищеної активності iNOS та синтез імуносупресивних цитокінів, - є

центральною у розвитку МСК-індукованої імуносупресії за пухлинного росту [315].

В іншому дослідженні встановлено, що одночасне введення МСК та клітин меланоми B16 мишам подвоювало кількість легеневих метастазів, не впливало на ступінь інфільтрації пухлин лімфоїдними клітинами, але збільшувало кількість CD11b⁺ мієлоїдних клітин з подальшим їх диференціюванням у макрофаги II типу. Нажаль, детальні механізми впливу на імунну систему не розглядались [307].

Протилежні результати були отримані Zhang et al. [107]. В двох модельних системах (внутрішньовенне введення мишам клітин меланоми B16 та у черевну порожнину клітин асцитної гепатоми H22 з наступним введенням аутологічних МСК на 0, 7 та 14-й день дослідження) вони виявили значне пригнічення пухлинного росту, що супроводжувалось зменшенням кількості макрофагів II типу та збільшенням Т-клітин ефektorів, що продукували гамма-інтерферон [107]. Застосування МСК кісткового мозку щурам з аденокарциномою кішківника затримувало початкові етапи розвитку та прогресію пухлин, збільшувало кількість тварин, в яких не розвинулись пухлини, зменшувало кількість пухлинних вогнищ та загальну масу пухлини [298]. Пригнічення пухлинного росту було опосередковано імунологічними механізмами, зокрема, зменшенням рівня інфільтрації пухлинної тканини CD68⁺ моноцитами/макрофагами з високою фагоцитарною активністю та, навпаки, збільшенням концентрації CD3⁺ лімфоцитів. Вплив МСК на клітини імунної системи був асоційований з присутністю у клітинах мікроРНК miR-150 і miR-7.

Shojaei et al. висловили думку, що МСК здатні поляризувати клітини імунної системи у напрямку імуносупресивних клітин (що пришвидшують ріст пухлин та їх метастазування) або клітин, спрямованих на розпізнавання пухлино-асоційованих антигенів (пригнічення пухлинного росту) і цей ефект МСК опосередковується профілем цитокінів та інших біологічно активних

речовин, які синтезують клітини [168]. Важливе значення сигналіngu, опосередкованого TGF- β , для модифікації імунної відповіді організму мезенхімними стовбуровими клітинами за наявності у реципієнтів пухлинного росту, підкреслюють de Araujo Farias et al. [155]. Costa et al. показали, що МСК, які присутні у мікрооточенні пухлини, через секрецію TGF- β пригнічують активність Т-клітин і НК-клітин. Застосування моноклональних антитіл, спрямованих проти рецепторів TGF- β , нормалізує функцію імунокомпетентних клітин [429].

1.11. Активація епітеліально-мезенхімного переходу за впливу мезенхімних стовбурових клітин.

Епітеліально-мезенхімний перехід (ЕМП) – клітинна програма, яка активується в ембріогенезі, при загоєнні ран і за розвитку пухлин [163]. Вона передбачає зміни у морфології та імунофенотипі клітин з епітеліального на мезенхімний. Вперше питання відносно того, що епітеліальні клітини можуть пригнічувати свої власні епітеліальні характеристики та набувати ознаки мезенхімних клітин, виникло у 1980-х роках минулого століття. На таку можливість вказували зміни морфологічної характеристики пухлинних клітин в процесі прогресії онкологічного захворювання.

ЕМП супроводжується втратою зв'язків епітеліальних клітин між собою, втратою апікально-базальної полярності, зміною морфології клітин, реорганізацією цитоскелету, втратою експресії Е-кадгеринів, зменшенням міжклітинних контактів, збільшенням здатності до міграції і метастазування. Початок ЕМП активується фактором транскрипції **SNAIL**, який пригнічує активність генів епітеліальних клітин та підвищує активність генів клітин мезенхімального походження. Ключовим етапом є інгібіція експресії Е – кадгеринів, які забезпечують утворення тісних контактів між епітеліальними клітинами. На другому етапі підвищується експресія генів, які кодують білки цитоскелету (віментин, актин гладких м'язів) та фібронектин, що важливо

отримання проліферативних сигналів від мікрооточенням та підвищення міграційних властивостей.

Подальша трансформація супроводжується реорганізацією цитоскелету, секрецією металопротеїназ, які сприяють деградації міжклітинного матриксу і базальної мембрани та є необхідною умовою для початку активного метастазування.

Саме на стадії ЕМП відбуваються найбільш характерні для пухлинного росту зміни морфології клітин. Безумовно, морфологічні особливості різні для клітин різного походження, але є деякі спільні риси. Переважно це стосується збільшення розмірів ядра, ніжної структури хроматину, появи ядерець. Цитоплазма набуває інтенсивно базофільного кольору при забарвленні, що пов'язано зі значною кількістю РНК в цитоплазмі і активним синтезом білків. Форма клітин змінюється, спостерігають багатоядерні клітини. У випадку пухлин епітеліального походження формуються залозистоподібні комплекси. При гістологічному дослідженні спостерігається порушення базальної мембрани та інвазія пухлинних клітин в оточуючі тканини.

Розглядається можливість прискорення ЕМП за рахунок злиття МСК з пухлинними клітинами [205]. Крім того, МСК можуть прискорювати швидкість ЕМП за рахунок синтезу, насамперед, трансформуючого фактору росту бета та деяких мікроРНК [253, 290, 378].

Схематично механізм впливу TGF- β на потенціювання механізмів ЕМП представлений на рис. 1.3.

Основним в активуючій схемі дії трансформуючого фактору бета та деяких інших цитокінів є пряме фосфорилування білків родини Smad як наслідок зв'язування TGF- β з відповідним рецептором на мембрані пухлинних клітин. Рецептор активовані (фосфорильовані) Smad2 і Smad3 формують гомодимер з білком Smad4, переміщуються до ядра клітин,

зв'язуються з іншими факторами транскрипції, утворюють багатокомпонентний транскрипційний комплекс.

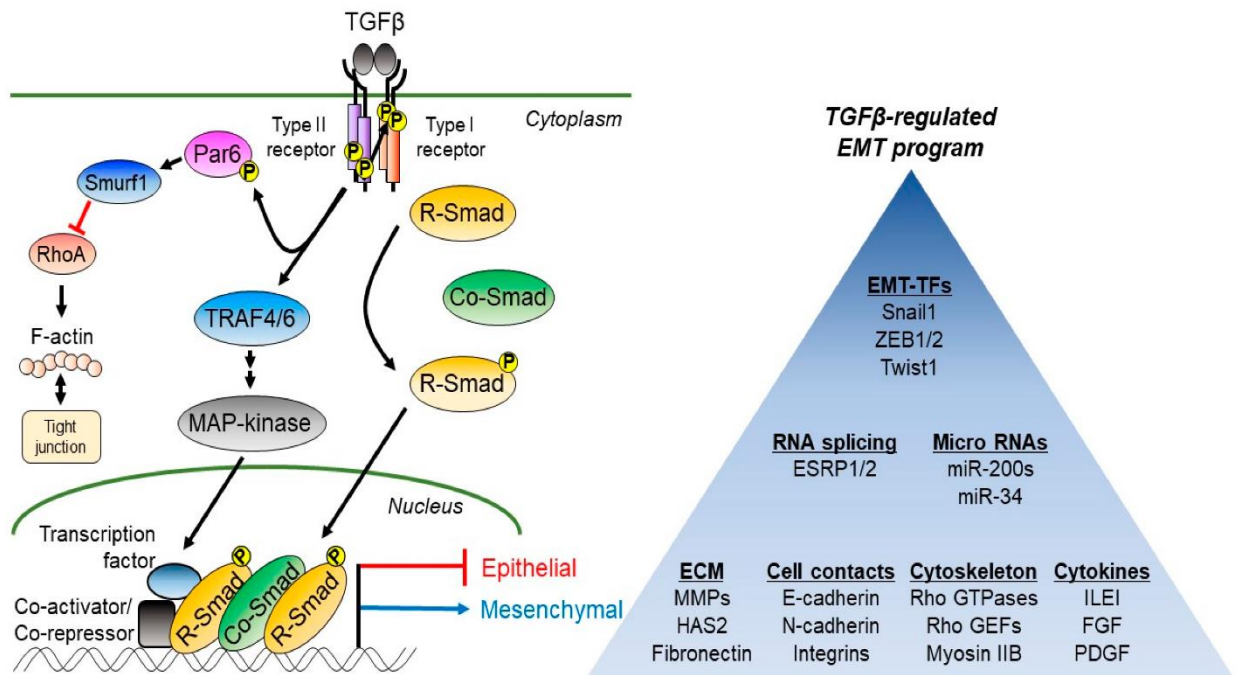


Рис. 1.3. Механізм впливу трансформуючого факторі росту бета, що секретується МСК, на процес епітеліально – мезенхімного переходу за Tsubakihara, Moustakas [456].

До складу комплексу може входили ко-активатор (підвищення експресії генів, асоційованих з мезенхімальним напрямком диференціювання), або ко-репресор транскрипції (зниження експресії генів, асоційованих з епітеліальним напрямком диференціювання [456]).

1.12. Вплив мезенхімних стовбурових клітин на регуляцію процесів апоптозу в пухлинних клітинах

Крім високої проліферативної активності, другою найважливішою властивістю неопластичних клітин є їх підвищена життєздатність, яка виникає внаслідок інгібування процесу апоптозу [257].

Апоптоз – запрограмована загибель клітин, внаслідок якої вони розпадаються на окремі апоптотичні тільца, обмежені плазматичною мембраною. Це фізіологічний процес, завдяки якому в організмі підтримується необхідна кількість клітин і який, крім того, запобігає накопиченню аномальних варіантів клітин.

Для пухлинних клітин характерним є зниження чутливості до індукції апоптозу, що значно підвищує їх життєздатність, робить їх менш чутливими до несприятливих умов мікрооточення, факторів протипухлинного імунітету і терапевтичних впливів.

Для пухлинних клітин характерні генетичні зміни, які призводять до ослаблення різних шляхів індукції апоптозу. За цих умов в них закономірно виявляються: втрата експресії на поверхні клітини рецепторів, пов'язаних з індукцією апоптозу (насамперед, Fas рецептора); порушення на шляху проведення апоптогенних сигналів від рецепторів і білків адаптерів до мітохондрій; мутації в генах каспаз і окремих кіназ; мутації гена *TP53*, який отримав назву «сторож геному»; пригнічення проникності мітохондріальної мембрани для цитохрому C і інших апоптоз – асоційованих білків внаслідок змін експресії білків родини bcl-2 тощо.

Відомо два основних механізми індукції апоптозу – зовнішній та внутрішній. Зовнішній індукується зв'язуванням рецепторів поверхневих мембран клітин з відповідним лігандом. Рецептори поверхневих мембран, активація яких призводить до індукції апоптозу, після зв'язування з лігандом змінюють конформацію внутрішньо цитоплазматичного домена, до якого приєднується білки адаптери. Останні містять у своєму складі домен, що отримав назву «домен смерті» (DD, death domain).

Найбільш відомим є білок FADD (Fas-associated protein with death domain) - білок, асоційований з Fas рецептором, що містить «домен смерті». Крім Fas рецептора, який широко представлений на поверхні гемопоетичних клітин, відомі і інші білки з DD, які приєднуються і до інших рецепторів

білків родини фактору некроза пухлин і також можуть запускати програму апоптозу. Це білки TRADD (асоційований з рецептором I типу до фактора некрозу пухлин), Toll-подібні рецептори, білок MyD88, анкірин та інші [470].

Стимуляція рецепторів, асоційованих з білками адаптерами, що містять «домени смерті», призводить до агрегації рецепторів на поверхневих мембранах і приєднання до їх цитоплазматичних доменів адапторних білків і прокаспаз 8, а також прокаспаз 10. Відбувається розщеплення прокаспаз і утворення їх активних форм. Це запускає каспазний каскад. Каспази 8 і 10 активують ефекторну каспазу 3. Субстратом для каспази 3 є білок ICAD (inhibitor of caspase-3 activated DNase – інгібітор ДНКаз, що активується каспазою 3), при розщепленні якого вивільняється ДНКаза, яка власно і розщеплює ДНК у міжнуклеосомному просторі (рис. 1.4).

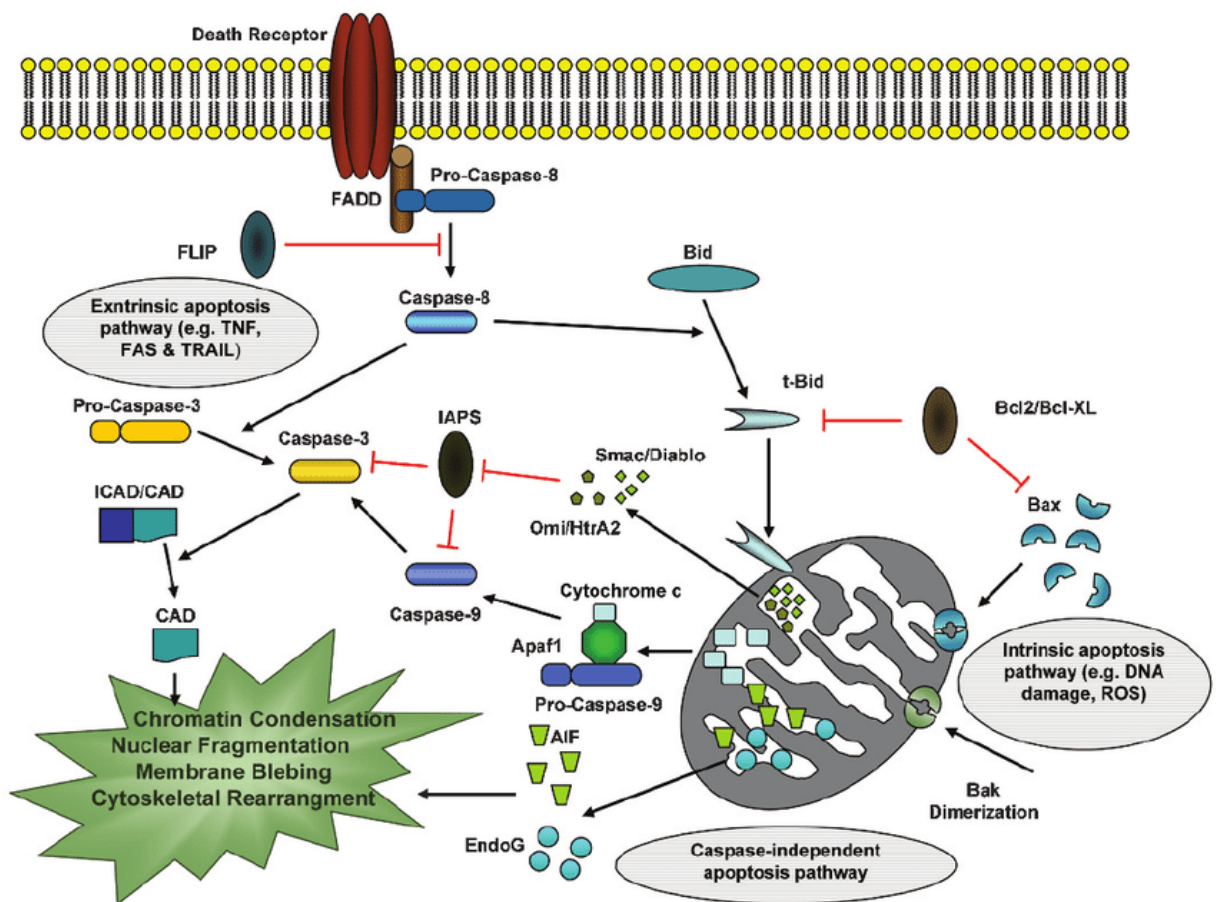


Рис. 1.4. Схема основних механізмів індукції апоптозу за Ghavami et al. [197].

Іншим субстратом для активованої каспази – 3 є білок Bid, який після дії каспази 3 утворює трунковану форму (tBid). Остання переміщується у мітохондрії і сприяє утворенню гомодимерів про-апоптотичних білків Bax і Bak. Це порушує баланс між про-апоптотичними і анти-апоптотичними білками родини Bcl-2, призводить до розкриття пор мітохондрій, виходу в цитозоль клітин цитохрому С, активації каспаз і власне розвитку апоптозу [457, 472].

Внутрішній механізм розвитку апоптозу пов'язаний безпосередньо із зміною рівня експресії проапоптотичних і антиапоптотичних білків родини Bcl-2 і розкриттю пор мітохондрій для виходу з них цитохрому С (рис. 1.5).

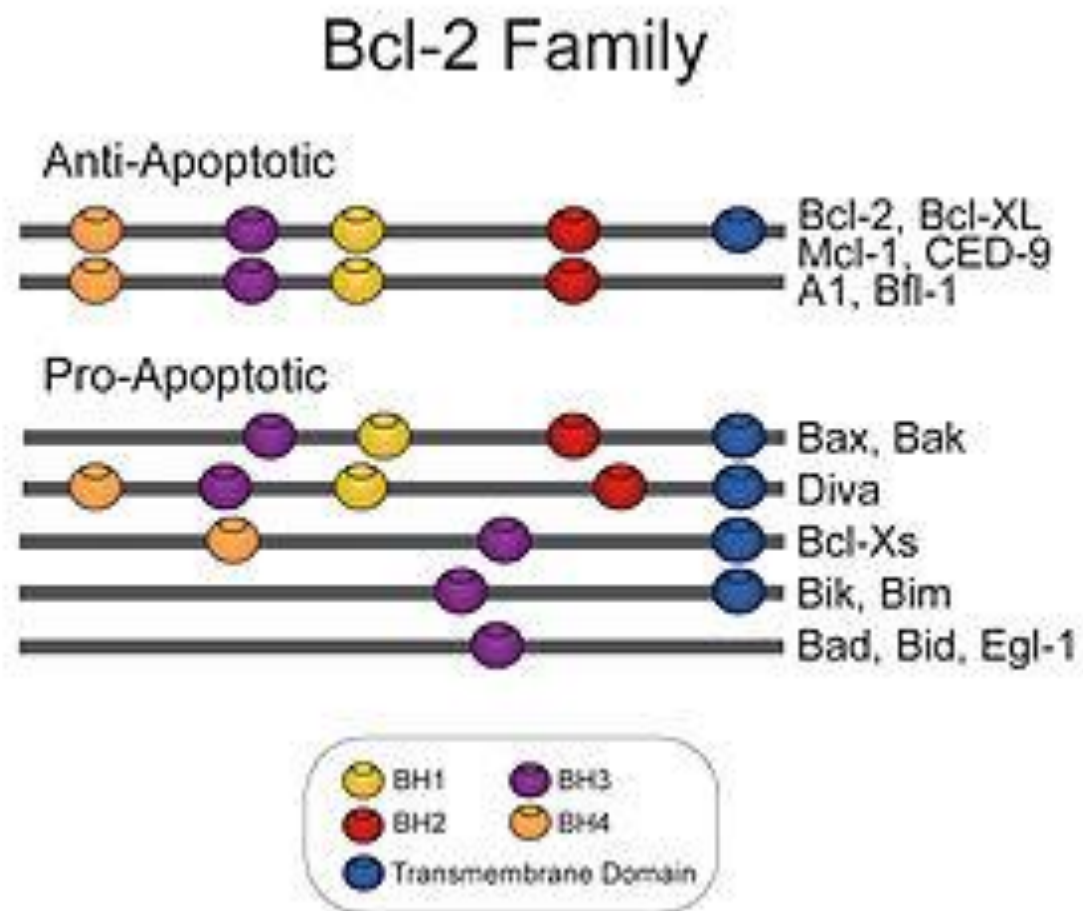


Рис. 1.5. Схематичне представлення основних білків родини Bcl-2 за [457]. BH – окремі гомологічні домени.

Родина Bcl-2 споріднених білків велика, експресія окремих білків обумовлена активністю 25 генів [457].

Переважно внутрішній шлях розвитку апоптозу індукується при появі ушкоджень ДНК, які клітина не може репарувати. В таких умовах підвищується експресія фактора транскрипції TP53, який активує транскрипцію білків зупинки клітинного циклу і низки про-апоптотичних білків – Вах, PUMA, Noxa.

Їх збільшена кількість по відношенню до анти-апоптотичних білків (основний з яких Bcl-2) змінює параметри мітохондріальних пор, внаслідок чого спостерігається вихід цитохрому С у цитоплазму. Останній утворює у цитоплазмі комплекс з білком Araf1 (білок 1, що активує апоптотичні протеази), відбувається активація каспази 9, яка, у свою чергу, активує каспазу 3, а та звільнення ДНКазу і розвиток апоптотичних змін [380].

Етапи розвитку апоптозу за зовнішнім (мембранним) і внутрішнім (мітохондріальним) механізмами достатньо ретельно охарактеризовані, як і чисельні порушення пухлинних клітин, що призводять до резистентності у відповідь на дію про-апоптотичних сигналів [340, 369, 433].

Експериментальні дані свідчать, що найчастіше мезенхімні стовбурові клітини знижують чутливість пухлинних клітин до індукції апоптозу. Механізми цього явища досліджені лише у поодиноких роботах.

Основна увага приділяється наявності мікроРНК в складі позаклітинних везикул – екзосом. Наприклад, в клітинах нервової тканини за розвитку нейродегенеративних захворювань, застосування МСК призводить до підвищення експресії білка Bcl-2, зміцнення мембран мітохондрій, попереджує вихід цитохрому С у цитоплазму і активацію ефекторних каспаз [316]. Вважають, що такий вплив опосередковується мікроРНК miR-21, яка змінює баланс транскрипції анти- і про-апоптотичних білків у клітинах, оскільки здатна до інтерференції з матричною РНК [312].

Другий механізм пригнічення апоптозу за дії МСК пов'язаний з впливом на рібонуклеопротеїн РТВР1 (polypyrimidine tract-binding protein 1), який відноситься до родини ядерних білків, задіяних в процесах альтернативного сплайсингу і регуляції генної експресії [268]. Його вплив на процеси апоптозу опосередкований зміною співвідношення про- і анти-апоптотичних білків на мембрані мітохондрій. Як показали Fu et al., за дії МСК в клітинах ліній HT29 (рак товстого кішківника) і MCF7 (рак молочної залози) експресія РТВР1 знижується, що супроводжується підвищенням рівня злоякісності пухлинних клітин, резистентністю по розвитку апоптозу, більш високим рівнем проліферації і індукцією епітеліально – мезенхімального переходу [423]. Ефект опосередковується мікроРНК, які присутні в екзосомах мезенхімальних клітин (miR339, miR133a, miR149a).

Водночас в літературі ми виявили також дані щодо посилення апоптотичного процесу під впливом МСК.

Так, Liu et al. показали, що екзосоми МСК при обробці пухлинних клітин лінії K562 (клітини від хворого на хронічну мієлоїдну лейкемію) підвищують експресію про-апоптотичного білка Вах та зменшують експресію анти-апоптотичного білка Bcl-2. У відсутності дії апоптотичного стимулу це не відображається на життєздатності пухлинних клітин. Однак, за застосування іматинібу, який пригнічує основний сигнальний шлях, асоційований з індукцією проліферації в клітинах K562, за дії МСК рівень апоптотичних клітин суттєво зростає [177].

В іншому дослідженні встановлено, що культуральне середовище МСК індукує апоптоз нейтрофілів, який асоційований з пригніченням NF-κB сигнального шляху під впливом ендотоксину [302].

У пухлинних клітин деяких типів реєструється пригнічення й іншого способу програмованої смерті – аутофагії, програми лізосомальної деградації білків. Зокрема, це характерно для ракових клітин молочної залози, яєчників і простати, в яких інгібування аутофагії пов'язано з делецією одного з генних

алелей Beclin1, білковий продукт якого відіграє ключову роль в утворенні аутофагосом [92, 95, 200]. Цей механізм клітинної загибелі був досліджений відносно недавно, про що свідчить і отримання Нобелівської премії за його відкриття у 2016 році. Можливо тому в літературі ми не виявили робіт стосовно впливу МСК на регуляцію аутофагії в злоякісних пухлинах.

Розглядається вплив на процеси аутофагії в непухлинних клітинах, які зазнали дії стресорних факторів, за дії МСК. Так, Woodall, Gustafsson показали, що МСК здатні пригнічували аутофагію, що розвивається в кардіоміоцитах в ішемічних умовах [477].

Li et al. отримали аналогічні результати за експериментального інфаркту міокарда щурів і з'ясували, що кардіопротективний ефект реалізується через зменшення проявів аутофагії внаслідок впливу мікроРНК miR-301, яка знаходиться в екзосомах мезенхімальних стовбурових клітин [176].

Це робить перспективним використання МСК для лікування захворювань, що супроводжуються дизрегуляцією процесів аутофагії, зокрема кардіоміодилатаційних станів, інфаркту міокарда, гострих порушень мозкового кровотоку тощо [176, 246, 259, 402, 446] .

1.13. Вплив мезенхімних стовбурових клітин на індукцію пухлинного росту в організмі реципієнтів

Високий терапевтичний потенціал застосування МСК призвів до їх широкого застосування в медицині і ветеринарній медицині. Водночас, виникли питання безпечності терапії на основі препаратів МСК, насамперед по відношенню до можливої індукції пухлинного процесу. Головним чином, це зумовлено тим, що МСК за багатьма параметрами нагадують клітини пухлин: здатність до самопідтримання, висока проліферативна активність, спільні активовані шляхи внутрішньоклітинної передачі сигналу, тощо.

За результатами клінічних випробувань в жодному випадку не зафіксовано зростання ризику розвитку онкологічної патології за впливу МСК [330]. Однак, за певних умов в експериментах *in vitro* відбувається онкологічна трансформація МСК.

Так, в культурах МСК мишей було показано, що зі збільшенням кількості пасажів збільшується туморогенна властивість клітин [400]. Автори надали детальну порівняльну характеристику МСК з кісткового мозку мишей різних пасажів. Так, клітини першого пасажу мали високу здатність до диференціювання в остеогенному напрямку, експресували антигени Thy - 1, SSEA - 1 і Flk - 1, в переважній більшості мали нормальний генотип. Клітини 2 – 5 пасажів поступово збільшувались у розмірі, мали нижчу проліферативну активність і поступово втрачали здатність до остеогенного диференціювання. Починаючи з 29-го пасажу, розмір клітин зменшувався, вони набували більш округлу форму, та починали формувати пухлини за введення тваринам *in vivo*. Після 54-го пасажу МСК втрачали експресію антигенів Thy - 1, SSEA - 1 і Flk - 1, експресували антиген CD13, у 90 % мали аберантний генотип, формували пухлини з більш коротким латентним періодом після трансплантації. Експресія протоонкогена *c-Myc* збільшувалась поступово зі збільшенням часу культивування клітин.

Rubio et al. дослідили здатність МСК з жирової тканини людини трансформуватись у пухлинні клітини [417]. Вони показали, що МСК ранніх пасажів при трансплантації імуноскопроментованим мишам не викликали розвиток пухлин в жодному випадку. Напроти, трансформовані МСК (т-МСК) в 100 % індукували пухлинний процес у тварин-реципієнтів. На основі комплексу досліджень автори надали характеристику т-МСК:

- це клітини пізніх пасажів, в яких після етапу закономірного старіння культури відбувається повторна активація проліферативних процесів;

- трансформація супроводжується змінами морфології клітин: вони набувають округлої форми, загальний розмір клітин зменшується, але ядерно-цитоплазмове співвідношення збільшується;
- знижується експресія антигенів CD34, CD90, CD105; натомість підвищується рівень експресії протоонкогена *c-Myc*;
- драматично зростає рівень генетичної нестабільності. Найбільш часті хромосомні аномалії – трисомія 7, тетраплоїдія, транс локації 3-ї і 12-ї хромосом, внутрихромосомні перебудови хромосоми 5, тощо.

В іншому дослідженні показано, що трансформація МСК (в роботі були використані клітини щурів) також відбувається у довгострокових культурах і супроводжується втратою контактної інгібіції клітинного росту та здатності до мультилінейного диференціювання. Трансформовані клітини набувають здатності до росту без прикріплення до субстрату. В них з'являються аномалії гена *TP53*, найчастіше - мутації 942C>T, які локалізуються у ДНК-зв'язуючому домені і порушують взаємодію білка p53 як фактора транскрипції з генами-мішенями. Це призводить до зниження експресії сурвівіна і порішенням чутливості клітин до індукції апоптозу [273].

Ще один механізм індукції пухлинного росту за впливу МСК пов'язаний зі схильністю організму реципієнта МСК до розвитку онкологічних захворювань. Така вірогідність була продемонстрована Houghton et al. [195]. Автори внутрішньовенно вводили МСК з кісткового мозку мишам лінії C57BL/6. У тварин з індукованим за допомогою *Helicobacter pylori* гастритом, було виявлено накопичення МСК у слизовій оболонці шлунка і поступова трансформація через етап метаплазії і дисплазії у внутрішньоепітеліальний рак шлунка. Навпаки, у контрольних мишей ознак накопичення МСК у слизовій оболонці шлунка не було і у жодному випадку розвиток злоякісних пухлин шлунка або іншої локалізації не відмічений. Автори роблять висновок, що цитокіни і інші біологічно активні

речовини в місцях хронічного запалення можуть сприяти злоякісній трансформації МСК.

Таким чином, зазначені дослідження підкреслюють важливість оцінки якості культур МСК для введення в організм реципієнтів. Введення препаратів старіючих клітинних культур є неприпустимим. Крім того, важливим є оцінка стану здоров'я реципієнтів МСК з погляду на можливість потенціювання пухлинного росту.

Висновок до розділу 1

Підсумовуючи проаналізовані в сучасній літературі дані відносно морфологічних, функціональних властивостей мезенхімальних стовбурових клітин, перспектив їх застосування та впливу на перебіг пухлинного процесу, можна зробити наступні висновки:

1. Тема дослідження МСК є актуальною, про що свідчить велика кількість публікацій (13348 за останні п'ять років) та їх динаміка (рис. 1.6).
2. Постійно проводяться дослідження, спрямовані на вдосконалення і стандартизацію процедур отримання МСК різного походження, їх здешевлення. Однак, до теперішнього часу, особливо у ветеринарній практиці, оптимальні параметри умов виділення МСК і уніфікація отриманих МСК остаточно не проведені.
3. Не визначені характеристики МСК, які в повній мірі будуть відображати їх функціональні властивості і визначати поведінку в організмі тварин – реципієнтів: вплив на імунні реакції, ангиогенез, формування і модифікацію сполучної тканини тощо.
4. Вплив МСК на мікросередовище пухлин, а також на біологічні властивості самої пухлинної тканини є складним процесом, остаточно не з'ясованим, і тому актуальність цього питання не викликає сумніву.

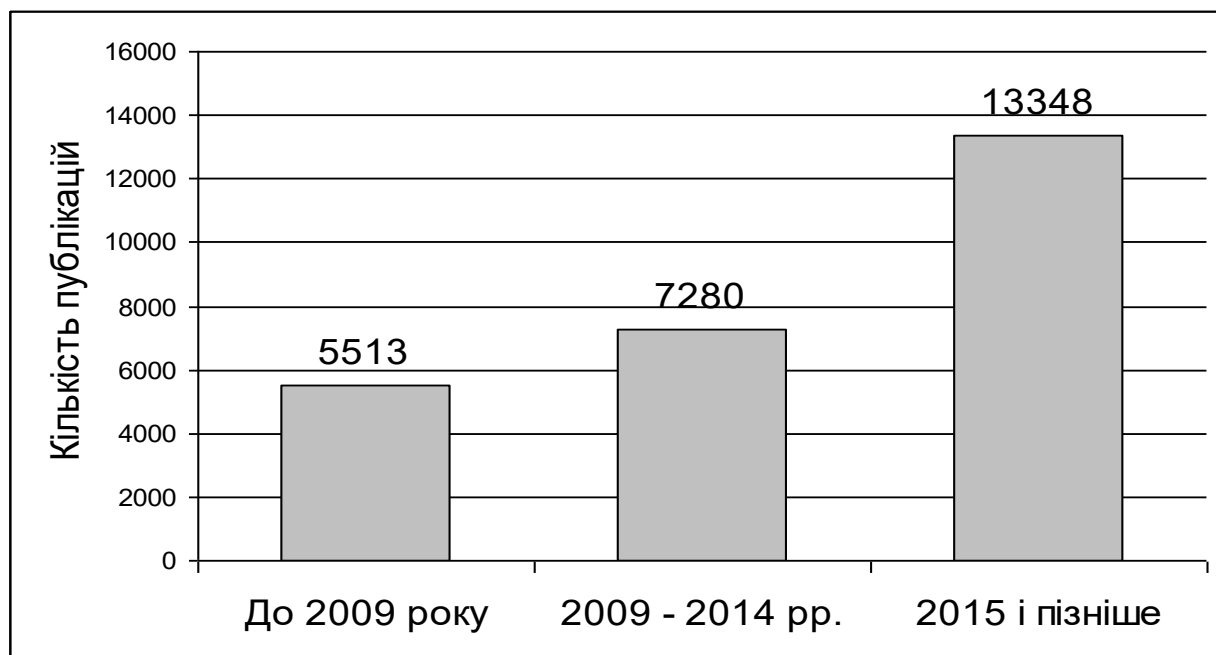


Рис. 1.6. Загальна кількість публікацій, присвячена МСК, у Міжнародній базі даних PubMed (за даними сайту доступу <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>)

Отже, проведення морфологічних та функціональних досліджень стовбурових клітин різного походження та їх вплив на пухлинний процес є актуальним питанням. Таким чином, виходячи з вище викладеного були сформульовані мета і задачі дисертаційної роботи.

РОЗДІЛ 2

ВИБІР НАПРЯМКІВ ДОСЛІДЖЕНЬ, МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Дисертаційна робота виконана протягом 2013–2019 років на кафедрі фізіології, патофізіології та імунології тварин, на базі проблемної науково-дослідної лабораторії фізіології та експериментальної патології тварин кафедри фізіології, патофізіології та імунології тварин, навчально-наукової лабораторії «Центр клітинних технологій у ветеринарній медицині» кафедри фізіології, патофізіології та імунології НУБіП України, кафедри хірургії і патофізіології імені академіка І. О. Поваженка Національного університету біоресурсів і природокористування (НУБіП) України. Окремі дослідження виконані на базі відділу експериментальних клітинних систем Інституту експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р. Є. Кавецького НАН України, Українській лабораторії якості та безпеки продукції агропромислового комплексу НУБіП 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 C57Bl/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 цуценят та 12 кошенят.

Дослідних тварин утримували та використовували в експериментах з дотриманням вимог Закону України «Про захист тварин від жорсткого поводження» (Відомості Верховної Ради, 2010, № 9), Директиви 2010/62 ЄС, Наказу № 249 МОН України від 01.03.2012 р. Годівлю дослідних тварин здійснювали за раціоном, який відповідав потребі в поживних речовинах, мікро-, макроелементах та вітамінах. Тварини мали вільний доступ до води.

Первинний матеріал (жирову тканину собак, коней, котів) отримували під час проведення планових операцій (оваріоектомія, оваріогістеректомія, ушивання грижі тощо) на базі лікарні ветеринарної медицини м. Києва, Голосіївський проспект, 105 Б.

Роботу з отримання стовбурових клітин із первинного матеріалу (жирова, нервова тканина, кістковий мозок) проводили в навчально-науковій лабораторії «Центр клітинних технологій у ветеринарній медицині» кафедри фізіології, патофізіології та імунології НУБіП України, у кабінеті біологічної безпеки II класу (ESCO).

Поживні середовища, розчини та реактиви зберігали в побутовому холодильнику Nord (Україна) за температури від -18°C до $+4^{\circ}\text{C}$ згідно інструкції щодо зберігання. Центрифугування клітинних суспензій здійснювали на центрифугі UNICO (США). Термостат ТС-80М (Україна) використовували для підігрівання реактивів. Висушування та стерилізацію культурального посуду здійснювали в сухожаровій шафі HS-62A (Польща) і повітряному стерилізаторі ГПО-50 (Україна), автоклавування гумових пробок, центрифужних пробірок проводили в автоклаві МЕДИ (Росія). Приготування розчинів, гомогенатів тканин здійснювали за допомогою магнітної мішалки ММ-5 (Україна). Дистильовану воду отримували за допомогою дистильатора АСД-4 (Росія). Дейонізовану воду для приготування розчинів отримували з використанням дейонізатора ElgastatUNQ (Великобританія). Зважування реагентів здійснювали на електронних вагах AXIS A500 (Польща) та REDWAG AS220X (Польща). Для стерилізації розчинів використовували шприцеві нітроцелюлозні фільтри Millipor (США) з діаметром пор $0,22\text{ мкм}$. Підрахунок клітин здійснювали в камері Горяєва (Росія) з використанням мікроскопу PrimoVert (Німеччина). рН-метр рН-150М (Білорусія) використовували для визначення показника рН розчинів. Визначення вмісту ліпідів жирних кислот стовбурових клітин проводили згідно ДСТУ ISO 5508-2001. Підготовку проби проводили згідно ДСТУ 150

5509-2002. Суміш метилових ефірів жирних кислот аналізували на газовому хроматографі Trace GC Ultra з полум'яно-іонізаційним детектором на капілярній колонці SPTM-2560, 100 m x 0,25 mm ID, 0,20 μ m film (Supelco). Культивування клітин проводили в CO₂-інкубаторі HERACELL (Німеччина) за температурного режиму 37° C, 5 % вмісту CO₂ та абсолютної вологості повітря. Для зберігання клітин використовували резервуар Дьюара СДС-20 (Україна), наповнений рідким нітрогеном.

Обладнання, що було задіяне у дослідженнях, застосовували згідно інструкції до використання. Усі вимірювальні прилади, що були використані для наукових досліджень, проходили регулярний метрологічний контроль.

Для роботи з первинним матеріалом та культурами клітин використовували поживні середовища та розчини, які готували перед дослідженнями.

Приготування фосфатно-буферного розчину Дюльбекко (ФБР).

1. Відважували 13,4 г порошку фосфатного буферу (Sigma, США) на вагах.
2. У мірний циліндр вносили 1 дм³ бідистильованої води.
3. Наважку порошку фосфатного буферу вносили до мірного циліндру, перемішуючи вміст до повного розчинення порошку.
4. Здійснювали фільтрацію ФБР у стерильний флакон за допомогою стерильного фільтра з діаметром пор 0,22 мкм.
5. Флакон маркували, вказуючи назву розчину та дату приготування [34].

Приготування середовища Ігла, модифікованого Дюльбекко (DMEM)

1. Відважували 9,6 г сухого поживного середовища DMEM (Sigma, США) на вагах.
2. У мірний циліндр вносили 1 дм³ бідистильованої води.
3. У мірний циліндр вносили наважку сухого поживного середовища DMEM та перемішували до повного розчинення середовища.

4. Наважку 2 г бікарбонату натрію додавали до розчиненого середовища, при цьому колір його змінювався з жовтого на червоно-малиновий.

5. Здійснювали фільтрацію середовища у стерильний флакон за допомогою стерильного фільтра з діаметром пор 0,22 мкм

6. Флакон маркували, вказуючи назву середовища та дату приготування[34].

Приготування 0,25 % розчину трипсину

1. Відважували 2,5 г порошку трипсину (Sigma, США) на вагах.

2. У мірний циліндр вносили 1 дм³ фосфатно-буферного розчину Дюльбеко (Sigma, США).

3. Наважку порошку трипсину вносили до мірного циліндру, постійно перемішуючи вміст до повного розчинення порошку трипсину.

4. Проводили фільтрацію 0,25 % розчину трипсину в стерильний флакон за допомогою стерильного фільтра з діаметром пор 0,22 мкм.

5. Флакон маркували, вказуючи назву середовища та дату приготування [34].

Приготування розчину трипсину-EDTA.

1. Відважували 2,5 г порошку трипсину (Sigma, США) на вагах.

2. У мірний циліндр вносили 1 дм³ бідистильованої води.

3. Наважку порошку трипсину вносили до мірного циліндру, постійно перемішуючи вміст.

4. Відважували 0,273 г порошку етилендіамінтетраоцтової кислоти (EDTA) (Sigma, США) на вагах.

5. Наважку порошку EDTA додавали у флакон до розчину трипсину.

6. Розчин поміщали на магнітну мішалку для повного розчинення порошку в розчині.

7. Проводили фільтрацію 0,25 % розчину трипсину-EDTA в стерильний флакон за допомогою стерильного фільтра з діаметром пор 0,22 мкм.

8. Флакон маркували, вказуючи назву середовища та дату приготування [34].

У **першій серії** досліджень отримували стовбурові клітини різного походження. Розробляли методики отримання первинного матеріалу та культивування стовбурових клітин культури жирової тканини собаки, коня, культури нервової тканини кота, культури кісткового мозку миші *in vitro*. Досліджували вплив методів отримання з різного первинного матеріалу, умов культивування та кріоконсервування на біологічні властивості мультипотентних стовбурових клітин: морфологічні (площа ядра, цитоплазми, ядерно-цитоплазматичне співвідношення), функціональні (життєздатність, клітинний цикл, проліферативна активність, чутливість до апоптозу), імунофенотип клітин (експресію внутрішньоядерних, цитоплазматичних і мембранних білків), клітинний цикл, вміст жирних кислот у ліпідах стовбурових клітин, секрецію інтерлейкіну 6.

У другій серії досліджень визначали вплив МСК на інтактних мишей лінії C57Bl/6, а саме, біохімічні показники крові; функціональний стан тимусу, селезінки (ваговий індекс, клітинність); активність перитонеальних макрофагів, порівняльна характеристика впливу МСК КМ і МСК ЖТ на функціональний стан імунних органів мишей лінії C57Bl/6; активність сукцинатдегідрогенази мітохондрій печінки тварин; поява пухлин через 3 місяці після введення МСК.

У третій серії досліджень моделювали карциному легені Льюїс у мишей дослідних груп та визначали вагу тварин, масу первинної пухлини, загальну кількість, об'єм та розміри метастазів; досліджували клітинний цикл, апоптоз, анеуплоїдію клітин первинної пухлини; проводили

гістологічні дослідження м'язової тканини, ураженої трансплантованою карциномою легені Льюїс (рис 2.1).

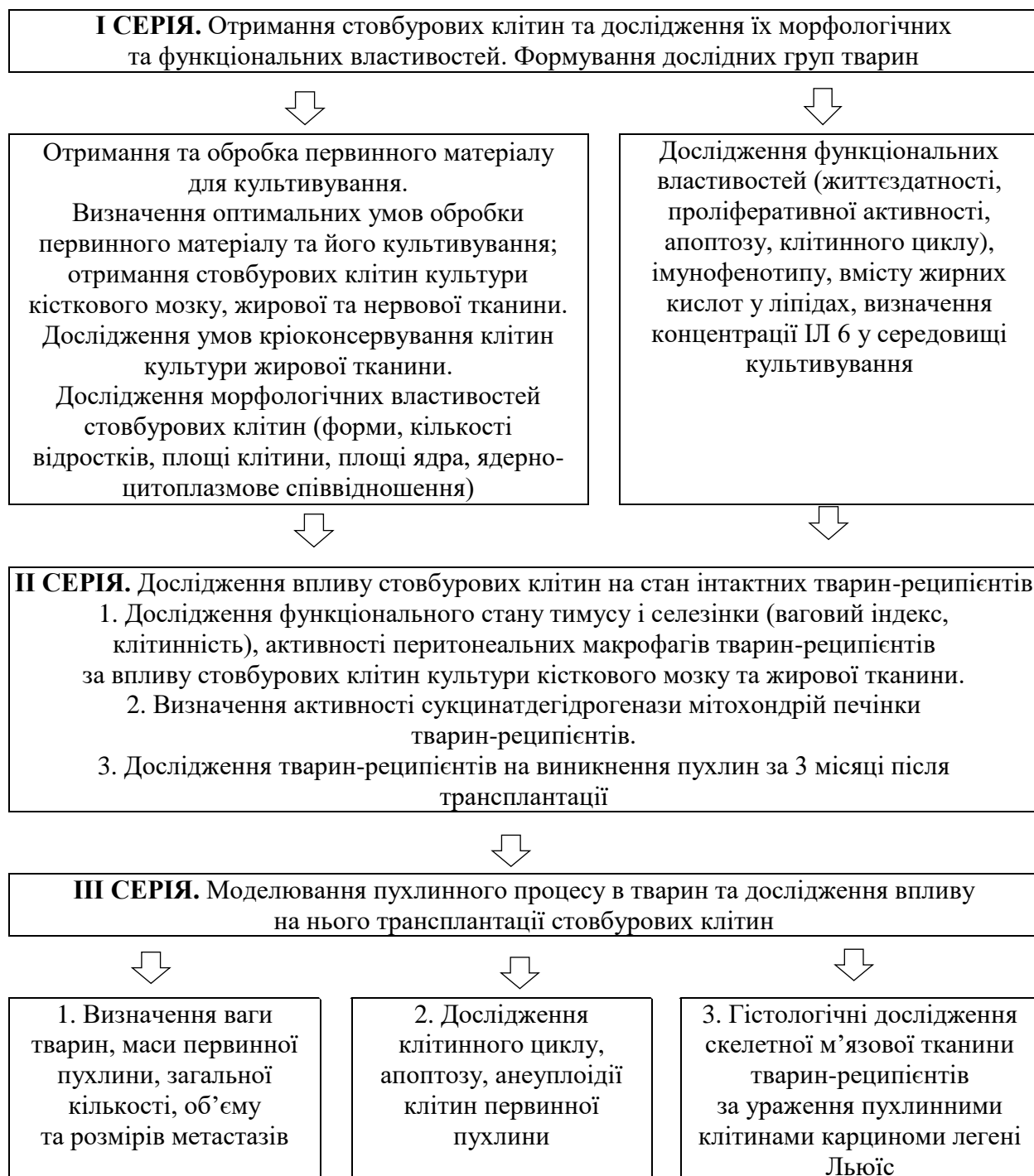


Рис. 2.1. Загальна схема досліджень

У дослідженнях використано матеріал 250 самців лінійних мишей C57Bl/6, 20 собак 10-18-місячного віку, 3 голів коней та 20 новонароджених кошенят.

Отримання мезенхімних стовбурових клітин культури кісткового мозку мишей лінії C57Bl/6.

Отримання МСК культури кісткового мозку включало в себе два етапи: хірургічний – отримання кісткового мозку, та біотехнологічний – виділення із отриманого аспірату червоного кісткового мозку моноклеарних клітин з високою проліферативною активністю та їх культивування для нарощування необхідної кількості МСК.

Евтаназію дослідних мишей здійснювали шляхом зміни дислокації шийних хребців під наркозом. Препарували трубчасті кістки – стегову, велику гомілкову, плечову та поміщали їх у фосфатно-буферний розчин з вмістом антибіотика-антимікотика (Sigma, США кат. номер A5955).

У стерильному боксі кістки тричі промивали фосфатно-буферним розчином з додаванням антибіотика-антимікотика та переносили в інший стерильний посуд, видаляли епіфізи кісток (рис. 2.2).

З діафізів кісток вимивали кістковий мозок за допомогою шприца з голкою, використовуючи поживне середовище DMEM (рис. 2.3), і таким чином отримували суспензію клітин червоного кісткового мозку (рис. 2.4).

У процесі центрифугування суспензії у відповідному градієнті щільності фіколу (Sigma, Aldrich,) та визначеної відцентрової сили відбувалось розшарування рідини, і моноклеарні клітини локалізувалися над фіколом у вигляді кільця.

Отримані клітини обережно знімали за допомогою піпетки та вносили у центрифужну пробірку, відмивали з ФБР та переносили в чашки Петрі для культивування.

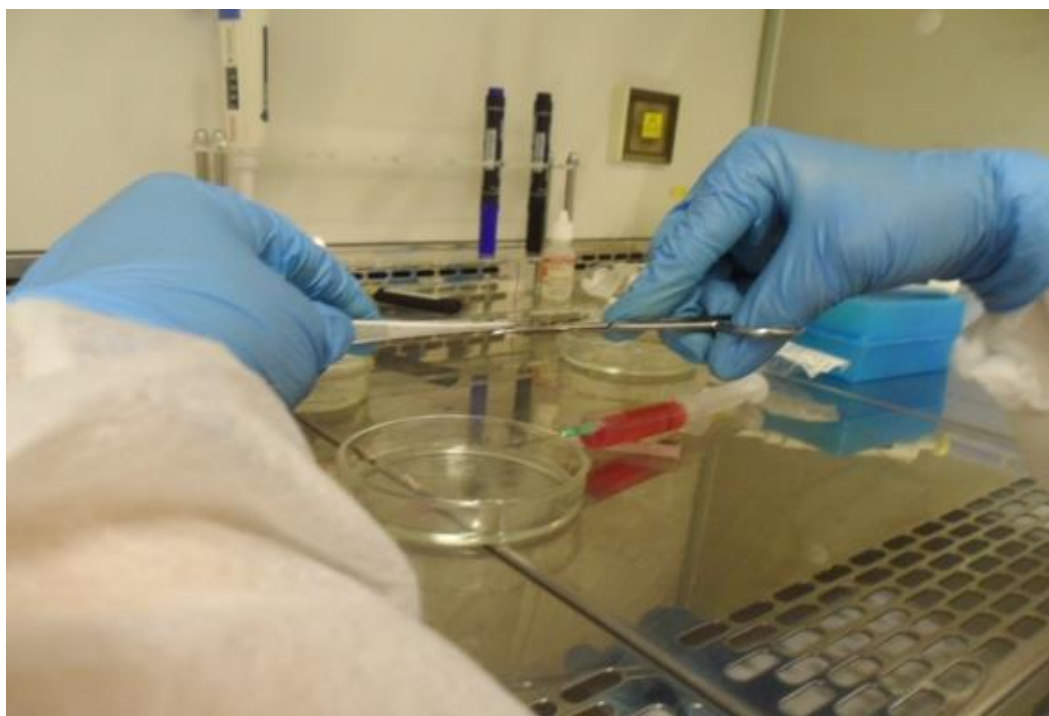


Рис. 2.2. Видалення епіфізів стегнової, великої гомілкової, плечової кісток мишей C57 Bl/6.

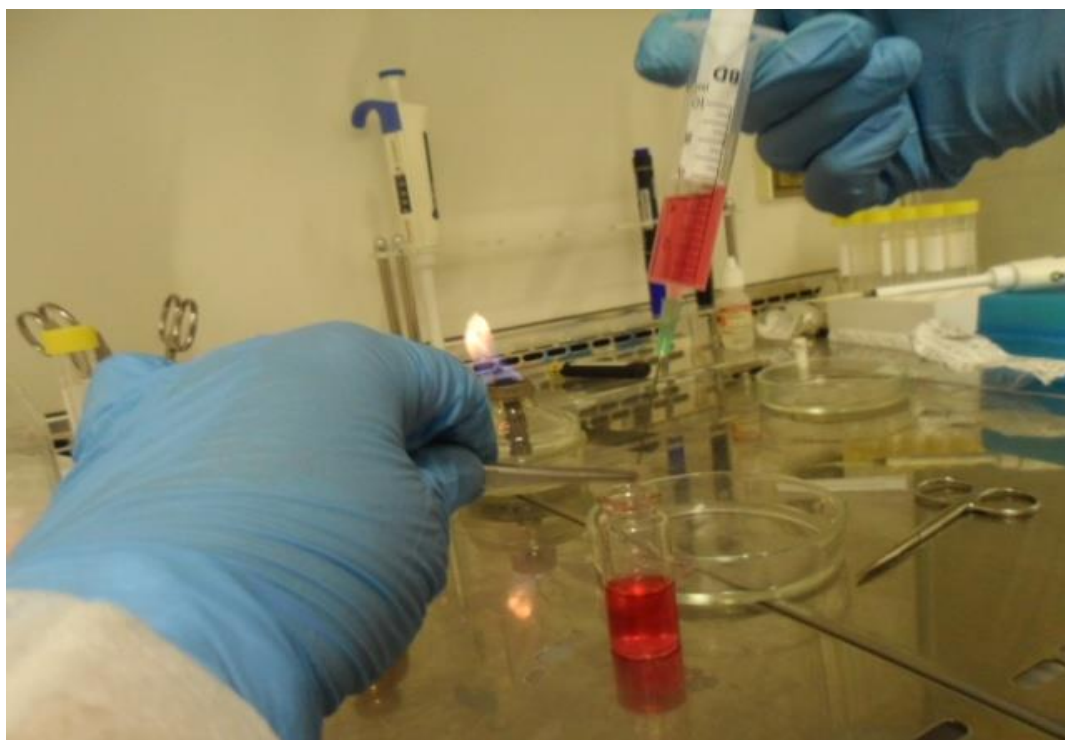


Рис. 2.3 Аспірація кісткового мозку зі стегнових, плечових та великих гомілкових кісток мишей C57Bl/6

У дослідях з оцінки ефективності методу виділення клітин моноклеарної фракції кісткового мозку миші за визначенням їх проліферативної активності та утворенням колоній при культивуванні нами було досліджено чотири комбінації методу розділення суспензії клітин кісткового мозку у чотирьох градієнтах щільності фіколу: 1,074, 1,076, 1,078, 1,080.

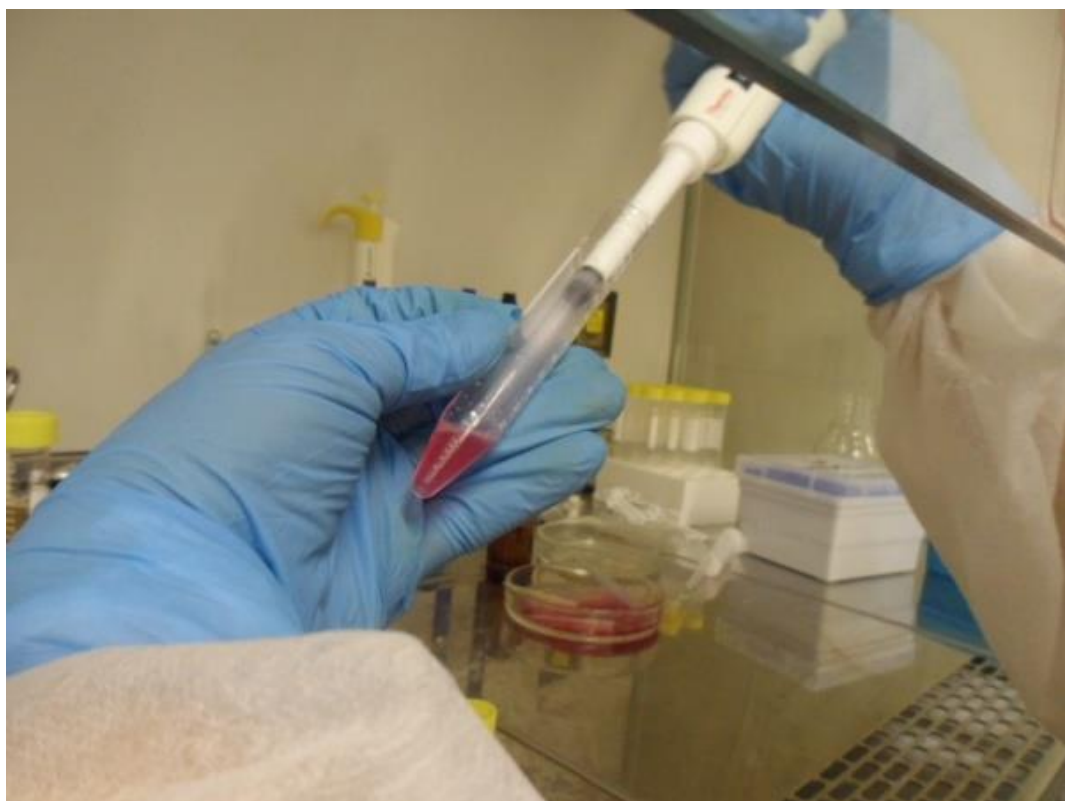


Рис. 2.4. Ресуспензування аспірату кісткового мозку у середовищі DMEM.

Отриманий аспірат ресуспендували в середовищі DMEM і суміш клітин нашаровували на градієнт щільності фіколу (Sigma, Aldrich,) та центрифугували впродовж 30 хв. за відцентрової сили 300 g [42].

Культивування проводили в одноразовому пластиковому посуді у поживному середовищі DMEM з додаванням 20 % FBS, 1 % антибіотика – антиміотика у CO₂ - інкубаторі HERACELL (Німеччина) за температурного

режиму 37° C, 5 % вмісту CO₂ та вологості повітря 96 %. Культуральне середовище замінювали на свіже кожні 72 години. З метою визначення оптимальних умов культивування порівнювали властивості МСК, які росли у середовищі DMEM або RPMI.

Отримання мезенхімних стовбурових клітин культури жирової тканини.

Отримання первинного матеріалу (жирової тканини) коня. Особливостями методу відбору жирової тканини в коня є: вибір оптимального місця для виконання оперативного втручання, застосування найменш травматичного для тварини методу її фіксації, використання найменшої кількості седативного препарату. Це дозволяє значно скоротити період адаптації тварини у післяопераційний період. У коней проби первинного матеріалу для виділення стовбурових клітин відбирали в ділянці між коренем хвоста та сідничою ділянками.

З метою седації перед проведенням оперативного втручання застосовували Седазін (Biowet Pulawy, Польща) внутрішньовенно у дозі 3 - 5 мл препарату на 100 кг ваги тіла. Коня фіксували в стоячому положенні. Для цього на ділянку пута грудної кінцівки надівали ремінь, з'єднаний через кільце з довгою мотузкою, яку перекидали через спину тварини і обводили навколо грудної клітки. Вільний кінець мотузки утримував помічник, який знаходився з протилежного боку. Піднімали передню кінцівку зі сторони взяття проби й згинали її в карпальному суглобі, а помічник у цей час натягував мотузку й утримував кінцівку піднятою. Коли тварина дуже непокоїлася, а також коли минула потреба у фіксації, помічник повільно опускав мотузку, щоб кінь міг спиратися на кінцівку.

Застосований нами метод відбору первинного матеріалу (підшкірної жирової тканини коня) є досить легким у виконанні та передбачає фіксацію, яка не завдає болю тварині та виключає травматизацію у порівнянні з іншими

способами фіксації (повал, накладання закрутки на верхню губу). Використання незначної дози седативного препарату не спричинює негативної дії на фізіологічний стан систем і органів та водночас запобігає виникненню стресу в тварини.

Отримання жирової тканини мишей лінії C57BL/6. У мишей первинний матеріал відбирали після евтаназії. Тварин обробляли 70 % етиловим спиртом. У стерильних умовах розрізали шкіру, черевну стінку, відбирали жирову тканину черевної порожнини (рис. 2.5). 10-20 г відібраного матеріалу переносили у стерильний посуд з фосфатно-буферним розчином.



Рис. 2.5. Відбір абдомінальної жирової тканини в мишей C57BL/6

Отримання жирової тканини собак. Зразки жирової тканини відбирали в собак віком до 18-ти місяців під час планових оперативних втручань у лікарні ветеринарної медицини. Перед проведенням оперативного втручання (оваріогістероектомії, оваріоектомії) тварин піддавали седатії внутрішньом'язовим введенням ксилазіну з розрахунку 3 мг на 1 кг ваги тіла тварини. Відбирали зразки жирової тканини вагою 20-30 г з дотриманням

всіх правил асептики та антисептики та переносили їх у стерильний посуд з додаванням ФБР та 1 % антибіотика-антимікотика. Первинний матеріал у термосі з температурою 4-5 °С в найкоротші терміни транспортували в лабораторію.

Обробка первинного матеріалу та культивування клітин культури жирової тканини тварин. У лабораторії в стерильному боксі первинний матеріал тричі промивали ФБР з антибіотиком-антимікотиком (Sigma, США) і переносили в інший стерильний посуд.

Для отримання МСК культури жирової тканини застосовували метод експланту в нашій модифікації [34, 43].

Культивування клітин здійснювали в одноразових пластикових чашках Петрі діаметром 30, 60 та 100 мм (Corning, США). Первинний матеріал подрібнювали ножицями на шматочки розміром 1-3 мм³, які розміщували в культуральних чашках, накривали покривними скельцями, вносили середовище культивування DMEM, 15-20 % фетальної сироватки бичків (FBS), 1 % антибіотика-антимікотика (Sigma, США) (рис. 2.8).

Експлант жирової тканини культивували за стандартних умов у CO₂ інкубаторі за температури 37°С, 5 % вмісту CO₂ та вологості повітря 96 %.

На етапах дисоціації клітин у культурах різного походження проводили підрахунок кількості клітин у камері Горяєва під мікроскопом при збільшенні у 200 разів [57, 60].

Розрахунок здійснювали за формулою:

$$X = A \times 1000 / 0,9,$$

де X – число клітин у 1 см³;

A – число клітин у всіх квадратах;

1000 – кількість мм³ в см³;

0,9 – об'єм камери Горяєва в мм³.

Підрахунок індексу проліферації клітин здійснювали за формулою:

$$X = a / b$$

де a – остаточна концентрація клітин/см³;

b – посівна концентрація клітин/ см³ [34, 57].

Отримання стовбурових клітин культури нервової тканини
здійснювали за власною методикою, що детально описана у розділі «Результати власних досліджень»

Оцінку життєздатності культивованих МСК різного походження здійснювали за допомогою вітального забарвлення клітин трипановим синім, який нездатний проникати через цитоплазматичну мембрану живих клітин. Для цього змішували рівні об'єми суспензії МСК і 0,16 – 0,20 % розчину трипанового синього у ФБР. Клітини інкубували протягом 10 хв за температури 37° С та підраховували відсоток безбарвних ядровмісних клітин від загальної кількості клітин в камері Горяєва. Життєздатність клітин визначали як співвідношення живих (незафарбованих) клітин до загальної кількості клітин, помножене на 100 [6, 57].

Морфометричні дослідження мезенхімних стовбурових клітин.

Морфометричні дослідження проводили за допомогою світлової мікроскопії. Культуру клітин 2, 4, 7 та 12 пасажів фарбували гематоксилін-еозином за Папенгеймом та надавали морфологічну характеристику МСК культури кісткового мозку, жирової тканини, нервової тканини різних видів тварин.

Показники морфометричних параметрів (площа клітини, площа ядра) визначали під мікроскопом Axiovision (Carl Zeiss, Germany) з використанням програми ImageJ 1.45 (National Institutes of Health, USA). Для кожної культури виміряли не менш ніж 100 клітин і обраховували ядерно-цитоплазмове співвідношення (ЯЦС) за формулою:

$$\text{ЯЦС} = S_{\text{я}} / S_{\text{ц}}, \text{ де}$$

$S_{\text{я}}$ – середня площа ядер клітин;

$S_{\text{ц}}$ – середня площа цитоплазми клітин [1].

Визначення кількості клітин у стані апоптозу та розподілу клітин за фазами клітинного циклу

Визначення кількості клітин у стані апоптозу та розподілу за фазами клітинного циклу проводили методом протокової цитофлуориметрії [153]. Принцип методу базується на визначенні відносної кількості ДНК у клітинах за використання ДНК-зв'язуючих барвників, зокрема пропідію йодистого. Це дозволяє оцінити кількість клітин, що знаходяться у G_1/G_0 -, S- і G_2/M фазах, а також кількість апоптотичних клітин. Останні визначаються у вигляді фракції, що розташована лівіше основного піка, який відповідає диплоїдним клітинам, – у гіподиплоїдній зоні гістограми, де концентруються клітини з міжнуклеосомною фрагментацією ДНК.

Для проведення аналізу використовували не менш ніж 5×10^5 клітин. Клітини осаджували за допомогою центрифугування за 1000 g протягом 5 хв. Надосадову рідину видаляли, клітини промивали ФБР та ресуспендували в 200 мкл ФБР, додавали 300 мкл цитратного буфера (pH 6,8), який містив 0,1 % трилону X-100 для пермеабілізації поверхневої мембрани. За 1 хв. додавали 10 мкл рібонуклеази та 10 мкл пропідію йодистого (Sigma, США) для зафарбовування ДНК. Інкубували протягом 10 хв. за 37°C у темряві та 30 хв. при кімнатній температурі. Центрифугували за 1000 g протягом 10 хв. та видаляли надосадову рідину. Після цього клітини, що залишились на дні пробірки, фіксували додаванням 400 мкл ФБР, з 0,4 % формаліну та аналізували вміст ДНК в пробах. Вимірювання показників проводили на протоковому цитофлуориметрі Becton Dickinson, США, що обладнаний аргонним лазером (довжина хвилі λ збудження, $\lambda_{\text{збуд}} = 488$ нм, емісії, $\lambda_{\text{еміс}} = 585$ нм). Проби аналізували з застосуванням програми Mod Fit LT 3.0 (BDIS, USA).

Крім спонтанного апоптозу, визначали рівень індукованого апоптозу МСК, викликаного культивуванням у поживному середовищі без додавання фетальної сироватки бичків.

Для цього МСК 2, 4, 7 і 12 пасажів висівали у кількості 2×10^3 клітин у лунки 96-лункового планшету та культивували протягом 72 годин у безсироватковому середовищі.

Кількість клітин в стані апоптозу визначали за забарвленням пропідієм йодистим та з використанням барвника трипанового синього.

Визначення вмісту інтерлейкіну-6.

Здатність МСК до секреції біологічно активних речовин оцінювали за вмістом інтерлейкіну 6 (ІЛ-6) у середовищі культивування, що визначали імуноферментним аналізом [38] з використанням комерційних наборів (BMS213/2 за каталогом) виробництва Bender MedSystems GmbH (Vienna, Austria) згідно інструкції виробника.

Принцип методу базується на взаємодії антигену, в даному випадку ІЛ-6 з антитілами, спрямованими проти нього (анти-ІЛ-6 мкАТ). Використовували два види анти-ІЛ-6 моноклональних антитіл (мкАТ): перші, некон'юговані, нанесені на дно 96-лункового планшету, другі, кон'юговані з біотином, вносили до лунки в об'ємі 50 мкл. Потім, у лунки вносили середовища культивування МСК за ранніх та пізніх пасажів. Планшет накривали захисною плівкою і проводили інкубацію протягом 2 годин за кімнатної температури ($18^{\circ} - 25^{\circ} \text{C}$) при постійному перемішуванні (на магнітній мішалці зі швидкістю 100 об/хв.). ІЛ-6, який присутній у середовищі культивування, зв'язується з мкАТ та фіксується на дні лунки планшету.

Після першого етапу інкубації планшет 4 рази промивали розчином для промивки, що дозволяє вилучити з розчину анти-ІЛ-6 мкАТ, кон'юговані з біотином.

Безпосередньо проводили другу інкубацію зі стрептавідин-авідином. Для цього у лунки додавали 100 мкл розчину стрептавідин-авідин-пероксидази (який має спорідненість до біотину), накривали планшет

плівкою та інкубували протягом години за кімнатної температури ($18^{\circ} - 25^{\circ} \text{C}$) при постійному перемішуванні (на магнітній мішалці зі швидкістю 100 об/хв.). По закінченню інкубації планшет чотири рази промивали розчином для промивки.

Додавали 100 мкл реагенту для виявлення активності пероксидази (орто-фенілєндіамін з перекисом водню; входить до комерційного набору), проводили інкубацію протягом 10 хв за кімнатної температури ($18^{\circ} - 25^{\circ} \text{C}$) при постійному перемішуванні (на магнітній мішалці зі швидкістю 100 об/хв.), уникаючи яркого сонячного світла.

Додавали 100 мкл реагенту, який зупиняє реакцію (стоп-реагент на основі сірчаної кислоти, входить до складу комерційного набору), ретельно перемішували та оцінювали інтенсивність забарвлення розчину на спектрофотометрі Мультискан FC за довжини хвилі 450 нм [158, 199].

Визначення експресії антигенів мультипотентних стовбурових клітин.

Визначення експресії окремих антигенів, характерних для МСК, проводили двома способами – за допомогою імуноцитохімічного аналізу та методом протокової цитометрії.

Для проведення імуноцитохімічного аналізу використовували непрямий метод фарбування, який має переваги над прямим методом у тому, що первинні антитіла вільні від ферментної мітки і легше проникають до антигену, а також з одним первинним антитілом може зв'язатися декілька молекул вторинних антитіл, що призводить до посилення сигналу.

МСК висаджували на покривні скельця у чашках Петрі та культивували за стандартних умов у CO_2 інкубаторі за температури 37°C , 5 % вмісту CO_2 у середовищі DMEM («Sigma-Aldrich», США) з додаванням 10-15 % FBS, 1 % антибіотика-антимікотика. За 2 - 3 доби конфлюєнтність моношару клітин на покривних скельцях сягала близько 50 - 70 %.

Середовище культивування видаляли. Клітини на скельцях фіксували розчином метанолу з ацетоном у співвідношенні 1:1 впродовж двох годин за температури -20°C , промивали фосфатно-буферним розчином, після чого інкубували 20 хв. за температури 37°C з 1 % розчином FBS для блокування неспецифічного зв'язування первинних антитіл. На зафіксовані клітини препаратів наносили моноклональні антитіла та витримували 1 годину за температури 37°C . Скельця промивали ФСБ. Після цього застосовували систему візуалізації Ultra Vision LP Value Detection system, яка містить детекційні антитіла, кон'юговані з пероксидазою, активність якої виявляли за допомогою субстрату діамінобензидину (DAB), Thermo-Scientific) [153, 194].

Після завершення імуноцитохімічної реакції препарати промивали проточною водою, фарбували гематоксиліном Караці та еозином та заключали в спеціальне водорозчинне середовище, що запобігає руйнуванню барвника (Faramount aqueous mounting medium, Dako). Аналіз результатів проводили за визначенням кількості клітин з експресією (коричнєве забарвлення клітин), виявлених під світловим мікроскопом, та оцінювали за допомогою класичного метода гістохімічної оцінки (Histochemical score, H-score).

Показник H - Score (S) визначали у балах за формулою:

$$S = 1 \times A + 2 \times B + 3 \times C,$$

де А - відсоток слабо «зафарбованих» клітин, В - відсоток помірно «зафарбованих» клітин і С - відсоток сильно «зафарбованих» клітин [158].

Рівень експресії того чи іншого антигену оцінювали за результатами H-Score: негативна (1 – 50 балів), слабка (51 – 100 балів), помірна (101 – 200 балів), висока (201 та більше балів).

У якості первинних антитіл були використані наступні моноклональні (мкАТ) і поліклональні антитіла, які мали перехресну реактивність з антигенами тварин:

- кролячі мкАТ, спрямовані проти Е - кадгерина, клон EP700Y (Roche, США);
- мишачі мкАТ, спрямовані проти N - кадгерина (CD325), клон 8C11 (Biolegend, США);
- кролячі мкАТ, спрямовані проти віментину, клон SP20 (Abcam, США);
- мишачі мкАТ, спрямовані проти актину, клон 1A4 + SC5 (Diagnostic Biosystems, США);
- мишачі мкАТ, спрямовані проти антигену bcl-2 людини з перехресною реактивністю з антигеном bcl-2 тварин, клон 100/D5 (Thermo-Scientific, США);
- мишачі мкАТ, спрямовані проти антигену CD44, клон 156-3C11 (Diagnostic Biosystems, США);
- мишачі мкАТ, спрямовані проти ядерного антигену проліферуючих клітин (PCNA), клон PC10 (Thermo Scientific, США);
- мишачі мкАТ, спрямовані проти анти- β -катеніну (клон 15B8; Thermo-Scientific, США)
- кролячі поліклональні антитіла, спрямовані проти антигену Ki-67 (номер за каталогом RB-9043-PO, Thermo Scientific, США).

Визначення експресії антигенів клітинами культури кісткового мозку та жирової тканини методом протокової цитометрії. Клітини культур кісткового мозку та жирової тканини дисоціювали з культурального посуду, переводили у суспензію. Методом протокової цитометрії [153] в прямому тесті визначали експресію наступних антигенів: CD34 (клон 581), CD90 (клон 5E10), CD117 (клон 104D2) (виробництва BD Pharmingen, США).

МкАТ були мічені флуоресцентним барвником – фікоеритрином (phycoerythrin – PE) або флуоресцин ізотіціонатом (fluorescein isothiocyanate). До 50 мкл суспензії клітин додавали 10 мкл мкАТ, ресуспендували на

вортексі S411 (TGL, Німеччина) протягом 3-х сек. та інкубували у темряві за кімнатної температури протягом 30 хв.

Аналіз підготовлених зразків проводили на лазерному проточному цитофлуориметрі FACScan Calibur (Becton Dickinson, США) з використанням програми збору та обробки даних Lysis II та комп'ютерного оснащення Hewlett Packard 340 (HP, США). Для збудження використовувався аргонний лазер потужністю 25 мВт, довжина хвилі 488 нм.

Визначення вмісту жирних кислот у ліпідах мезенхімних стовбурових клітин методом газорідинної хроматографії

Екстракцію ліпідів проводили з МСК у суміші хлороформ – метанолі у співвідношенні 2 : 1, яка руйнує комплекси ліпідів з білками, розчиняє ліпіди та інактивує ліполітичні ферменти за методом Фолча [184] або Блая і Дайера [102]. Продукти екстракції переводили у метилові ефіри для подальшого аналізу [104].

Приготування метилових ефірів жирних кислот методом переестерифікації ліпідів метанолом у присутності сірчаної кислоти (табл. 2.1). Для цього 10 мг ліпідів розчиняли в 2 мл зневодненого бензолу, переносили в ампули, додавали 2 мл 5 % розчину H_2SO_4 в абсолютному метанолі, запаювали ампули і інкубували в термостаті при температурі 70° С протягом 48 годин.

Потім вміст ампул переносили у пробірки, додавали 1 мл гексану і краплями насичений розчин бікарбонату натрію для нейтралізації H_2SO_4 (бікарбонат додавали повільно, оскільки реакція перебігає досить бурхливо). По закінченню реакції у пробірки додавали 10 мл дистильованої води і витримували при кімнатній температурі до розділення вмісту на два шари.

Верхній шар, що містить метилові ефіри жирних кислот, відбирали піпеткою і використовували для газохроматографічного аналізу

Таблиця 2.1

Умови газохроматографічного розділення на капілярних колонках

Параметри	Колонка	
	CP Wax 58 (FFAP)	SPTM-2560
	без поділу цис,транс-ізомерів	з поділом цис,транс-ізомерів
Довжина колонки, м	50	100
Внутрішній діаметр, мм	0,32	0,25
Товщина рідкої фази, мкм	0,2	0,1
Об'єм зразка, мкл	1,0	1,0
Газ-носії	Гелій	Гелій
Швидкість потоку, мл/хв.	2,5	1,0
Коефіцієнт поділу потоку	20:1	100:1
Температура дозатора	250° С	250° С
Температура детектора	280° С	280° С
Режим програмування температури термостата	40° — 2 хв 8° / хв до 100° 100° — 2 хв 5° / хв до 240° 240° — 2 хв	40° — 10 хв 5° / хв до 100° 100° — 5 хв 5° / хв до 150° 150° — 5 хв 2° / хв до 200° 200° — 4 хв 5° / хв до 240° 240° — 3 хв

Приготування метилових ефірів жирних кислот методом переестерифікації ліпідів з використанням метилату натрію:

10 мг ліпідів розчиняли у 10 мл гексану, додавали 0,5 мл розчину NaOH в абсолютному метанолі (2 моль/л) і перемішували розчин струшуванням впродовж хвилини. Через 5 хв. додавали 5 г сухого $\text{NaHSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, перемішували і центрифугувати при 1000 г впродовж 3 хв. Надосадову рідину відбирали аліквоту для газохроматографічного аналізу. Визначали вміст жирних кислот.

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 (FFAP).

Ідентифікування жирних кислот (ЖК) проводили за допомогою стандартного зразка Supelco 37 Component FAME Mix.

Кількісну оцінку спектру ЖК проводили методом нормування площин піків метильованих похідних ЖК і визначали їхній вміст у відсотках від сумарного вмісту усіх ЖК.

Визначали коригувальні поправки за формулою:

$$K_i = \frac{m_i \cdot \sum A}{A_i \cdot \sum m}$$

де:

K_i — коригувальна поправка для площі піка компонента;

m — маса компонента в стандартній суміші;

$\sum A$ — сума площ всіх проінтегрованих піків;

A_i — площа піка, що відповідає досліджуваному компоненту;

$\sum m$ — сумарна маса всіх компонентів в стандартній суміші.

Звичайно коригувальні поправки виражали відносно $K_{\text{C16:0}}$:

$$K'_i = \frac{K_i}{K_{\text{C16:0}}}$$

де:

K_i — коригувальна поправка для площі піка досліджуваного

компонента відносно C16:0;

K_i — коригувальна поправка для площі піка досліджуваного компонента, визначена за формулою;

K — коригувальна поправка для площі піка C16:0

C16:0

Вміст кожного компонента в зразку, виражений у відсотковому відношенні до маси метилових ефірів, визначали за формулою:

$$\omega_i = \frac{K'_i \cdot A_i}{\sum (K'_i \cdot A_i)} \cdot 100,$$

де:

ω_i — масова частка досліджуваного компонента у зразку;

K'_i — коригувальна поправка для площі піка досліджуваного компонента відносно C16:0, визначена за формулою;

A_i — площа піка, що відповідає досліджуваному компоненту, на хроматограмі

Кріоконсервування отриманих мезенхімних стовбурових клітин. Для проведення подальших експериментів отримані МСК культури жирової тканини вносили у ємності для заморожування у кількості 3×10^6 клітин на 1 мл кріозахисного середовища (рис. 2.6). Склад кріозахисних середовищ відрізнявся у досліджах:

1-й дослід – 90 % FBS та 10 % диметилсульфоксиду (ДМСО);

2-й дослід – 45 % FBS, 45 % поживного середовища ДМЕМ, 10 % ДМСО;

3-й дослід – 95 % FBS, 5 % ДМСО.

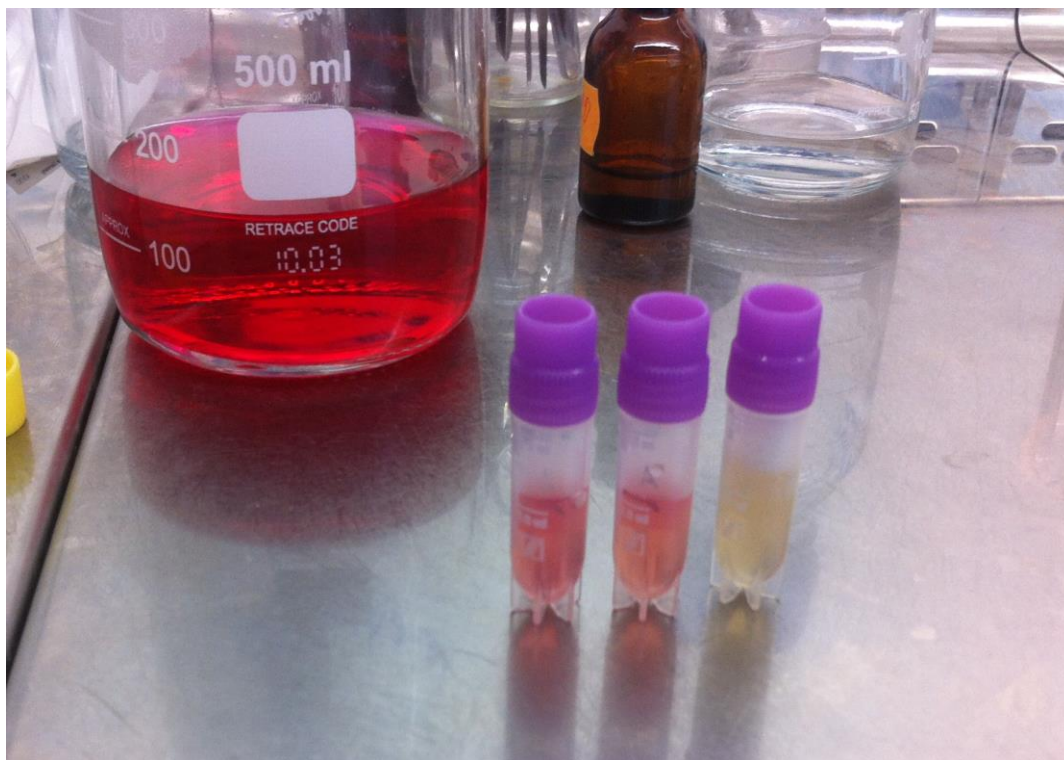


Рис. 2.6. Епендорфи з мезенхімальними стовбуровими клітинами для кріоконсервування.

Дослідні проби витримували з кріопротектором за кімнатної температури не менш ніж 15 хвилин. Заморожування клітин проводили поступово у наступному температурному режимі: 15 хв. за температури 5 – 9° С, після чого зразки переносили у посудини Дьюара з рідким азотом ($t = -196^{\circ}\text{C}$). Розморожування клітин здійснювали через 30 діб після кріоконсервування за умов водяної бані за $t = +38^{\circ}\text{C}$ [57]. Життєздатність розморожених клітин визначали за допомогою фарбування вітальним барвником трипановим синім.

У **другій серії** досліджень *in vivo* для визначення системного впливу МСК з кісткового мозку та жирової тканини мишей на стан здорових тварин – реципієнтів, були оцінені частота розвитку пухлин протягом трьох місяців після введення МСК, стан органів імунної системи - ваговий індекс і клітинність лімфоїдних органів - селезінки та тимусу, а також метаболічна

активність перитонеальних макрофагів. Дані показники є опосередкованими критеріями оцінки стану імунної системи та відображають її функціональний стан у цілому [4, 5].

Для оцінки загального стану тварин визначали також біохімічні показники периферичної крові, аспартат- та аланінамінотрансферази та активність сукцинатдегідрогенази (СДГ) в мітохондіях печінки [23].

Дослідження проводили на 2-3-х місячних мишах лінії C57Bl/6 вагою 20 - 24 г.

Отримували алогенні МСК культури кісткового мозку та жирової тканини за вищеописаними методиками [43, 44].

Для трансплантації використовували МСК 4-го пасажу. 10^4 МСК кісткового мозку або жирової тканини у 0,5 мл фосфатно-буферного розчину вводили у хвостову вену тварин. Контролем слугували миши, яким вводили у хвостову вену 0,5 мл фосфатно-буферного розчину без МСК (плацебо), а також тварини, яким не проводили внутрішньовенних втручань (інтактні).

Оцінка вагового індексу та клітинності тимусу та селезінки. Показники ваги периферійних лімфоїдних органів, їх індекси по відношенню до маси тіла тварин оцінювали на 7-у, 18-у та 25-у добу після введення МСК [26]. Мишей попередньо зважували для контролю ваги. Проводили евтаназію тварин з використанням вуглекислоти, потім препарували та вилучали лімфоїдні органи – тимус і селезінку та визначали їх вагу (рис. 2.7).

Індекси лімфоїдних органів по відношенню до маси тіла тварин розраховували згідно формули:

Ваговий індекс (%) = маса лімфоїдного органу / вага тварини \times 100.

Оцінку вмісту лімфоцитів у лімфоїдних органах проводили загальноприйнятими методами [19, 26, 59].

Визначали масу лімфоїдних органів. Тимус зважували повністю, а селезінку – фрагментами по 50 мг, потім розтирали у ступці, фільтрували

через капронову тканину та ретельно гомогенізували на магнітній мішалці (рис. 2.8, 2.9).



Рис. 2.7 Зважування дослідних зразків тимусу і селезінки мишей лінії C57Bl/6.

Гомогенат клітин наносили на градієнт фікол-верографіну зі щільністю 1,076 - 1,077 у співвідношенні 3 : 2. Пробірки з вмістом центрифугували зі швидкістю 1500 об / хв., протягом 30 - 40 хвилин. Після центрифугування над шаром фікол-верографіну залишається плазма і коло клітин, серед яких переважали лімфоїдні клітини (не менш 90 %). Їх збирали пастерівською піпеткою і двічі відмивали довільною кількістю розчину Хенкса шляхом центрифугування при швидкості обертання 1500-1800 об / хв. протягом 10 хвилин. Після відмивання до клітин вносили 1 мл розчину Хенкса і підраховували їх кількість в камері Горяєва. Розрахунок клітинності лімфоїдних органів проводили на 1 мг тканини.



Рис. 2.8. Підготовка дослідних зразків лімфоїдних органів для визначення клітинності (розтирання у ступці)

Дослідження метаболічної активності перитонеальних макрофагів у тесті з нітросинім тетразолієм (НСТ-тест).

Одним з індикаторів активації макрофагальних клітин імунної ланки імунітету є підвищення окислювальних реакцій. Продукцію реактивних форм кисню перитонеальних макрофагів визначали в тесті з використанням розчину нітросинього тетразолію (НСТ) [366] (рис. 2.10).

Він передбачає оцінку окиснювально-відновної здатності макрофагів поглинати жовтий розчинний барвник НСТ з утворенням синього формагану, нерозчинного у воді, який осідає внутрішньоклітинно. В основі реакції лежить активація в клітинах НАДФ-Н2-оксидази і гексозомонофосфатного шунта. Електрони, які звільнюються з НАДФ-Н2, перетворюють кисень на супер-оксиданіон O_2^- , який відновлює НСТ [366].

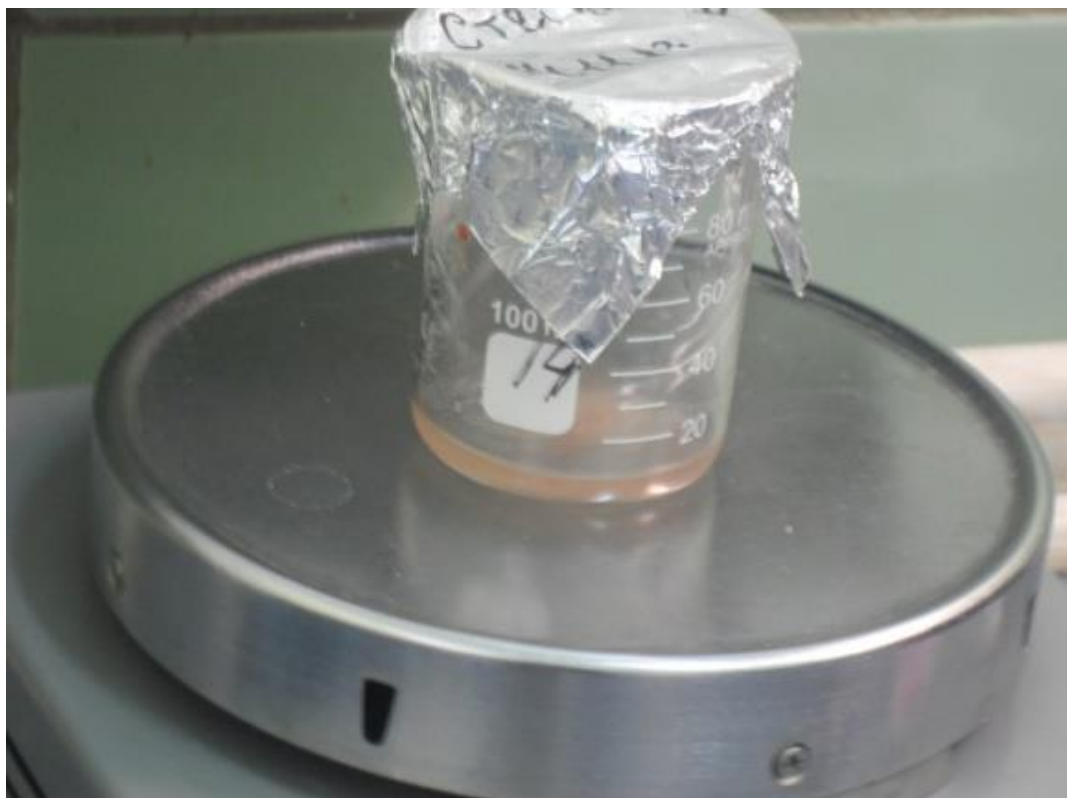


Рис. 2.9. Підготовка дослідних зразків лімфоїдних органів для визначення клітинності (отримання гомогенату).

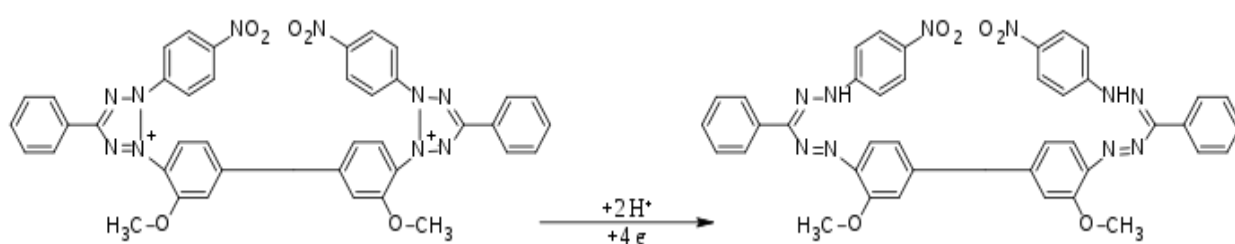


Рис. 2.10 Схема реакції перетворення нітросинього тетразолію у формаган, на якій базується НСТ-тест

Джерелом макрофагів слугувала промивна рідина з черевної порожнини дослідних мишей [458]. Для цього мишей піддавали евтаназії, здійснюючи цервікальну дислокацію під ефірним наркозом.

Звільняли доступ до черевної стінки шляхом відтинання ділянки шкірного покриву (рис. 2.11).

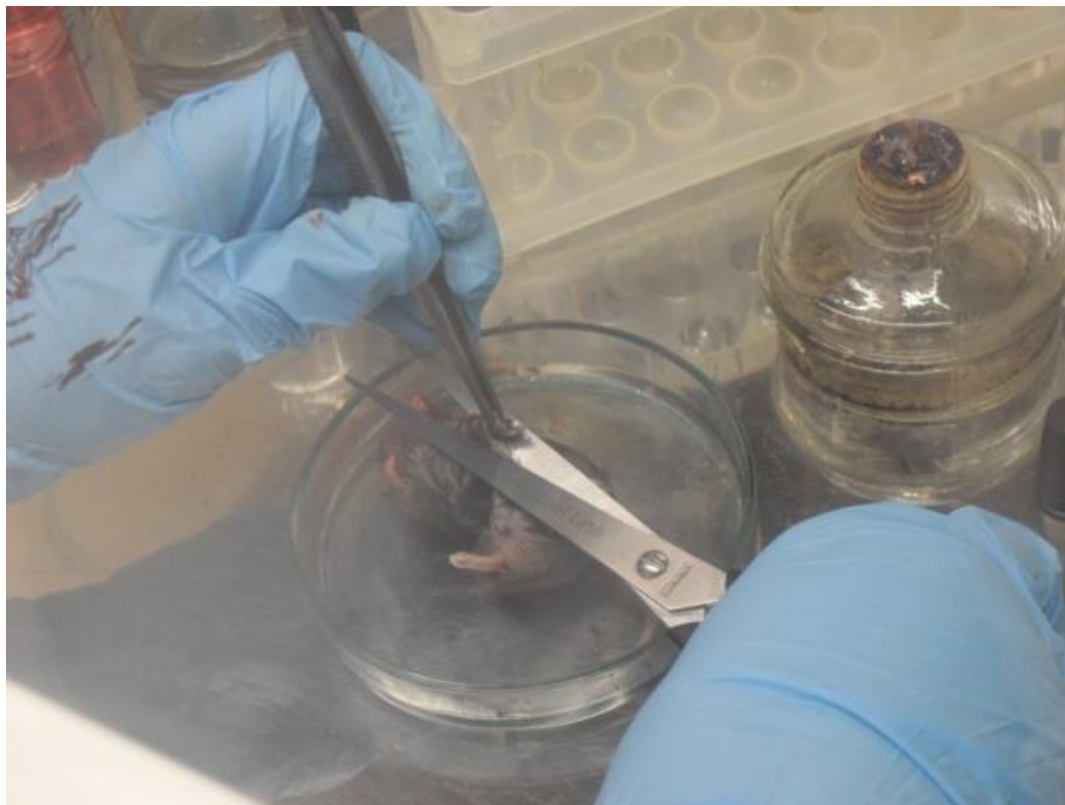


Рис. 2.11. Відтинання шкіри черевної стінки для відбору перитонеальних макрофагів.

У черевну порожнину стерильно вводили 3 мл середовища RPMI-1640 з додаванням 10 % ембріональної сироватки бичків і 1 % гепарину (5 од/мл), масажували протягом 1 хвилини (рис. 2.12). За допомогою голки та шприца відбирали по 2,0 - 2,5 мл промивної рідини з черевної порожнини, переносили в центрифужні пробірки і центрифугували протягом 10 хв. при 1000 об/хв.

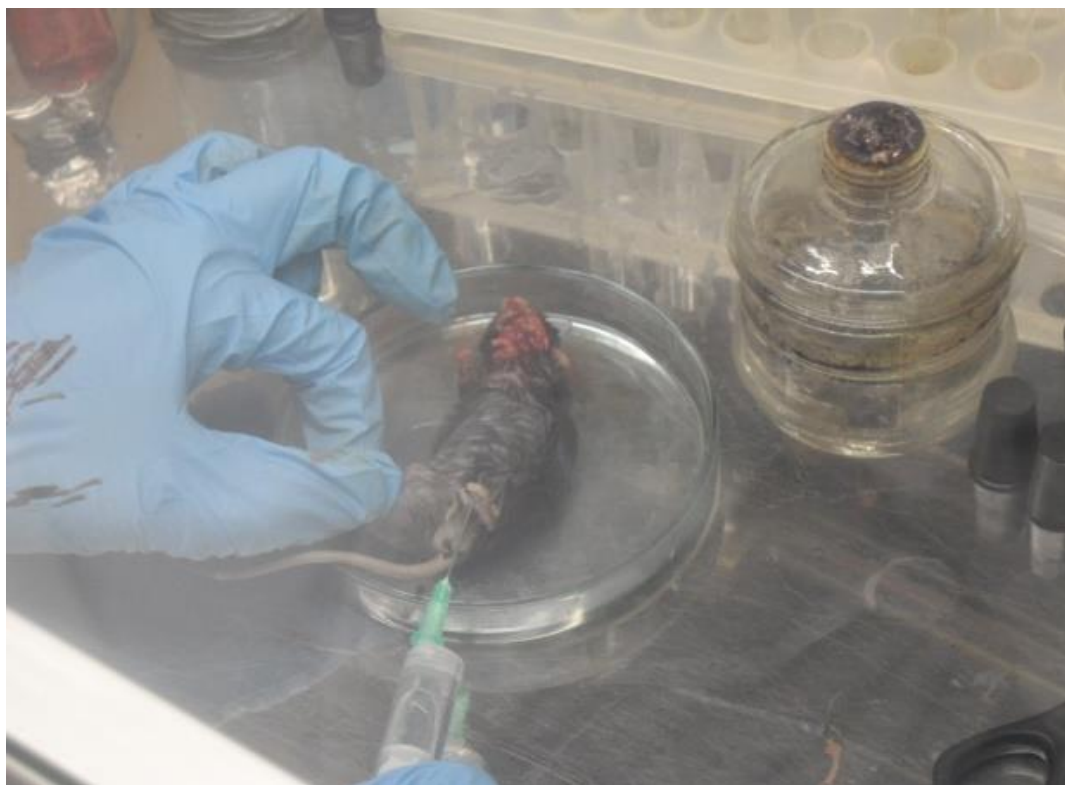


Рис. 2.12. Відбір перитонеальних макрофагів в мишей для проведення НСТ-тесту.

Відмивали клітини середовищем RPMI-1640 та знову осаджували. Супернатант видаляли, осад розпіпетовували у середовищі RPMI-1640 і підраховували кількість і життєздатності отриманих клітин за допомогою фарбування 0,1 % трипановим синім. Розводили суспензію клітин до концентрації 1×10^5 у 0,1 мл і вносили отриману суспензію клітин в зазначеній кількості у лунки 96-лункового планшету.

Для визначення оксигензалежної біоцидності перитонеальних макрофагів застосовували спонтанний та стимульований НСТ-тест.

Для визначення спонтанної активності у дослідні проби вносили 0,1 мл НСТ у розведенні 20 мг НСТ на 10 мл фосфатно-буферного розчину.

Для визначення стимульованої активності – 0,1 мл НСТ і 0,02 мл розчину форбол-12-миристат-13-ацетата (ФМА) (SigmaAldrich, США) в концентрації 0,1 мкг / мл як речовини, що підвищує активність макрофагів

У контрольні лунки вносили тільки 0,1 мл фосфатного буфера.

Клітини інкубували протягом 1 години за температури 37° С в CO₂ інкубаторі. Після інкубації планшет центрифугували протягом 10 хв. за 1000 об / хв. Супернатант видаляли, а до осаду вносили 0,2 мл метанолу. Проводили повторне центрифугування за тих самих умов. Після видалення супернатанту формазан, який утворився в цитоплазмі макрофагів, екстрагували. Для цього в усі лунки додавали 0,1 мл 2М КОН і 0,1 мл ДМСО, вміст акуратно піпетували і проводили інкубацію за температури 56° С в термостаті протягом 10 – 15 хвилин

Облік результатів проводили спектрофотометричним методом при довжині хвилі $\lambda = 620$ нм. Спонтанну активність перитонеальних макрофагів виражали в умовних одиницях за оптичною густиною проби.

Відсоток стимуляції активності перитонеальних макрофагів розраховували за формулою:

$$(C_m - C_n) / C_n \times 100 \%, \text{ де}$$

C_n – показник оптичної густини спонтанної проби;

C_m – показник оптичної густини стимульованої проби.

Визначення активності сукцинатдегідрогенази мітохондрій печінки.

Після евтаназії в мишей дослідних груп відбирали тканину печінки, промивали охолодженим (+4° С) розчином 0,89 % NaCl та розтирали первинно у порцеляновій ступці. Процедура виділення проводили, використовуючи попередньо охолоджені реактиви, посуд та інструменти. Надалі тканину печінки поміщали у середовище виділення I (250 мМ сахароза, 3 мМ трилон Б, 20 мМ Трис-HCl (рН 7,4 при 4° С) із розрахунку 10 мл на 1 г тканини. Після центрифугування на холоді за 1500 g протягом 15 хв надосадову рідину фільтрували через 3 шари марлі і центрифугували при 11000 g 20 хв для осадження мітохондрій. Супернатант обережно зливали, а отриманий осад ресуспендували в середовищі виділення II (250 мМ сахароза,

30 мМ Трис-НСІ (рН 7,4 при 4° С) у невеликому об'ємі (близько 3 мл/1г вихідної тканини), обережно невеликими порціями доводили об'єм до 10 мл. Далі проводили центрифугування при 11000g 20 хв. Отриманий осад мітохондрій обережно ресуспендували в 1 мл середовища ІІ. Для одержання субмітохондріальних частинок (СМЧ) проводили процедуру дворазового заморожування-відтаювання суспензії мітохондрій, що призводило до порушення цілісності мітохондрій. Після відтаювання, суспензію гомогенізували в невеликому об'ємі середовища ІІ, поступово доводили об'єм середовищем ІІ до 50 мл і центрифугували при 25000-27000 g 30 хв. Осад, який містив фракцію СМЧ (везикули внутрішньої мембрани мітохондрій), ресуспендували в невеликому об'ємі середовища ІІ і надалі використовували в дослідженнях. Аналіз чистоти СМЧ проводили біохімічним методом, оцінюючи активність сукцинатдегідрогенази (сукцинатоксидоредуктаза, КФ 1.3.99.1.) – маркерний фермент внутрішньої мембрани мітохондрій [23]. Активність ферменту пропорційна кількості відновленого ферриціаніду.

Реакція протікає за наступною схемою:



Активність сукцинатдегідрогенази визначали за кількістю відновленого в реакції з сукцинатом ферриціаніду калію ($\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$) до ферроціаніду калію ($\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$) під дією ферменту.

У пробірки вносили середовище інкубації: 10 мМ фосфатного буферу (рН = 7,8), 5 мМ бурштинової кислоти, 1,25 мМ ЕДТА, 7,5 мМ азиду натрію. До проб додавали по 0,2 мг білка суспензії мітохондріальних мембран. Проби інкубували за кімнатної температури впродовж 5 хв для інгібування цитохромоксидази азидом натрію.

Реакцію розпочинали додаванням до проб 1,25 мМ розчину ферриціаніду калію. Проби інкубували впродовж 10 хв за температури + 30° С. Після інкубації реакцію зупиняли зниженням температури проб до 0° С.

шляхом опускання проб у лід і додаванням 0,1 % додецилсульфату натрію (ДСН). В контрольні проби, які містять всі компоненти інкубаційної суміші, ДСН додавали перед внесенням суспензії мітохондріальних мембран. Після зупинки реакції і охолодження проби фотометрували на спектрофотетрі СФ-46 при довжині хвилі 420 нм проти дистильованої H_2O . Для визначення вмісту ферриціаніду в пробах, що містили від 100 до 1000 мкг ферриціаніду в 4 мл розчину, будували калібрувальну криву. За різницею в показнику екстинції ($E_{пр} - E_{к}$), застосовуючи калібрувальну криву, розраховували кількість ферриціаніду, який відновлювався за час інкубації [22].

У **третій серії** досліджень визначали вплив МСК на процеси пухлинного росту в моделі епідерміоїдної карциноми легені Льюїс (швидкість росту первинної пухлини, процеси метастазування, патоморфологію м'язової тканини, ураженою карциномою легені Льюїс, ступінь інфільтрації лімфоїдними клітинами, ступінь розвитку судинної сітки, морфологічні зміни оточуючої м'язової тканини в тварин-пухлиноносіїв) [383].

З використанням методів, описаних вище, визначали розподіл клітин первинної пухлини за фазами клітинного циклу, апоптоз функціональну активність перитонеальних макрофагів і стан лімфоїдних органів тварин-пухлиноносіїв.

Моделювання пухлинного процесу карциноми легені Льюїс у мишей C57Bl/6. Використовували клітини лінії епідерміоїдної карциноми легені Льюїс (LLC), отриману з клітинного банку ліній тканин людини та тварин Інституту експериментальної патології, онкології та радіобіології ім. Р. Є. Кавецького НАН України (рис. 2.13).

Клітини карциноми легені Льюїс перед трансплантацією культивували три пасажі за стандартних умов у поживному середовищі DMEM з додаванням 10 % FBS та 1 % антибіотика-антимікотика (Sigma, USA) за 37°

C, абсолютної вологості і 5 % CO₂. Дисоціацію клітин з моношару та перехід їх у суспензію здійснювали за допомогою 0,25 % розчину трипсину та 0,02 % розчину етилендіамінтетраоцтової кислоти (EDTA) на фосфатно-буферному розчині у співвідношенні 1:4.

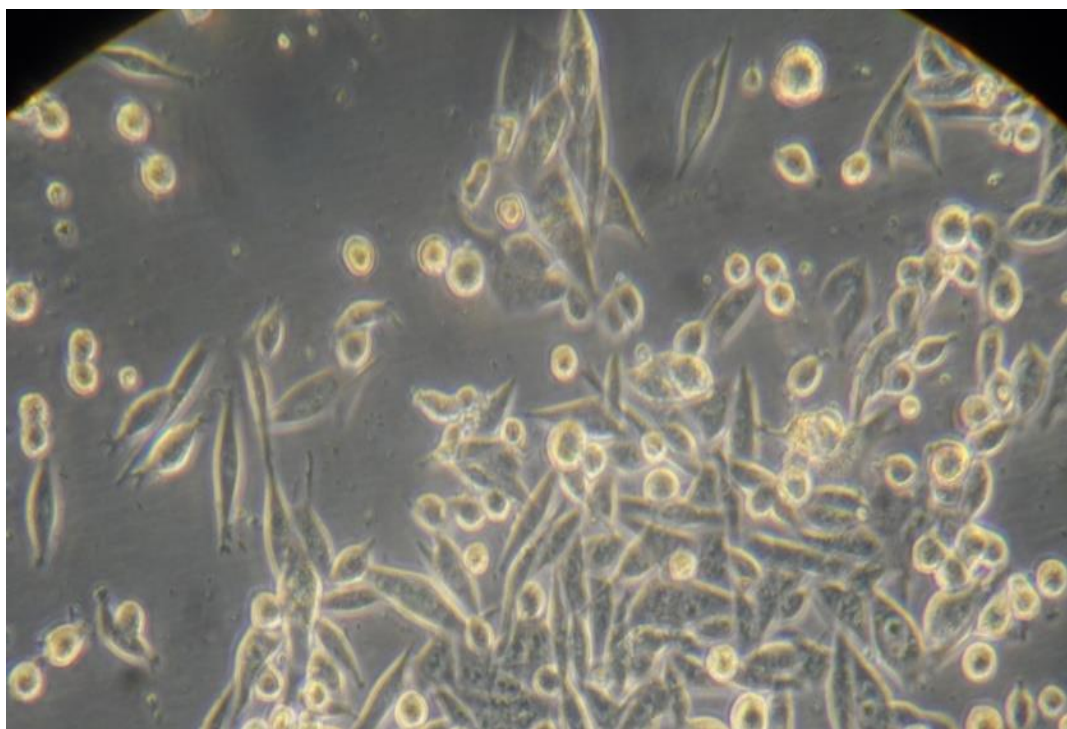


Рис. 2.13. Клітини культури карциноми легені Льюїс. Мікропрепарат, × 100.

При досягненні потрібної дисоціації додавали FBS для інактивації трипсину та EDTA. Клітини відмивали фосфатно-буферним розчином і перевіряли життєздатність методом фарбування 0,5 % водним розчином трипанового синього шляхом додавання його до суспензії клітин у співвідношенні 1:1 [57, 236]. Проводили трансплантацію клітин карциноми легені Льюїс дослідним мишам.

Після трансплантації клітин карциноми легені Льюїс (LLC) миші C57 Bl/6 були розділені на три групи. У *першу групу* входили миші з трансплантованою LLC, у *другу* – миші з трансплантованою LLC, яким на 8-

му добу після інокуляції пухлинних клітин вводили внутрішньовенно алогенні МСК 4-го пасажу в кількості $1,25 \times 10^4$. У *третьій* групі були тварини з трансплантованою LLC, яким внутрішньовенно вводили розчин 0,89 % NaCl (рисю 2.14).



Рис. 2.14. Миші С57 В1/6 дослідних груп.

Дослідних тварин зважували кожну добу, вимірювали діаметр первинної пухлини.

На 18-ту та 24-ту добу досліду визначали вплив алогенних МСК на показники маси первинної пухлини та рівень метастазування (кількість метастазів, їх розміри, загальний об'єм). Дослідних тварин зважували (рис.2.15).

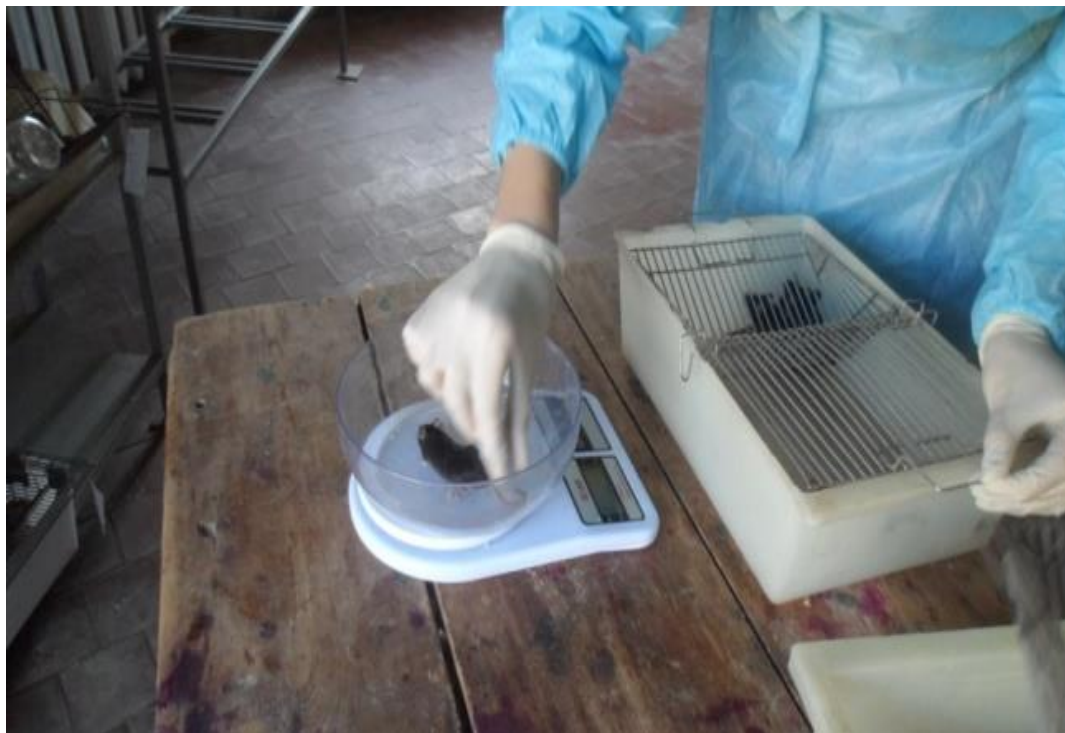


Рис. 2.15. Тварини дослідних груп після інокуляції LLC, визначення ваги мишей дослідних груп.

Потім, мишей піддавали евтаназії, вилучали задні кінцівки (місце інокуляції пухлини), зважували, видаляли пухлину, препарували легені (орган, у який відбувається метастазування). Легені фіксували в розчині Буена (розчин для фіксації гістологічних препаратів, що представляє собою суміш насиченого водного розчину пікринової кислоти, формаліну і льодяної оцтової кислоти у співвідношенні 15:5:1), витримували 24 години (рис. 2.16).

Легені розрізали, підраховували кількість метастазів (рис. 2.17) і проводили їх вимірювання [383] (рис. 2.18).

Об'єм метастазу обраховували за математичною формулою об'єму шара $V = 4/3 \times \pi R^3$,

де V – об'єм метастазу (мм^3),

R – радіус метастазу (мм).

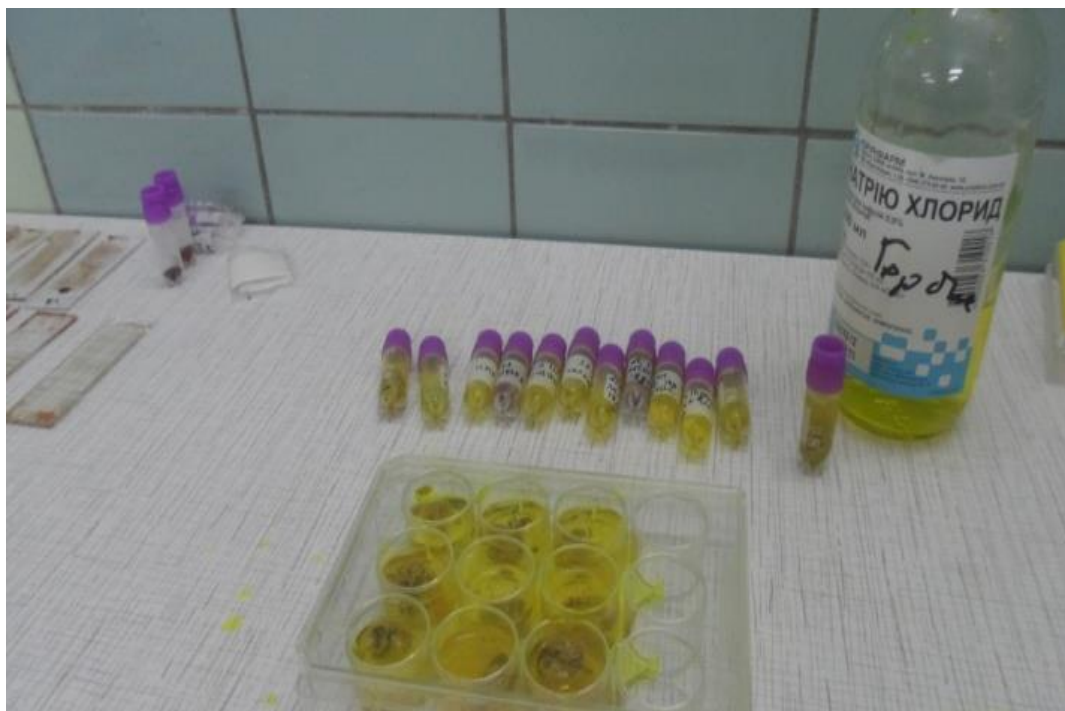


Рис. 2.16. Легені мишей дослідних груп, уражені метастазами, які фіксували в суміш Буена.

Гістологічні дослідження скелетних м'язів мишей, уражених пухлинними клітинами, з трансплантованою карциномою легені Льюїс. Для гістологічних досліджень шматочки скелетних м'язів, уражених клітинами карциноми легені Льюїс, вирізали гострим лезом. Відібраний матеріал етикували та фіксували у 10 % водному розчині нейтрального формаліну протягом 5 діб. Після фіксації у формаліні відібрані зразки промивали у проточній воді, зневоднювали у спиртах зростаючої концентрації (50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 96 %; абсолютний спирт), ущільнювали і заливали в парафін [20, 47].

Зразки, залиті в парафін, поміщали на дерев'яні блоки, з яких на санному мікротомі МПС-2 виготовляли гістологічні зрізи завтовшки 5-10 мкм. Зрізи обережно знімали з поверхні мікротомного ножа м'яким пензликом або препарувальною голкою і переносили у ємність з теплою водою (40°C) де вони розправлялися. Виготовлені зрізи наносили на

предметні стекла, які були оброблені сумішшю яєчного білка з гліцерином. Предметні стекла зі зрізами висушували на термоелектричному столику.



Рис. 2.17. Підготовка легень тварин дослідних груп для підрахунку метастазів карциноми легені Льюїс.

Гістологічні зрізи фарбували гематоксиліном Караці та еозином – для встановлення особливостей мікроскопічної будови м'язової тканини, ураженої клітинами карциноми легені Льюїс, пікрофуксином за Ван Гізон – для виявлення колагенових волокон. Зафарбовані зрізи заводили у канадський бальзам і накривали скельцями [20, 47].

Для гістологічних досліджень використовували світлові мікроскопи «Olympus», «МБИ-2», «МБС-2». На гістологічних препаратах досліджували будову скелетних м'язів, уражених клітинами карциноми легені Льюїс. Підраховували площу паренхіми пухлини, судин, ділянок некрозу та девіталізації тканини методом «крапкового підрахунку» за допомогою

бінокулярного мікроскопу МБС-2, вимірювальної сітки Вайбеля, мікроскопа МБИ-2 і окуляр-мікрометра МОВ-1-15^x [1, 20, 47], а також за допомогою програмного забезпечення UTHSCSA Image Tool для Windows 7 (version 3.0).

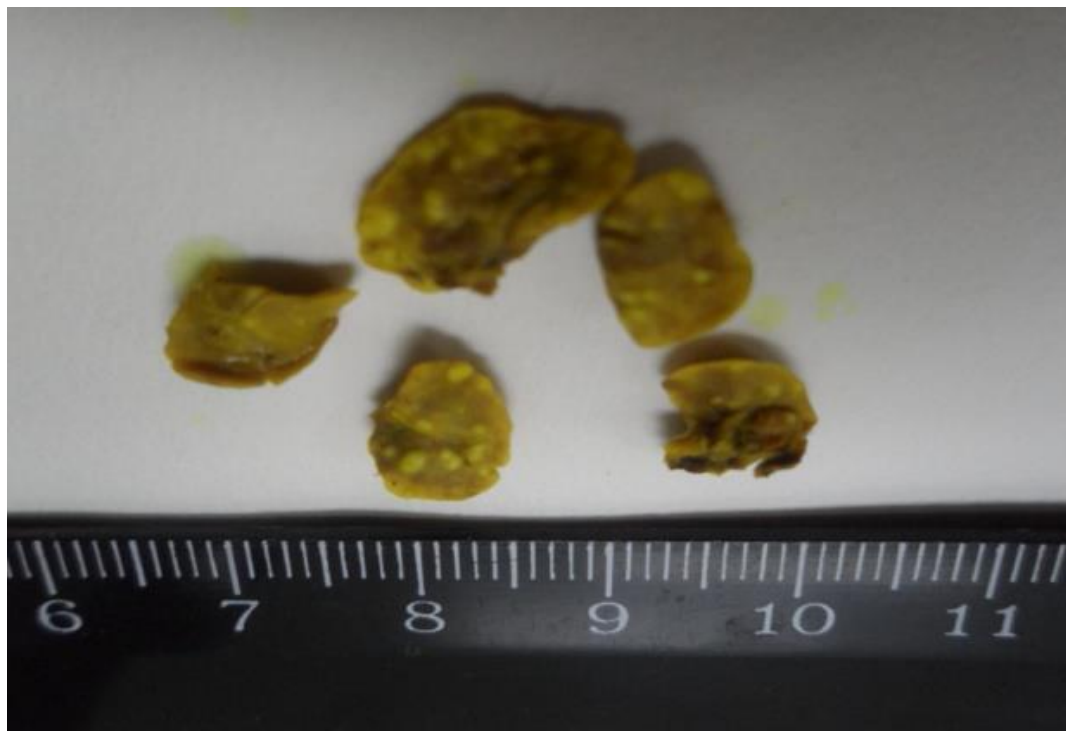


Рис. 2.18. Підрахунок кількості метастазів у легенях та вимірювання їх діаметру у мишей лінії C57Bl/6 з трансплантованою карциномою легені Льюїс. Макропрепарат.

Статистичний аналіз одержаних даних дослідження. Одержані цифрові дані опрацьовували статистично: визначали середньоарифметичну величину (M); середньоквадратичну помилку (m) і достовірність різниці між середніми арифметичними двох варіаційних рядів за критерієм достовірності p , середнє квадратичне відхилення [52]. Достовірність різниць середніх значень встановлювали за критерієм Стюдента. Коефіцієнт кореляції (r) розраховували методом Пірсона, також проводили однофакторний дисперсійний аналіз отриманих результатів за допомогою прикладного програмного комплексу «Microsoft Office Excel 2013» та

Statistica 6.0 (StatSoft, США). Різницю між двома величинами вважали достовірною за $p < 0,05$; $p < 0,01$; $p < 0,001$ [1, 52].

Висновки до розділу II

Дисертаційна робота виконана на достатній кількості відібраного та дослідженого матеріалу з використанням сучасних методів досліджень: морфологічних (морфометрія клітинних структур, дослідження цитологічних препаратів клітин культур, морфометрія метастазів у легені); гістологічних (виготовлення та мікроскопія гістологічних препаратів м'язової тканини, ураженої пухлиною); фізіологічних (життєздатність, проліферативна активність клітин); методів експериментального моделювання (відтворення метастазуючої карциноми легені Льюїс в мишей C57Bl/6, моніторинг її росту за впливу стовбурових клітин); імунологічних (дослідження клітинності і вагового індексу імунних органів, функціональної активності перитонеальних макрофагів), цитологічних (цитофлуориметричне визначення вмісту клітин за фазами клітинного циклу, кількості диплоїдних та анеуплоїдних клітин); біотехнологічні (культивування клітин *in vitro*); імуноцитохімічних (імуноцитохімічне визначення експресії антигенів); біохімічних (визначення жирнокислотного складу ліпідів мембран стовбурових клітин, визначення активності сукцинатдегідрогенази мембран мітохондрій печінки, біохімічних показників сироватки крові); хірургічних (отримання аспірату кісткового мозку, підшкірної жирової тканини та брижі кишечника); зоотехнічних (визначення ваги тварин, маси пухлини, селезінки, тимусу), статистичних (математична обробка результатів дослідження з застосуванням критерію Стюдента, визначення кореляційних зв'язків, проведення однофакторного дисперсійного аналізу). Усі дослідження проведено з дотриманням норм біологічної безпеки та принципів біоетики (Висновок біоетичної комісії НУБіП України від 01.07.2019).

При виконанні роботи стовбурові клітини культури жирової тканини отримували методом експланту в нашій модифікації (патент України на корисну модель «Спосіб отримання мезенхімальних стовбурових клітин із жирової тканини собаки» [34] та клітини з високими адгезивними властивостями культури нервової тканини в нашій модифікації (патент України на корисну модель «Спосіб отримання нейральних стовбурових клітин кота») [35].

РОЗДІЛ 3

РЕЗУЛЬТАТИ ВЛАСНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ

3.1. Отримання стовбурових клітин та їх морфофункціональні властивості

3.1.1 Обробка первинного матеріалу та отримання стовбурових клітин культури жирової тканини тварин. У лабораторії в стерильному боксі первинний матеріал тричі промивали ФБР з антибіотиком-антимікотиком (Sigma, США) і переносили в інший стерильний посуд. Для отримання МСК культури жирової тканини застосовували метод експланту в нашій модифікації. Культивування клітин здійснювали в одноразових пластикових чашках Петрі діаметром 30, 60 та 100 мм (Corning, США). Первинний матеріал подрібнювали ножицями на фрагменти розміром 1-3 мм³, які розміщували в культуральних чашках, накривали покривними скельцями, вносили середовище культивування DMEM, 15-20 % фетальної сироватки бичків (FBS), 1 % антибіотика-антимікотика (Sigma, США). Первинний матеріал культивували за стандартних умов у CO₂ інкубаторі за температури 37° С, 5 % вмісту CO₂ та вологості повітря 96 %. На 2-3 добу культивування реєстрували адгезію клітин до культурального посуду (рис. 3.1).

За продовження культивування первинного матеріалу навколо колонієутворюючих одиниць стовбурових клітин культури жирової тканини формувалися колонії адгезивних клітин (рис. 3.2). Середовище культивування повністю або частково змінювали на свіже кожні 72 години.

На 5-6 добу культивування клітини культури жирової тканини активно проліферували, що призводило до злиття колоній (рис.3.3).

На 10-12 добу культивування формувався моношар стовбурових клітин культури жирової тканини (рис. 3.4). За формування моношару на 70-

90 % покривні скельця та фрагменти експланту механічно вилучали, а культуру клітин промивали ФБР.

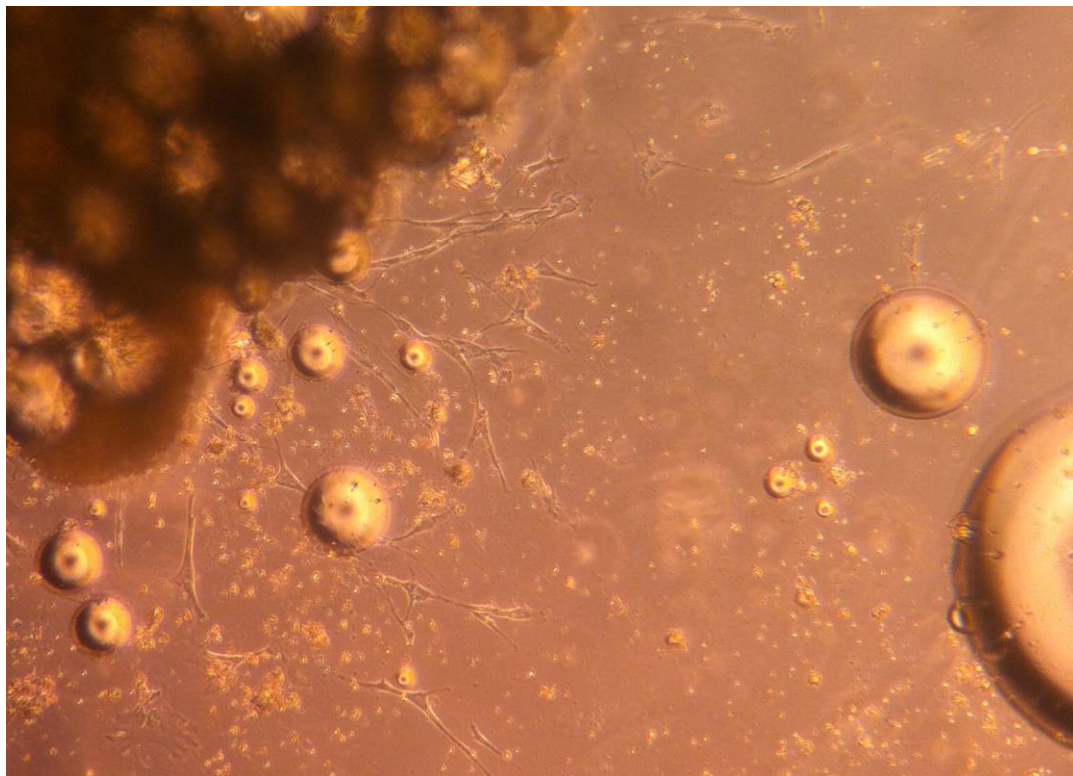


Рис. 3.1. Адгезія стовбурових клітин культури жирової тканини собаки до культурального посуду. Мікропрепарат, $\times 100$.

За конфлюентності моношару 80-90 % клітини відшаровували з дна культурального посуду розчином 0,25 % трипсину з 0,02 % етилендиметилтетраоцтовою кислотою (трипсину/ЕДТК) під контролем інвертованого мікроскопа Axiovert 40.

Дію трипсину/ЕДТК нейтралізовували додаванням ФСТ у кількості 1:30 до загального об'єму суспензії, після чого клітини відмивали ФБР, супернатант видаляли, а клітини пересаджували у культуральний посуд більшого розміру. Зазвичай посівна доза становила 5×10^4 клітин на cm^2 . Культивуванням отримували стовбурові клітини культури жирової тканини

2-го, 4-го, 7-го та 12 пасажів та досліджували їх морфологічні та функціональні властивості.

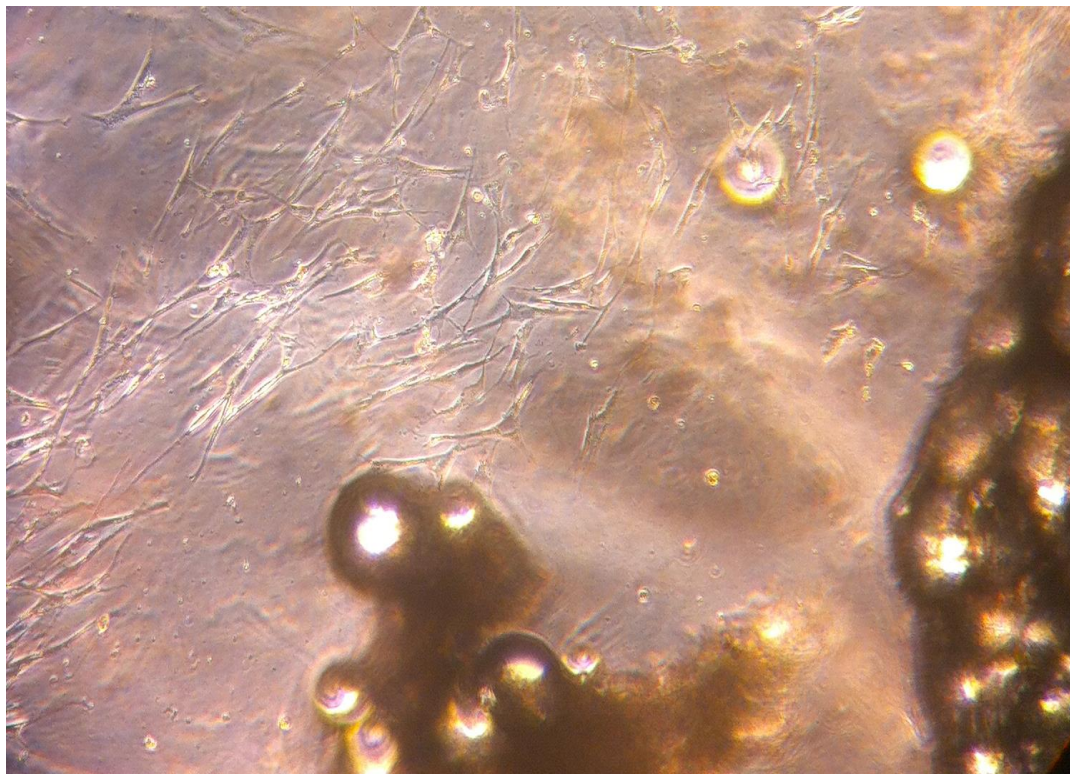


Рис. 3.2. Формування колоній клітин навколо колонієутворюючих одиниць стовбурових клітин культури жирової тканини. Мікропрепарат, $\times 100$.

Таким чином, зазначений метод отримання стовбурових клітин культури жирової тканини, на відміну від інших способів отримання МСК культури жирової тканини, дозволяв уникнути ушкоджуючого впливу дезагрегуючого фактора (колагенази) на клітини стромально-васкулярної фракції та здешевити процедуру їх отримання.

3.1.2 Отримання стовбурових клітин культури нервової тканини.

Отриману нервову тканину головного мозку новонароджених кошенят тричі промивали ФБР з додаванням антибіотика-антимікотика та переносили в інший стерильний посуд, виконували цю процедуру тричі.

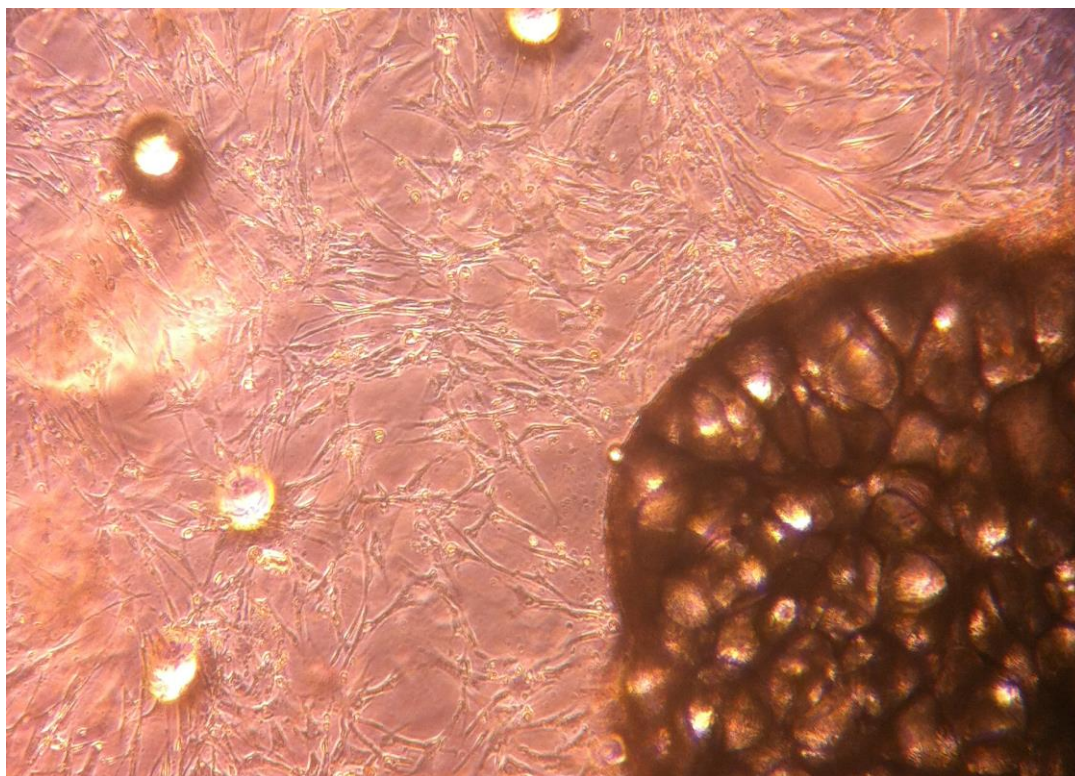


Рис. 3.3. Злиття клітин окремих колоній культури жирової тканини. Мікропрепарат, $\times 100$.

Для отримання СК культури нервової тканини застосовували метод експланту в нашій модифікації. Культивування клітин здійснювали в одноразових пластикових чашках Петрі діаметром 30, 60 та 100 мм (Corning, США). 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 DMEM, ФСТ, 1 % антибіотика-антимікотика (Sigma, США). Первинний матеріал культивували за стандартних умов у CO₂ інкубаторі за температури 37° С, 5 % вмісту CO₂ та вологості повітря 96 %.

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 на свіже.

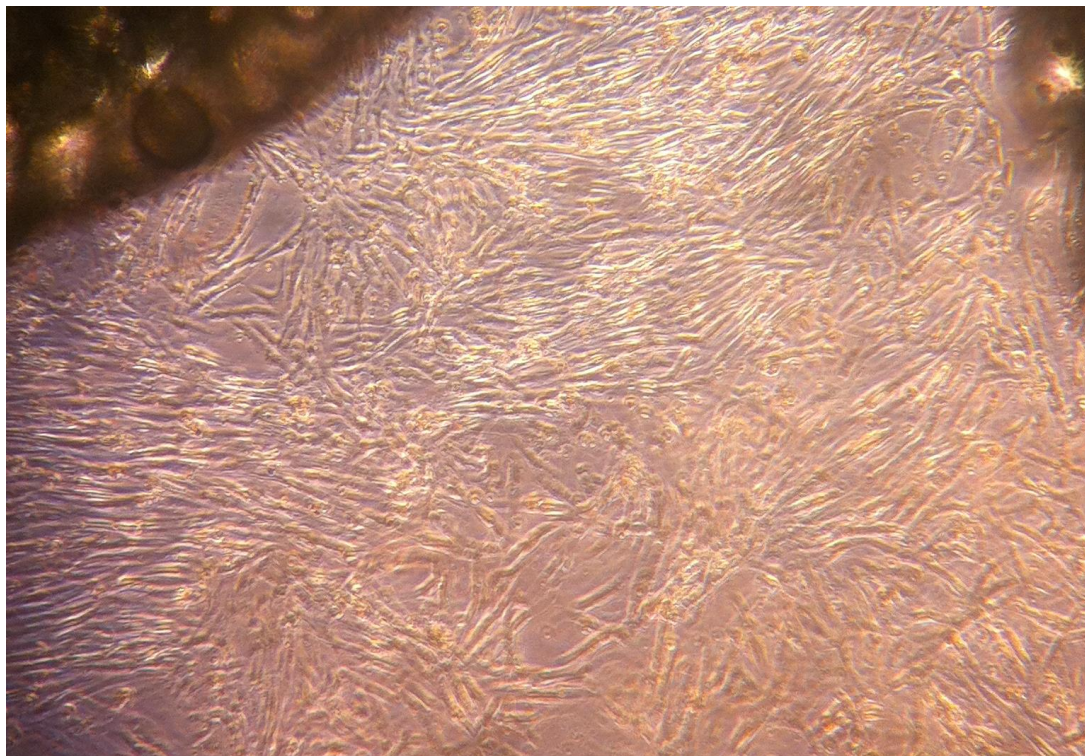


Рис. 3.4. Формування моношару стовбурових клітин культури жирової тканини. Мікропрепарат, $\times 100$.

Вже на початкових етапах культивування спостерігали прикріплення до дна культурального посуду спочатку поодиноких клітин. На 2-3 добу культивування реєстрували адгезію клітин до культурального посуду (рис. 3.5).

На 5-6 добу культивування клітини культури нервової тканини активно проліферували, що призводило до злиття окремих колоній (рис.3.6).

На 10-12 добу культивування формувалася моношар стовбурових клітин культури нервової тканини (рис. 3.7). За формування моношару на 70-90 % покривні скельця та фрагменти експланту механічно вилучали.

За конфлюентності моношару 80-90 % клітини переводили в суспензію. Для цього застосовували розчин трипсину/ЕДТК, який вносили у

культуральні чашки. Процес відшарування клітин від культурального посуду проводили під контролем інвертованого мікроскопа Axiovert 40. За досягнення необхідного ефекту дію трипсину/ЕДТК нейтралізовували додаванням ФСБ. Потім клітини культури нервової тканини відмивали ФБР і проводили подальше культивування

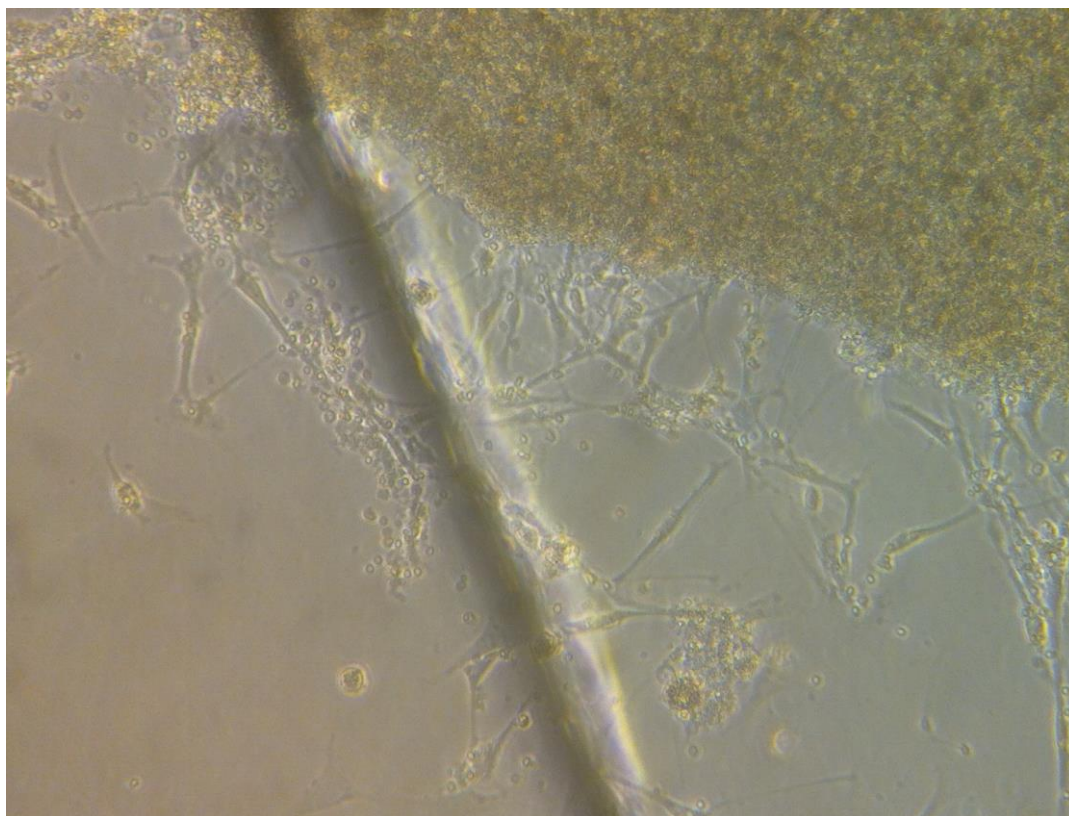


Рис. 3.5. Прикріплення поодиноких клітин культури нервової тканини до культурального посуду та формування колоній. Мікропрепарат, $\times 100$.

Отже, завдяки запропонованому нами методу культивування стовбурових клітин культури нервової тканини вдається уникнути пошкоджуючого механічного та хімічного впливу на клітини первинного матеріалу, зберегти тканинні цитокіни і фактори росту, а також, забезпечити їх надходження з фрагментів нервової тканини у середовище і тим створити необхідну концентрацію, що має вирішальне значення для адгезії та проліферації клітин, особливо у первинній культурі.

Також запропонований метод отримання стовбурових клітин культури нервової тканини дає можливість здешевити процедуру їх отримання, оскільки не витрачається високовартісний реактив – колагеназа.

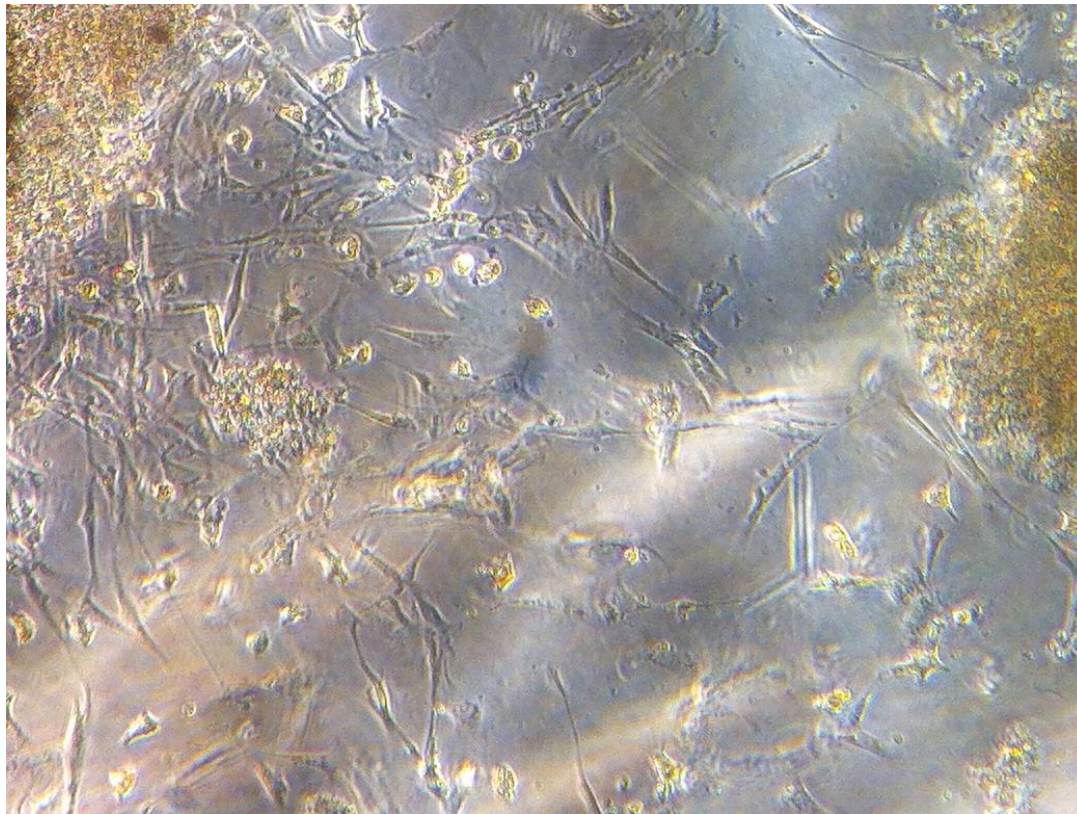


Рис. 3.6. Ріст стовбурових клітин культури нервової тканини у колоніях. Мікропрепарат, $\times 100$.

3.1.3 Функціональна активність мезенхімних стовбурових клітин культури жирової тканини більшого сальника собаки залежно від умов обробки та культивування первинного матеріалу. Функціональна активність стовбурових клітин (життєздатність, адгезивні властивості, здатність продукувати фактори росту і цитокіни, проліферативна активність, чутливість до індукції апоптозу) значною мірою залежить від способу обробки первинного матеріалу, середовища культивування та застосування ростових факторів. У сучасній літературі щодо роботи з біологічним матеріалом описані різноманітні методи механічної та ферментативної дезагрегації первинного матеріалу, які забезпечують виділення МСК зі

складу сполучної тканини. Оскільки кожний вид тварин має свої біологічні особливості ми дослідили вказані методи для

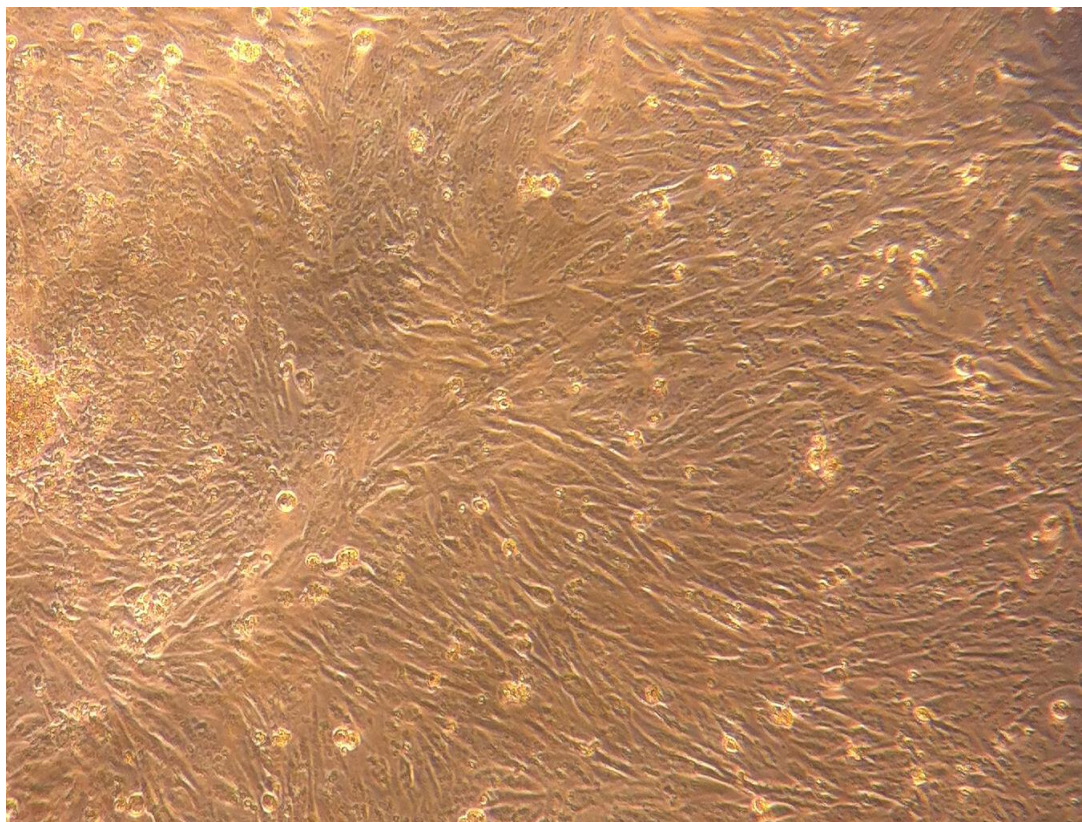


Рис. 3.7. Формування моношару клітин культури нервової тканини. Мікропрепарат, $\times 100$.

обробки первинного матеріалу з метою отримання культур стовбурових клітин жирової тканини собаки, миші, коня.

У собак стовбурові клітини культури жирової тканини отримували з двох різних зон розташування – підшкірної та більшого сальника. Відомо, що жирова тканина є місцем екстрагонадного синтезу статевих гормонів із попередників, що циркулюють у периферичній крові. Крім того, є дані, що спрямованість цього синтезу та його інтенсивність суттєво відрізняється у абдомінальній та підшкірній тканинах. Зазначені фактори можуть впливати на ефективність отримання МСК з різних зон розташування жирової тканини. Тому ми окремо охарактеризували способи отримання МСК

культури жирової тканини різної локалізації та їх функціональні властивості. Дослідження були проведені на собаках жіночої статі.

Абдомінальну жирову тканину більшого сальника отримували в собак різних порід жіночої статі віком 1-2 роки за проведення планових кастрацій. Досліджували ефективність трьох способів обробки первинного матеріалу, а саме ферментативної дезагрегації, метод експланту, модифікований метод експланту.

За умов першого дослідження ферментативна дезагрегація первинного матеріалу включала обробку жирової тканини 0,05 % стерильним розчином колагенази (тип II) у ФБР із розрахунку 2 мг/см³ протягом 2 годин при температурі 37°C. Після обробки колагеназою первинний матеріал промивали ФБР та вносили у чашки Петрі, додавали середовище культивування DMEM, 10-15 % фетальної сироватки бичків, 1 % антибіотика-антимікотика (Sigma, США). Культивування первинної культури проводили у CO₂ інкубаторі за 5 % вмісту CO₂ і температурі 37 °C.

За умов другого дослідження абдомінальну жирову тканину механічно подрібнювали до фрагментів розміром 1-3 мм³, вносили їх у чашки Петрі та додавали середовище культивування DMEM, 10-15 % фетальної сироватки бичків, 1 % антибіотика-антимікотика (Sigma, США). Культивування первинної культури також проводили у CO₂ інкубаторі за 5 % вмісту CO₂ і температурі 37 °C.

Третій дослід передбачав обробку жирової тканини методом експланту у нашій модифікації. Для цього механічно подрібнені фрагменти експланту розміром 1 - 3 мм³ поміщали у культуральні чашки і накривали покривними скельцями, а потім вносили середовище культивування DMEM, додавали 10-15 % фетальної сироватки бичків, 1 % антибіотика-антимікотика (Sigma, США). Культивування первинних культур проводили у CO₂ інкубаторі за 5 % вмісту CO₂ і температурі 37 °C. Відмінність даного методу полягає саме у фіксації фрагментів експланту покривними скельцями, що забезпечує

локальну концентрацію біологічно активних речовин безпосередньо в зоні знаходження МСК.

Всі експерименти проводили безпосередньо у день отримання фрагментів жирової тканини. Оцінювали ефективність колонієутворення, на другу та четверту добу культивування, розраховуючи кількість колонієутворюючих одиниць на культуральну чашку, щільність утворення моношару, життєздатність клітин на 14-ту добу культивування.

На другу добу культивування було зафіксовано прикріплення поодиноких клітин до дна культурального посуду (табл.3.1).

Таблиця 3.1

Кількість колоній стовбурових клітин культури жирової тканини більшого сальника за різних способів обробки первинного матеріалу, шт, ($M \pm m$, $n = 6$)

Дослід №	Метод обробки	Кількість колоній	
		Друга доба культивування	Четверта доба культивування
1	2 мг/см ³ колагенази	2,1±0,6	5,1±0,6*
2	Метод експланту	1,1±0,7	3,1±0,7
3	Модифікований метод експланту	4,5±0,2 *^	8,7±1,2***^

Примітка: * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$, *** – $p < 0,001$ порівняно з другим дослідом;

^ – $p < 0,05$, ^^ – $p < 0,01$; ^^^ – $p < 0,001$ – порівняно з першим дослідом

У першому досліді було зафіксовано $2,1 \pm 0,6$ колоній. Дещо нижчий показник колонієутворюючої здатності культури абдомінальної жирової тканини отримали у другому досліді, хоча статистично значущої різниці порівняно з першим дослідом не спостерігалось. Водночас у третьому досліді кількість колоній достовірно була більшою і становила $4,5 \pm 0,2$ ($p < 0,05$ – у

порівнянні з першими двома методами обробки первинного матеріалу). Ми вважаємо, що за використання модифікованого методу експланта відбувається більш інтенсивний механічний контакт з площею поверхні культурального посуду, що дає можливість клітинами швидше виходити з субстрату і адгезуватися.

Під час досліджень на 4-ту добу культивування реєстрували достовірно більшу кількість колоній за третього методу обробки первинного матеріалу порівняно з першими двома методами. Показник кількості колоній в експериментах третього дослідження становив $8,7 \pm 1,2$ ($p < 0,001$ – у порівнянні з другим методом, $p < 0,05$ – у порівнянні з ферментативною обробкою тканини). Ферментативний метод обробки первинного матеріалу також дав гарні результати з показником кількості колоній $5,1 \pm 1,6$ ($p < 0,05$ у порівнянні з другим дослідом), але був достовірно нижчим від такого у третьому досліді.

Ефективність методів обробки первинного матеріалу визначали за швидкістю формування моношару клітин на дні культурального посуду та життєздатністю МСК за різних методів обробки первинного матеріалу на 14-ту добу культивування (табл. 3.2.).

В умовах культивування *in vitro* на 14-ту добу культивування найбільшу кількість клітин отримали за використання методу модифікованого експланта в досліді 3. У цих експериментах показники загальної кількості клітин та їх життєздатність була достовірно більшою у порівнянні з обробкою первинного матеріалу іншими методами та становила $735,50 \pm 45,2$ тисяч ($p < 0,001$ – у порівнянні з другим дослідом, та $p < 0,05$ – у порівнянні з першим дослідом – ферментативною обробкою тканини).

Життєздатність клітини культури МСК у досліді 3 також була достовірно вищою і становила $98,20 \pm 0,13$ % ($p < 0,05$ – у порівнянні з другим дослідом, та $p < 0,01$ – у порівнянні з першим дослідом – ферментативною обробкою тканини).

Таблиця 3.2

**Ефективність методів обробки жирової тканини більшого сальника
собаки за кількістю клітин та їх життєздатністю, $M \pm m$, $n = 6$**

Дослід №	Метод обробки	Функціональні показники	
		Кількість клітин, тис.	Життєздатність, %
1	2 мг/см ³ колагенази	501,52±15,6***	91,35±0,99**
2	Метод експланту	198,24±38,7	96,37±0,43
3	Модифікований метод експланту	735,50±45,2***^	98,20±0,13*^^

*Примітки: * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$, *** – $p < 0,001$ порівняно з другим дослідом; ^ – $p < 0,05$, ^^ – $p < 0,01$; ^^ – $p < 0,001$ – порівняно з першим дослідом*

Ми вважаємо, що за використання ферментативного способу обробки з використанням колагенази (тип II) для обробки первинного матеріалу відбувається не тільки руйнування тканинних і клітинних зв'язків, але і знищуються, або гальмується, функціональна активність ростових факторів і цитокінів, які знаходились у субстраті. Тож для відновлення синтезу необхідної кількості ростових факторів і цитокінів необхідний час, який витрачається культурою клітин при культивуванні і це відображається на вказаних результатах.

За методу експланту досліджувані показники, що характеризують ефективність методу, були достовірно нижчі від таких у досліді 1 та 3. На нашу думку, збагаченість середовища культивування ростовими факторами та цитокінами за рахунок клітин експланту достатня, але умови контактування клітин субстрату з культуральним посудом не сприяють швидкій адгезії клітин. Треба зауважити, що життєздатність клітин цієї культури висока, що також свідчить про достатню кількість ростових факторів у середовищі.

Отже, застосування модифікованого методу експланту при обробці жирової тканини більшого сальника дозволяє отримати найбільшу кількість клітин з первинного матеріалу, які мають найвищу колонієутворювальну здатність – $8,7 \pm 1,2$ колоній ($p < 0,001$ – у порівнянні з другим методом, $p < 0,05$ – у порівнянні з ферментативною обробкою тканини), проліферативну активність – $735,50 \pm 45,2$ тисяч клітин ($p < 0,001$ – у порівнянні з другим дослідом, та $p < 0,05$ – у порівнянні з першим дослідом – ферментативною обробкою тканини) та життєздатність – $98,20 \pm 0,13$ % ($p < 0,05$ – у порівнянні з другим дослідом, та $p < 0,01$ – у порівнянні з першим дослідом – ферментативною обробкою тканини).

На нашу думку це пояснюється тим, що запропонований нами метод обробки первинного матеріалу та культивування забезпечує не тільки отримання найвищої кількості колонієутворюючих одиниць, але і збереження ростових факторів і цитокінів субстрату, які збагачують середовище культивування, що є необхідними для процесів адгезії і проліферації, особливо у первинній культурі, а також створює умови для максимальної адгезії клітин субстрату до культурального посуду.

3.1.4 Функціональна активність мезенхімних стовбурових клітин культури підшкірної жирової тканини собаки залежно від умов обробки та культивування первинного матеріалу. Підшкірну жирову тканину отримати набагато простіше у методичному відношенні, а також для тварини-донора це є значно меншим навантаженням на організм, враховуючи дозу седативних препаратів при оперативному втручанні та саму операцію. Цей метод не спричинює таких постопераційних незручностей для тварини як при порожнинній операції. Таким чином, підшкірна жирова тканина є дуже привабливим джерелом стовбурових клітин. Тому ми вирішили дослідити функціональну активність стовбурових клітин, отриманих з цього первинного матеріалу.

Підшкірну жирову тканину отримували в собак різних порід віком 1 - 2 роки за проведення оперативних утручань. Жирову тканину відбирали під шкірою в ділянці черевної стінки. Отриманий первинний матеріал у кількості 10-15 г обробляли за трьома методами для виявлення найкращого з метою отримання найбільшої кількості адгезивної фракції клітин з високою проліферативною активністю та життєздатністю. Досліджували ефективність трьох способів обробки первинного матеріалу, а саме ферментативної дезагрегації, метод експланту, метод експланту в нашій модифікації.

За умов першого дослідження ферментативна дезагрегація підшкірної жирової тканини включала обробку колагеназою (тип II) із розрахунку 2 мг/см³. Після обробки колагеназою первинний матеріал промивали ФБР, вносили у чашки Петрі, додавали середовище культивування DMEM, 10-15 % фетальної сироватки бичків, 1 % антибіотика-антимікотика (Sigma, США). Культивування первинної культури проводили у CO₂ інкубаторі за 5 % вмісту CO₂ і температурі 37 °C.

За умов другого дослідження підшкірну жирову тканину механічно подрібнювали до фрагментів розміром 1-3 мм³, після чого їх вносили у чашки Петрі та додавали середовище культивування DMEM, 10-15 % фетальної сироватки бичків, 1 % антибіотика-антимікотика (Sigma, США).

Третій дослід передбачав модифікований метод експланта. При цьому механічно подрібнені фрагменти експланту розміром 1-3 мм³ поміщали у культуральні чашки і накривали покривними скельцями, а потім вносили середовище культивування DMEM, додавали 10-15 % фетальної сироватки бичків, 1 % антибіотика-антимікотика (Sigma, США). Культивування первинних культур проводили у CO₂ інкубаторі за 5 % вмісту CO₂ і температурі 37 °C.

На 2-гу добу було зафіксовано прикріплення поодиноких клітин до дна культурального посуду. У першому досліді було зафіксовано $1,8 \pm 0,4$ колоній на чашку (табл.3.3).

Таблиця 3.3

**Кількість колонієутворюючих одиниць за різних методів обробки
підшкірної жирової тканини собаки, $M \pm m$, $n = 6$**

Дослід №	Метод обробки	Функціональні показники, кількість колоній (шт.)	
		Друга доба культивування	Четверта доба культивування
1	2 мг/см ³ колагенази	$1,8 \pm 0,4$	$2,5 \pm 0,6^*$
2	Метод експланту	$0,9 \pm 0,7$	$1,8 \pm 0,7$
3	Модифікований метод експланту	$3,1 \pm 0,2^{*\wedge}$	$4,7 \pm 1,2^{***\wedge}$

Примітки: * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$, *** – $p < 0,001$ порівняно з другим дослідом; ^ – $p < 0,05$, ^^ – $p < 0,01$; ^^ – $p < 0,001$ – порівняно з першим дослідом

За результатами досліджень показник колонієутворюючої здатності культур підшкірної жирової тканини, які ми отримали, був нижчий у другому досліді (у межах тенденції). Водночас, у третьому досліді кількість колоній була достовірно більшою і становила $3,1 \pm 0,2$ ($p < 0,05$ – у порівнянні з першими двома методами обробки первинного матеріалу). На нашу думку за використання модифікованого методу експланта відбувається більш інтенсивний механічний контакт з площею поверхні культурального посуду, що дає можливість клітинами швидше виходити з субстрату і адгезуватися.

Під час досліджень на 4-ту добу культивування реєстрували достовірно більшу кількість колоній також за третього методу обробки первинного матеріалу, ніж за використання перших двох методів. Показник

кількості колоній становив $4,7 \pm 1,2$ ($p < 0,001$ – у порівнянні з другим методом, $p < 0,05$ – у порівнянні з ферментативною обробкою тканини). Ферментативний метод обробки первинного матеріалу також дав гарні результати з показником кількості колоній $2,5 \pm 1,6$ ($p < 0,05$ у порівнянні з другим дослідом), але був достовірно нижчим від такого у третьому досліді.

Швидкість формування моношару та кількість клітин у ньому, життєздатність отриманих клітин, також засвідчували ефективність методів обробки первинного матеріалу.

Найбільш ефективним з досліджуваних методів був модифікований метод експланту у досліді 3 (табл. 3.4.).

Таблиця 3.4.

Функціональні показники адгезивної фракції клітин за різних методів обробки підшкірної жирової тканини собаки, $M \pm m$, $n = 6$

Дослід №	Метод обробки	Функціональні показники на 14-ту добу культивування	
		Кількість клітин, тис.	Життєздатність, %
1	2 мг/см ³ колагенази	$312,32 \pm 25,6^{***}$	$86,15 \pm 2,33$
2	Метод експланту	$152,98 \pm 47,3$	$90,51 \pm 1,27$
3	Модифікований метод експланту	$492,43 \pm 32,3^{***\wedge}$	$92,20 \pm 2,13^{*\wedge}$

Примітки: * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$, *** – $p < 0,001$ порівняно з другим дослідом; ^ – $p < 0,05$, ^^ – $p < 0,01$; ^^ – $p < 0,001$ – порівняно з першим дослідом

В умовах культивування *in vitro* на 14-ту добу культивування найбільшу кількість клітин отримали за використання методу модифікованого експланту у досліді 3. Показники кількості клітин та їх

життєздатність на 14-ту добу культивування були достовірно вищими за обробки первинного матеріалу іншими методами. Кількість клітин становила $492,43 \pm 32,3$ тисяч ($p < 0,001$ – у порівнянні з другим дослідом та $p < 0,05$ – у порівнянні з першим дослідом – ферментативною обробкою тканини). Життєздатність клітин культур у досліді 3 була також достовірно вищою і становила $92,20 \pm 2,13$ % ($p < 0,05$ – у порівнянні з другим дослідом та $p < 0,05$ – у порівнянні з першим дослідом – ферментативною обробкою тканини).

3.1.5 Порівняльна характеристика функціональної активності мезенхімальних стовбурових клітин культур жирової тканини більшого сальника та підшкірної. Таким чином, у результаті проведених досліджень можемо порівняти функціональну активність стовбурових клітин культур абдомінальної та підшкірної жирової тканини собак.

За показником колонієутворючої функції на другу добу культивування ми не реєстрували достовірних змін у культурах клітин з абдомінальної і підшкірної жирової тканини. Спостерігали лише тенденцію до збільшення цього показника у культурі абдомінальної жирової тканини за різних методів обробки первинного матеріалу (табл.3.5).

На 4-добу культивування первинного матеріалу було виявлено достовірні відмінності у культурах. Так, за першого і другого методів обробки первинного матеріалу ми зареєстрували достовірне збільшення колонієформуєчих одиниць у культурі абдомінальної жирової тканини, кількість яких становила у першому досліді $5,1 \pm 1,6$ ($p < 0,05$), а у третьому експерименті – $8,7 \pm 1,2$ ($p < 0,05$) у порівнянні з культурою підшкірної жирової тканини.

У ході проведеного аналізу даних ми також визначили, що кількість клітин на 14-ту добу культивування достовірно більша у культурах абдомінальної жирової тканини за усіх трьох методів обробки первинного

матеріалу (табл. 3.6).

Таблиця 3.5

Кількість колонієутворюючих одиниць за різних методів обробки жирової тканини більшого сальника та підшкірної жирової тканини собаки на 2-гу та 4-ту добу культивування, $M \pm m$, $n = 6$, шт.

Метод обробки	Кількість колонієутворюючих одиниць			
	2-га доба культивування		4-та доба культивування	
	абдомінальна	підшкірна	абдомінальна	підшкірна
2 мг/см ³ колагенази	$2,1 \pm 0,6$	$1,8 \pm 0,4$	$5,1 \pm 1,6^*$	$2,5 \pm 0,6$
Метод експланту	$1,1 \pm 0,7$	$0,9 \pm 0,7$	$3,1 \pm 0,7^*$	$1,8 \pm 0,7$
Модифікований метод експланту	$4,5 \pm 0,2$	$3,1 \pm 0,2$	$8,7 \pm 1,2^*$	$4,7 \pm 1,2$

Примітки: * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$, *** – $p < 0,001$ порівняно з культурою з підшкірної жирової тканини

Визначено, що життєздатність клітин культури абдомінальної та підшкірної жирової тканини при обробці та культивуванні методом експланта та модифікованим методом експланта була високою і достовірно відрізнялася від показника життєздатності клітин при ферментативній обробці у першому досліді. За методу експланта обробки абдомінальної та підшкірної жирової тканини показник життєздатності становив $96,37 \pm 0,43$ % ($p < 0,05$) та $94,51 \pm 1,27$ % ($p < 0,05$) у порівнянні з ферментативною обробкою тканини.

А за обробки абдомінальної та підшкірної жирової тканини модифікованим методом експланта показник життєздатності становив $98,20 \pm 0,13$ % ($p < 0,05$) та $96,20 \pm 2,13$ % ($p < 0,05$) у порівнянні з ферментативною

обробкою тканини.

Таблиця 3.6

Порівняльна характеристика функціональної активності клітин з високими адгезивними властивостями культур жирової тканини більшого сальника та підшкірної жирової тканини, $M \pm m$, $n = 6$

Метод обробки	Функціональні показники, 14-та доба культивування			
	Кількість клітин, тис.		Життєздатність, %	
	абдомінальна	підшкірна	абдомінальна	підшкірна
2 мг/см ³ колагенази	501,52 ± 15,6**	312,32 ± 25,6	91,35 ± 0,99*	86,15 ± 2,33
Метод експланту	198,24 ± 38,7	152,98 ± 47,3	96,37 ± 0,43^	94,51 ± 1,27^
Модифікований метод експланту	735,50 ± 45,2**	492,43 ± 32,3	98,20 ± 0,13^	96,20 ± 2,13^

Примітки: * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$, *** – $p < 0,001$ порівняно з показниками клітин культур підшкірної жирової тканини; ^ – $p < 0,05$, ^^ – $p < 0,01$; ^^ – $p < 0,001$ – порівняно з першим дослідом

Отже, функціональні показники культури жирової тканини більшого сальника собаки були достовірно вищими: показник кількості колонієутворюючих одиниць, який становив $8,7 \pm 1,2$ ($p < 0,001$ – у порівнянні з методом експланта, $p < 0,05$ – у порівнянні з ферментативною обробкою тканини), життєздатності – $98,20 \pm 0,13$ % ($p < 0,05$ – у порівнянні з методом експланта та $p < 0,01$ – у порівнянні з ферментативною обробкою тканини) та кількості клітин у культурі на 14-ту добу культивування – $735,50 \pm 45,2$ тисяч ($p < 0,001$ – у порівнянні з методом експланта та $p < 0,05$ – у порівнянні з ферментативною обробкою тканини).

Таким чином, жирова тканина собаки різної локалізації може бути використані для отримання адгезивної фракції клітин з високою проліферативною активністю. Найкращу функціональну активність продемонстрували стовбурові клітини культури жирової тканини більшого сальника, які були отримані модифікованим методом експланта. У ході проведеного аналізу даних визначили, що кількість клітин культури жирової тканини більшого сальника, отриманих модифікованим методом експланта, на 14-ту добу культивування достовірно більша за таку, отриману методом ферментативної обробки первинного матеріалу та за модифікованого методу експланту. Життєздатність клітин за ферментативної обробки достовірно нижча, ніж за модифікованого методу експланта. Ми пов'язуємо вказані розбіжності з різним спектром цитокінів та відмінностями у спрямованості обмінних процесах (насамперед, ліпідного обміну) в жировій тканині різної локалізації.

3.1.6 Отримання первинного матеріалу та функціональна активність мезенхімальних стовбурових клітин культури підшкірної жирової тканини коня залежно від умов обробки та культивування первинного матеріалу. Підшкірну жирову тканину коня для отримання мезенхімальних стовбурових клітин відбирали в ділянці між коренем хвоста та сідницею.

Жирову тканину відбирали від клінічно здорових коней. Особливостями методу відбору жирової тканини в коня є: вибір оптимального місця для виконання оперативного втручання, застосування найменш травматичного для тварини методу її фіксації, використання найменшої кількості седативного препарату. Це дозволяє значно скоротити період адаптації тварини у післяопераційний період. У коней проби первинного матеріалу для виділення стовбурових клітин відбирали в ділянці між коренем хвоста та сідничою ділянками (рис. 3.8).



Рис. 3.8. Основні етапи виконання оперативного втручання для відбору первинного матеріалу в коня: виконання розрізу шкіри між ділянками кореня хвоста та сідничою.

З метою седації перед проведенням оперативного втручання застосовували Седазін (Biowet Pulawy, Польща) внутрішньовенно у дозі 3 - 5 мл препарату на 100 кг ваги тіла. Коня фіксували в стоячому положенні. Для цього на ділянку пута грудної кінцівки надівали ремінь, з'єднаний через кільце з довгою мотузкою, яку перекидали через спину тварини і обводили навколо грудної клітки. Вільний кінець мотузки утримував помічник, який знаходився з протилежного боку. Піднімали передню кінцівку зі сторони взяття проби й згинали її в карпальному суглобі, а помічник у цей час натягував мотузку й утримував кінцівку піднятою. Коли тварина дуже

непокоїлася, а також коли минула потреба у фіксації, помічник повільно опускав мотузку, щоб кінь міг спиратися на кінцівку.

Поле оперативного втручання попередньо пальпували для визначення місця відкладення жирової тканини. Операційне поле вибривали та дезінфікували 70 % етиловим спиртом тричі. Виконували розріз шкіри довжиною 2-3 см. Шкіру фіксували затискачами та відводили убік з метою розштирення доступу до жирової тканини. Пінцетом захоплювали жирову тканину і відрізали ножицями (рис. 3.9).



Рис. 3.9. Основні етапи виконання оперативного втручання для відбору первинного матеріалу в коня: відбір зразка жирової тканини.

Цілком відбирали 10-20 г підшкірної жирової клітковини у стерильний посуд з фосфатно-буферним розчином (рис. 3.10). Кровотечу зупиняли прикладанням на деякий час ватно-марлевого тампону. Рану ушивали

накладанням вузликуватих швів натуральним шовком розміром №8 (рис.3.11). Отриманий матеріал доставляли у лабораторію у найкоротші терміни.



Рис. 3.10. Основні етапи виконання оперативного втручання для відбору первинного матеріалу в коня: перенесення відібраного зразка жирової тканини в стерильну пробірку.

Застосований нами метод відбору первинного матеріалу (підшкірної жирової тканини коня) є досить легким у виконанні та передбачає фіксацію, яка не завдає болю тварині та виключає травматизацію у порівнянні з іншими способами фіксації (повал, накладання закрутки на верхню губу). Використання незначної дози седативного препарату не спричинює негативної дії на фізіологічний стан систем і органів та водночас запобігає виникненню стресу в тварини.



Рис. 3.11. Основні етапи виконання оперативного втручання для відбору первинного матеріалу в коня: накладанням вузликуватих швів на шкіру.

Як і при дослідженнях функціональної активності МСК підшкірної жирової тканини собак, обробку та культивування первинного матеріалу проводили трьома методами, а саме ферментативної дезагрегації, метод експланту, модифікований метод експланту.

За умов першого дослідження ферментативна дезагрегація підшкірної жирової тканини включала обробку колагеназою (тип II) із розрахунку 2 мг/см³. Після обробки колагеназою первинний матеріал вносили у чашки Петрі, додавали середовище культивування DMEM, 10-15 % фетальної сироватки бичків, 1 % антибіотика-антимікотика (Sigma, США). Культивування первинної культури проводили у CO₂ інкубаторі за 5 % вмісту CO₂ і температурі 37 °C.

За умов другого дослідження підшкірну жирову тканину механічно подрібнювали до шматочків розміром 1-3 мм³, після чого їх вносили у чашки Петрі та додавали середовище культивування DMEM, 10-15 % фетальної сироватки бичків, 1 % антибіотика-антимікотика (Sigma, США).

Третій дослід передбачав модифікований метод експланта. При цьому механічно подрібнені шматочки експланту розміром 1-3 мм³ поміщали у культуральні чашки і накривали покривними скельцями, а потім вносили середовище культивування DMEM, додавали 10-15 % фетальної сироватки бичків, 1 % антибіотика-антимікотика (Sigma, США). Культивування первинних культур проводили у CO₂ інкубаторі за 5 % вмісту CO₂ і температурі 37 °C.

Появу перших колоній клітин фібробластоїдної морфології спостерігали вже на другу добу культивування за всіма трьома використаними методиками, однак, їх кількість була достовірно вище за застосування запропонованого нами модифікованого методу експланта і становила $3,3 \pm 0,2$ ($p < 0,05$ у порівнянні з першим і другим методом обробки первинного матеріалу) (табл. 3.7).

Показники колонієутворюючої активності за застосування ферментативної обробки матеріалу та методу експланта без модифікації достовірно не розрізнялись між собою. На четверту добу спостереження кількість колоній зростала майже вдвічі за використання всіх трьох методик обробки первинного матеріалу, але найбільш достовірно зростання спостерігалось за застосування модифікованого методу експланта, ніж за використання перших двох методів. Показник кількості колоній становив $5,1 \pm 0,9$ ($p < 0,001$ – у порівнянні з другим методом, $p < 0,05$ – у порівнянні з ферментативною обробкою тканини). Кількість колоній за використання ферментативного методу обробки первинного матеріалу і немодифікованого експланта достовірно не розрізнялись.

Таблиця 3.7

**Кількість колонієутворюючих одиниць культури підшкірної жирової
тканини за різних методів обробки, шт, $M \pm m$, $n = 4$**

Дослід №	Метод обробки	кількість колонієутворюючих одиниць (шт.)	
		Друга доба культивування	Четверта доба культивування
1	2 мг/см ³ колагенази	$1,9 \pm 0,3$	$2,9 \pm 0,4$
2	Метод експланту	$1,2 \pm 0,4$	$2,0 \pm 0,3$
3	Модифікований метод експланту	$3,3 \pm 0,2^{*\wedge}$	$5,1 \pm 0,9^{***\wedge}$

Примітки: * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$, *** – $p < 0,001$ порівняно з другим дослідом; \wedge – $p < 0,05$, $\wedge\wedge$ – $p < 0,01$; $\wedge\wedge\wedge$ – $p < 0,001$ – порівняно з першим дослідом

Швидкість формування моношару та кількість клітин у ньому, життєздатність отриманих клітин, які оцінювали на 14-ту добу культивування, також засвідчили більшу ефективність модифікованого методу експланту порівняно з іншими методами обробки первинного матеріалу іншими методами (табл. 3.8.).

Отже, за модифікованого методу експланту обробки жирової тканини коня та культивування ми отримали найбільшу кількість клітин, яка становила $501,37 \pm 21,7$ тисяч ($p < 0,001$ – у порівнянні з другим дослідом та $p < 0,05$ – у порівнянні з першим дослідом – ферментативною обробкою тканини); найвищу життєздатність клітин культури у досліді 3, яка становила $96,60 \pm 1,97$ % ($p < 0,05$ – у порівнянні з другим дослідом та $p < 0,05$ – у порівнянні з першим дослідом – ферментативною обробкою тканини).

Таблиця 3.8.

**Функціональні показники адгезивної фракції клітин культури
підшкірної жирової тканини за різних методів обробки, $M \pm m$, $n = 4$**

Дослід №	Метод обробки	Функціональні показники на 14-ту добу культивування	
		Кількість клітин, тис.	Життєздатність, %
1	2 мг/см ³ колагенази	348,78 ± 36,1***	89,65 ± 1,27
2	Метод експланту	245,45 ± 29,4	92,35 ± 1,08
3	Модифікований метод експланту	501,37 ± 21,7***^	96,60 ± 1,97*^

Примітки: * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$, *** – $p < 0,001$ порівняно з другим дослідом; ^ – $p < 0,05$, ^^ – $p < 0,01$; ^^ – $p < 0,001$ – порівняно з першим дослідом

3.1.7 Функціональна активність мезенхімних стовбурових клітин кісткового мозку залежно від умов обробки та культивування первинного матеріалу. У досліді використовували лінійних мишей C57BL/6. Вивчали функціональні показники МСК для визначення оптимальних умов обробки первинного матеріалу та складу середовища культивування. Для отримання первинної культури застосовували градієнти щільності фіколу: у першому досліді 1,074, другому – 1,076, третьому – 1,078, та четвертому – 1,080) при незмінному параметрі центрифугування 300 об/хв. Для культивування використовували поживне середовище – DMEM або RPMI. Культивування проводили з додаванням 10–20 % фетальної сироватки телят та 10 мкл/мл антибіотика – антимікотика.

Остаточний підрахунок кількості клітин, їх життєздатність, визначення коефіцієнта проліферації проводили на момент утворення моношару.

Контролем слугували стандартні умови отримання первинного матеріалу і культивування отриманих клітин (центрифугування кісткового

мозку у середовищі DMEM без використання градієнту щільності, культивування – за аналогічних умов із дослідом).

Перша серія експериментів проводилась при культивуванні МСК у поживному середовищі DMEM. Встановлено, що первинний матеріал, отриманий за показників градієнта щільності фіколу 1,074 (рис. 3.12) та 1,076 (рис. 3.13) дав більший вихід прикріплених клітин.

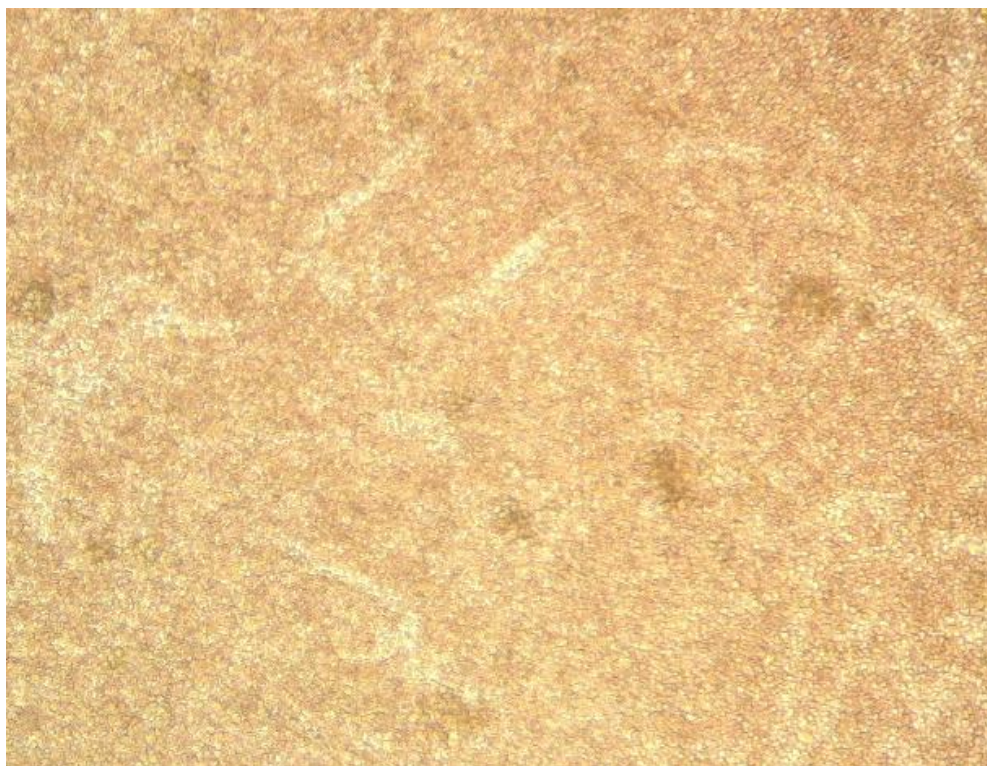


Рис. 3.12 Адгезія клітин до поверхні культурального посуду за культивування первинного матеріалу, отриманого при використанні градієнта щільності фіколу 1,074. Мікропрепарат, $\times 100$.

Саме у цих зразках ми реєстрували прикріплення більшої кількості клітин до дна культурального посуду в найкоротший термін. На нашу думку, це пов'язано з тим, що за вказаних показників градієнта щільності фікол-верографіна у первинний матеріал потрапила необхідна кількість попередників МСК і саме у такому складі речовин, що сприяє процесу адгезії МСК до дна культурального посуду.



Рис. 3.13 Адгезія клітин до поверхні культурального посуду за культивування первинного матеріалу, отриманого при використанні градієнта щільності фіколу 1,076. Мікропрепарат, $\times 100$.

Кількість отриманих попередників МСК культури червоного кісткового мозку зменшувалася зі збільшенням показника градієнта щільності фіколу, про що свідчили негативні значення коефіцієнту кореляції $r = -0,76$ ($p < 0,05$) (табл.3.9).

Така ж сама негативна кореляція знайдена між збільшенням показника градієнта щільності фіколу та зменшенням коефіцієнту проліферації МСК $r = -0,56$, ($p < 0,05$) і їх життєздатністю $r = -0,32$, ($p < 0,05$).

Таблиця 3.9

Функціональна активність мезенхімних стовбурових клітин кісткового мозку лінійних мишей C57BL/6 залежно від умов обробки та культивування у середовищі Ігла, модифікованому Дюльбекко, $M \pm m, n = 6$

Гradient щільності фіколу	Показники		
	Кількість клітин	Коефіцієнт проліферації	Життєздатність, %
контроль	583993,1 \pm 1567,6	2,33 \pm 0,06	92,35 \pm 0,99
1,074	713802,9 \pm 3860,7**	2,86 \pm 0,01**	95,37 \pm 0,43*
1,076	635502,4 \pm 4548,2**	2,54 \pm 0,02*	91,20 \pm 0,13
1,078	555576,4 \pm 3343,6	2,22 \pm 0,01	96,92 \pm 0,27
1,080	355502,4 \pm 3288,4*	1,42 \pm 0,01	82,93 \pm 0,54

Примітка: * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$, *** – $p < 0,001$ порівняно з показниками контрольної групи.

У другій серії досліджень для визначення оптимальних умов культивування первинного матеріалу вивчали функціональні показники МСК за різних умов отримання первинного матеріалу та культивування у середовищі RPMI. Отримані результати були аналогічні попереднім.

Вже за 24 години ми помітили суттєву різницю у прикріпленні МСК дослідних зразків до дна культурального посуду – найбільша при культивуванні у середовищі RPMI первинного матеріалу, отриманого за показником градієнта щільності фіколу 1,074 та 1,076.

Це засвідчує й найвищий показник кількості клітин за використання щільності фіколу 1,074, що становив 683000 ± 1400 ($p < 0,01$) порівняно за показниками при щільності 1,080 і контролем (табл. 3.10).

Таблиця 3.10

Функціональна активність мезенхімних стовбурових клітин кісткового мозку лінійних мишей C57BL/6 залежно від умов обробки та культивування у середовищі RPMI, $M \pm m$, $n = 6$

Гradient щільності фіколу	Показники		
	Кількість клітин	Коефіцієнт проліферації	Життєздатність, %
контроль	529000 ± 2700	$2,12 \pm 0,08$	$91,37 \pm 0,40$
1,074	$683000 \pm 1400^*$	$2,73 \pm 0,06^*$	$95,06 \pm 1,13^*$
1,076	$663000 \pm 1500^*$	$2,65 \pm 0,02^*$	$90,03 \pm 3,09$
1,078	548000 ± 900	$2,19 \pm 0,09$	$93,02 \pm 2,30$
1,080	$455000 \pm 1600^*$	$1,82 \pm 0,08$	$84,37 \pm 2,12^*$

Примітка: * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$, *** – $p < 0,001$ порівняно з показниками контрольної групи.

Показник кількості клітин зразків, отриманих за щільності фіколу 1,076, також був достовірно вищим за показники, отримані за щільності 1,080 і в контролі, і становив 663000 ± 1500 ($p < 0,05$).

За центрифугуванні суспензії клітин кісткового мозку за щільності фіколу 1,078 і 1,080 первинний матеріал не містив тих необхідних пропорцій мононуклеарних клітин, що забезпечують високу проліферативну активність МСК, за що свідчать показники загальної кількості отриманих клітин та коефіцієнти проліферації.

Встановлено обернені кореляційні зв'язки кількості клітин у первинній культурі $r = -0,84$ ($p < 0,001$), індексу проліферації $r = -0,75$ ($p < 0,001$) та життєздатності $r = -0,56$ ($p < 0,05$) від щільності градієнта фіколу.

Достовірної різниці між показниками проліферативної активності МСК, їх життєздатністю при культивуванні клітин у поживних середовищах DMEM та RPMI не виявлено.

Отже, умови обробки первинного матеріалу, а саме кісткового мозку лінійних мишей C57BL/6, достовірно впливають на кількість мезенхімних стовбурових клітин у первинній культурі, на показники коефіцієнту проліферації та їх життєздатність як при культивуванні у середовищі RPMI, так і при культивуванні у середовищі DMEM.

Таким чином, для отримання мезенхімних стовбурових клітин з кісткового мозку оптимальним є центрифугування первинної суспензії у градієнті щільності фіколу 1,074–1,076 з подальшим використанням поживного середовища DMEM або RPMI.

3.1.8. Функціональна активність, ядерно-цитоплазмове співвідношення мезенхімних стовбурових клітин кісткового мозку миші за різних пасажів культивування. За культивування *in vitro* відбувається закономірне старіння клітин. Цей процес можуть підсилювати чисельні фактори, зокрема застосування антибіотиків, антимікотиків; трипсину і EDTA при знятті моношару клітин з поверхні культурального посуду тощо. Отже, ми дослідили морфофункціональні властивості МСК на різних пасажах культивування для визначення кращого терміну їх використання в подальших експериментах у ветеринарній практиці.

Аналіз морфологічних особливостей клітин розпочинали з другого пасажу: клітини вже адаптувались до умов культивування *in vitro*, сформували моношар на дні культурального посуду, загиблі клітини та клітини кісткового мозку, що не відносяться до мезенхімних стовбурових клітин були еліміновані.

Клітини на другому пасажі культивування мали будову, властиву клітинам мезенхімного походження, а саме фібробластам (рис. 3.14).

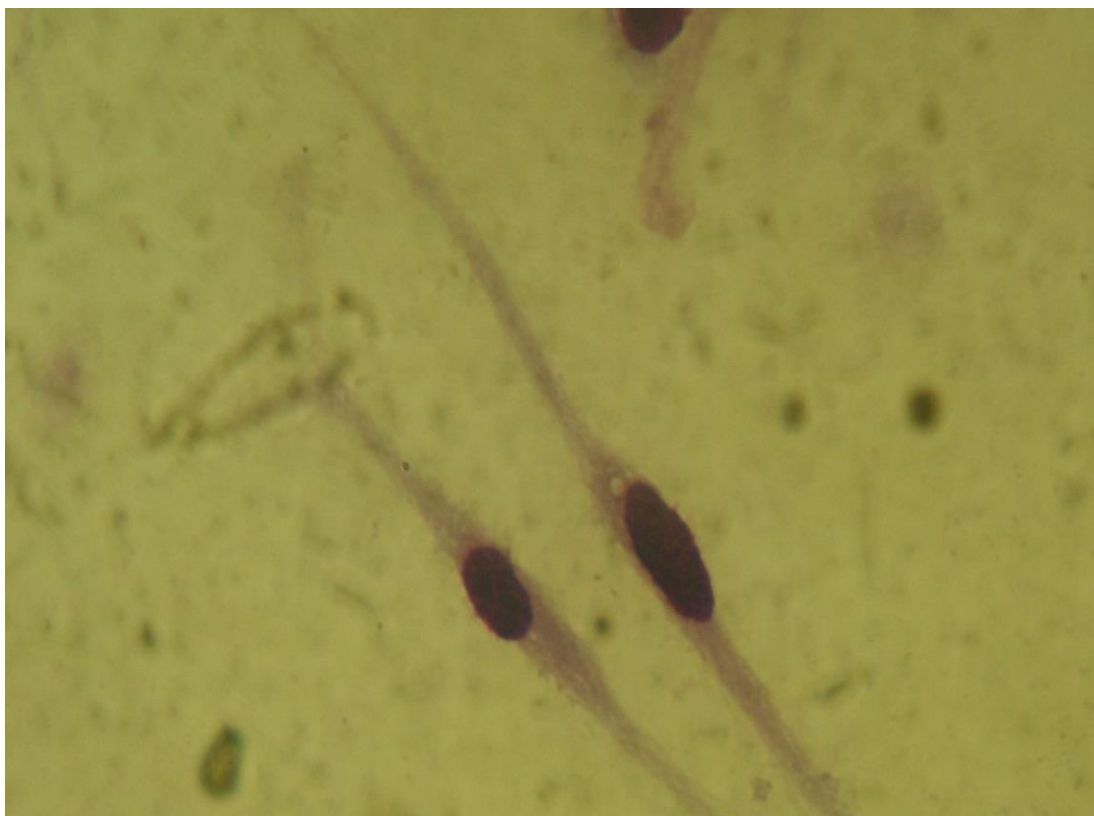


Рис. 3.14. Мезенхімні стовбурові клітини червоного кісткового мозку миші веретеноподібної біполярної форми, 2 пасаж. Фарбування за Папенгеймом. Мікропрепарат, $\times 900$.

Форма переважної більшості клітин була веретеноподібною з невеликим об'ємом цитоплазми, яка формувала довгі тонкі вирости. Зустрічалися також поодинокі клітини з трьома виростами цитоплазми, але їх загальна кількість не перевищувала 3 %.

Ядра видовжено овальні, щільної структури, містили багато гетерохроматину. Ядерця не контурувалися. Біля ядер у цитоплазмі іноді визначалася зона просвітлення – місце розташування комплексу Гольджі, який добре розвинений в клітинах з високим рівнем синтезу білкових молекул. Фарбування цитоплазми слабо базofilьне; зернистості, вкраплень, вакуолізації не зареєстровано.

На четвертому пасажі культивування клітини мають типову морфологію фібробластів (рис. 3.15).

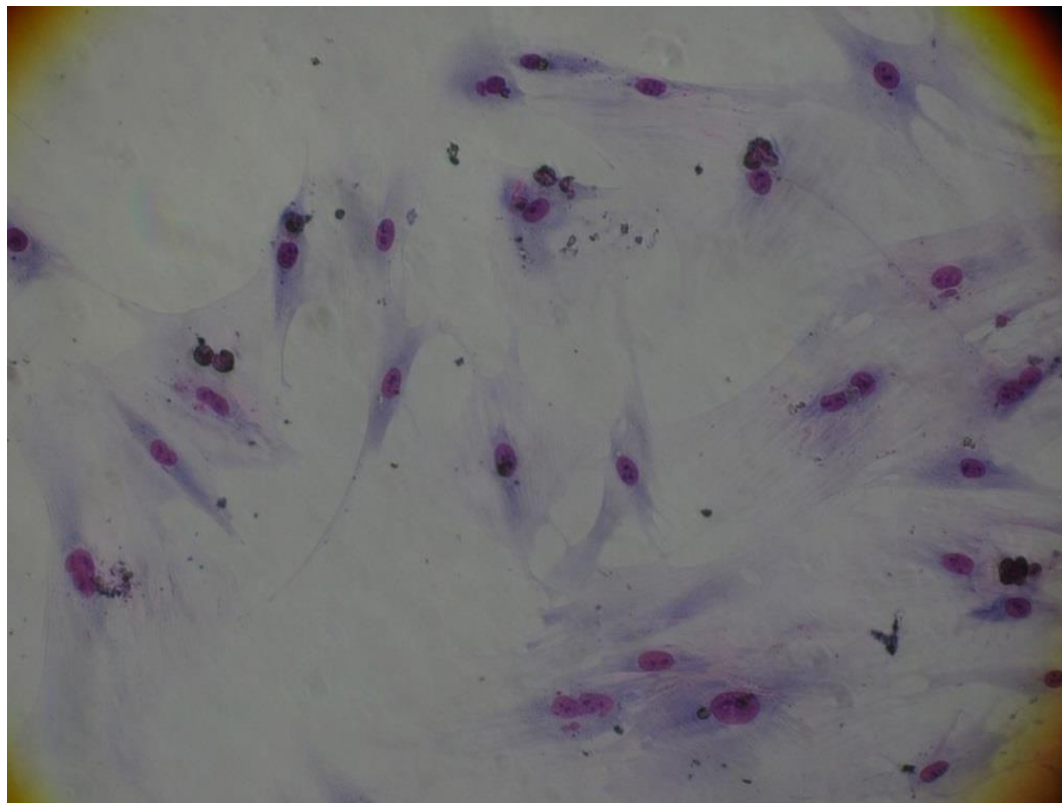


Рис. 3.15. Мезенхімні стовбурові клітини червоного кісткового мозку миші, 4 пасаж культивування. Фарбування за Папенгеймом. Мікропрепарат, $\times 320$.

Це клітини видовженої форми, площа цитоплазми клітин збільшувалася та формувала два та більше виростів, завдяки чому окремі клітини набували зірчастої форми. Ядра відносно невеликі, овальної форми, містили 1–2 невеликих ядерця. Поблизу ядер розташований комплекс Гольджі у вигляді овального просвітлення цитоплазми. Зустрічалися поодинокі клітини з двома ядрами.

На сьомому пасажі культивування МСК кісткового мозку реєстрували збільшення кількості виростів цитоплазми у клітинах, розміри клітин значно збільшувалися за рахунок збільшення площі цитоплазми (рис. 3.16).

Майже усі клітини мали більше двох виростів цитоплазми. У більшості клітин реєстрували просвітлені місця розташування комплексу Гольджі. Ядра овальні, мали 1-2 невеличкі ядерця.

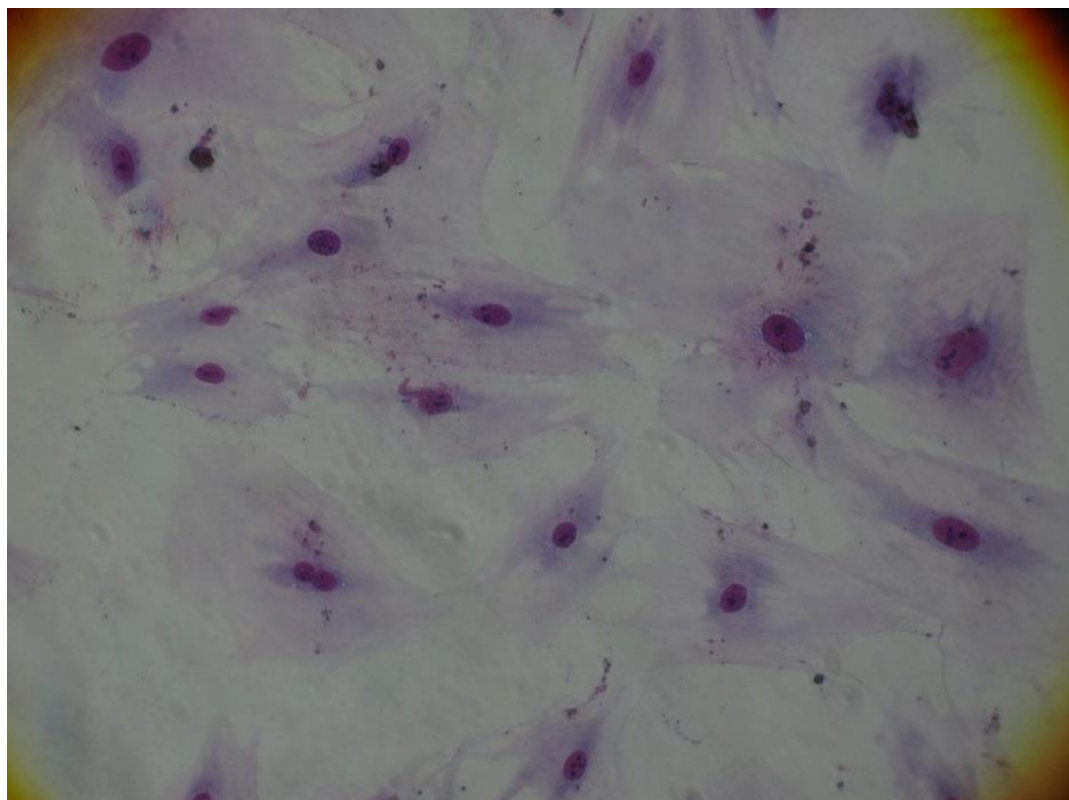


Рис. 3.16. Мезенхімні стовбурові клітини культури червоного кісткового мозку миші на 7-му пасажі культивування. Фарбування за Папенгеймом. Мікропрепарат, $\times 320$.

На 12-му пасажі культивування МСК культури кісткового мозку встановлено достовірне збільшення площі клітин, яке відбувалося за рахунок збільшення площі цитоплазми. Остання формувала велику кількість виростів – подій. Ядра клітин пізніх пасажів округлювалися, в багатьох з них контурувалися 1–2 ядерця. Такі клітини розпластувалися по поверхні культурального посуду (рис. 3.17).

Отже, морфологічно МСК культури кісткового мозку мали суттєві відмінності від таких ранніх пасажів. Таким чином, зміни морфологічних

особливостей МСК культури кісткового мозку мишей лінії C57BL/6 свідчила про поступове старіння клітин і зменшення їх проліферативної активності.

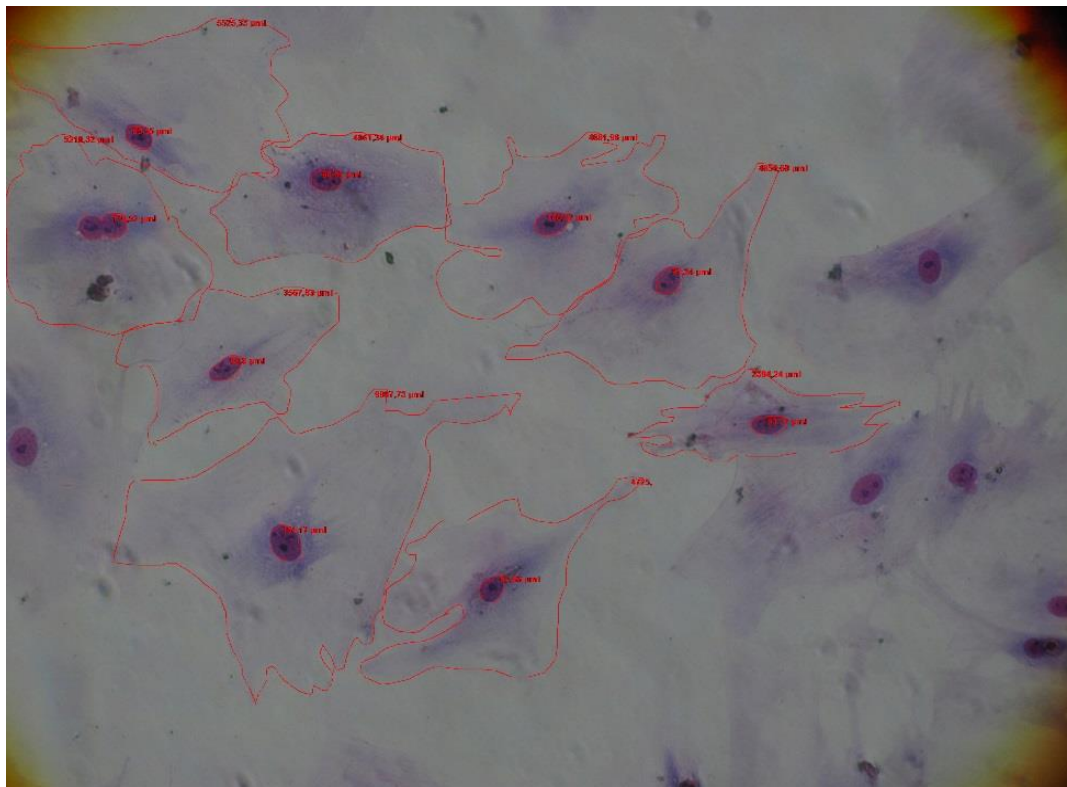


Рис. 3.17 Мезенхімні стовбурові клітини культури червоного кісткового мозку миші на 12-му пасажі культивування з підрахунком площі ядра і площі клітини за допомогою програми Axio vision. Фарбування за Папенгеймом. Мікропрепарат, $\times 320$.

Це підтверджувалося і даними ядерно-цитоплазматичного співвідношення, яке змінювалося у процесі культивування (табл. 3.11).

Треба зазначити, що площа ядер МСК культури кісткового мозку не змінювалась у процесі культивування до 7-го пасажу, а на 12-му пасажі достовірно знижувалась порівняно з клітинами другого пасажу.

На відміну від ядра площа МСК достовірно збільшувалась вже на 4-му пасажі на 13,9 % ($p < 0,05$), на 7-му – на 32,6 % ($p < 0,001$), на 12 –му – на 291 % ($p < 0,001$) порівняно з вихідним станом (2 пасаж), $r = 0,73$; ($p = 0,001$), що

призводило до достовірного зниження показника ядерно-цитоплазматичного співвідношення вже на 4-му пасажі на 12,9 % ($p < 0,05$), на 7-му – на 35,3 % ($p < 0,001$), на 12 –му – на 76,6 % ($p < 0,001$) порівняно з вихідним станом ($r = 0,87$; $p = 0,001$).

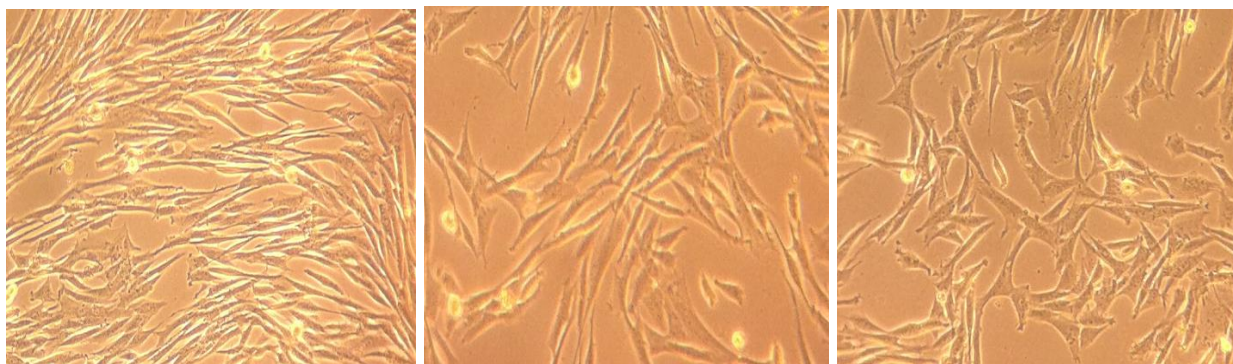
Таблиця 3.11

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

Параметри	Пасаж			
	2-ий	4-ий	7-ий	12-ий
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***
ЯЦС	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*

Примітки: * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$, *** – $p < 0,001$ порівняно з клітинами другого пасажу

Загалом моношар стовбурових клітин культури кісткового мозку утворювався повільніше по мірі збільшення кількості пасажів (рис. 3.18). Такі зміни свідчать на користь зниження проліферативної активності клітин. Життєздатність клітин в процесі культивування сягає високих показників, але зі збільшенням кількості пасажів достовірно знижується, починаючи з 7-го пасажу: 88,33 \pm 1,94 % ($p < 0,05$ порівняно з клітинами другого пасажу).



А

Б

В

Рис. 3.18. Мезенхімні стовбурові клітини культури кісткового мозку миші. А – за 2-го, Б – 7-го, В – 12-го пасажів культивування. Мікропрепарат, $\times 100$.

На 12-му пасажі життєздатність клітин становила $86,33 \pm 1,94$ % ($p < 0,05$ порівняно з клітинами другого пасажу). Встановлено зворотню кореляційну залежність між тривалістю періоду культивування і зменшенням життєздатності клітин ($r = -0,70$; $p < 0,05$).

3.1.9. Клітинний цикл мезенхімних стовбурових клітин культури червоного кісткового мозку за різних пасажів культивування. Аналіз показників, отриманих за допомогою протокової цитофлуориметрії, дав нам можливість оцінити розподіл клітин культур різних пасажів за фазами клітинного циклу (табл. 3.12).

Культури МСК червоного кісткового мозку ранніх пасажів характеризувалися абсолютним вмістом диплоїдних клітин. Анеуплоїдні клітини в культурі МСК червоного кісткового мозку на 2-му пасажі були відсутні. Це засвідчує сталість каріотипу клітин, що культивуються на ранніх пасажах.

Серед диплоїдних клітин за розподілом за фазами клітинного циклу ми відзначили високий показник проліферативного пулу $G_2/M+S$, який становить $29,33 \pm 0,19$ %. Пресинтетичний період G_0/G_1 характеризується

перевагою анаболічних процесів у клітинах, які забезпечують анатомічне та функціональне відновлення органел, збільшення каріолеми, маси клітини після поділу, посилення процесів транскрипції, трансляції, синтезу тригерних білків, активаторів S фази клітинного циклу.

Таблиця 3.12

**Розподіл мезенхімних стовбурових клітин культури кісткового мозку різних пасажів культивування за фазами клітинного циклу,
M ± m, n = 5, %**

Культура клітин	G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M	G ₂ /M + S
2-ий пасаж	70,67±2,70	16,46±1,13	12,87±0,99	29,33±0,19
7-ий пасаж	79,67±0,84*	12,77±0,69*	7,56±0,59**	20,33±1,27**
12-ий пасаж	86,10±2,29*	8,20±0,63**	5,70±0,83**	13,90±1,40***

Примітки: * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$, *** – $p < 0,001$ порівняно з клітинами другого пасажу

Завдяки цим білкам клітина проходить точку рестрикції R і спрямовується у S період синтезу ДНК.

Вміст диплоїдних клітин у G₀/G₁ фазі в отриманих нами культурах МСК становив 70,67±2,70 % на другому пасажі культивування

На 7-му пасажі культивування МСК також всі клітини культури були диплоїдні. Кількість клітин проліферативного пулу G₂/M+S достовірно зменшується і становить 20,33±1,27 % ($p < 0,001$). Фаза пресинтетичного періоду G₀/G₁ характеризується збільшенням кількості клітин до 79,67±0,84 % ($p < 0,01$). Ці зміни засвідчують затримку клітин у фазі пресинтетичного періоду і, ймовірно, вони не проходять точку рестрикції для переходу в S–фазу клітинного циклу. Морфологічно в цей період у клітин з'являються чисельні відростки цитоплазми. Вказані зміни характеризують культуру клітин з початковими ознаками старіння.

За 12-го пасажу культивування МСК з кісткового мозку визначено достовірне зниження показника кількості клітин проліферативного пулу ($G_2/M + S$), який становить $13,90 \pm 1,40 \%$ ($p < 0,001$ у порівнянні з другим пасажем). Фаза пресинтетичного періоду G_0/G_1 характеризувалась достовірним збільшенням кількості клітин до $86,10 \pm 2,29 \%$ ($p < 0,01$).

Кількість диплоїдних клітин дещо знижувалась і становила $97,89 \pm 0,43 \%$, що має важливе значення щодо характеристики культури клітин.

Поступове старіння клітинних культур МСК кісткового мозку супроводжувалось підвищенням чутливості до індукції апоптозу в умовах безсироваткового культивування. Відомо, що за таких умов клітини не отримують достатню кількість ростових факторів, що знижує інтенсивність внутрішньоклітинних шляхів передачі сигналів, утворення гомодимерів факторів транскрипції в цитоплазмі, насамперед STAT родини, та перехід цитоплазматичних факторів транскрипції у ядро, що пригнічує експресію анти-апоптичної молекули Bcl-2 на мембрані мітохондрій. У свою чергу знижена експресія Bcl-2 порушує баланс про- і антиапоптотичних білків родини Bcl-2 на поверхні мітохондрій, сприяє «розкриттю» мітохондріальних пор, виходу у цитоплазму каспаз, з їх наступною активацією, що викликає фрагментацію ДНК та власне розвиток апоптотичного процесу.

Як видно з даних табл. 3.13, за 72 години культивування у середовищі без додавання сироватки, стійкість клітин до апоптозу була досить висока. Однак, кількість апоптотичних клітин, визначених за появою гіподіплоїдного піку за протокової цитометрії, значно збільшувалась порівняно з культурами МСК, які містили 20 % фетальної сироватки бичків. Крім того, зі збільшенням кількості пасажів підвищувалась і чутливість клітин до індукції апоптозу: $r = 0,81$; $p = 0,01$. Здатність МСК до синтезу білків, а саме ІЛ-6, навпаки, підвищувалась по мірі культивування МСК.

Таблиця 3.13

**Кількість апоптотичних клітин в культурах МСК червоного кісткового мозку миші різних пасажей залежно від умов культивування,
 $M \pm m, n = 5$**

Умови культивування	Пасаж			
	2-ий	4-ий	7-ий	12-ий
Середовище з додаванням 20 % FBS	1,75±0,21	1,84±0,35	6,07±1,02 [^]	7,10±1,12 [^]
Безсироваткове середовище	14,0±1,74***	19,0±0,58***	20,67±1,55*** [^]	22,67±1,55*** [^]

*Примітки: * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$, *** – $p < 0,001$ порівняно з кількістю апоптотичних клітин за культивування з сироваткою відповідного пасажу; [^] – $p < 0,05$, ^{^^} – $p < 0,01$; ^{^^^} – $p < 0,001$ – порівняно з кількістю апоптотичних клітин у 2-му пасажі*

У якості маркера ми дослідили концентрацію у культуральному середовищі цитокіна ІЛ-6, який є важливим показником функціональної активності МСК та обумовлює суттєвий вплив на стан імунної системи при введенні в організм реципієнтів.

Слід зазначити, що високий рівень секреції ІЛ-6 був притаманний МСК кісткового мозку на усіх пасажах культивування. Однак, якщо на 4-му пасажі вміст ІЛ-6 у культуральному середовищі становив 87,13±4,08 нг/мл, то на 12-му пасажі ми зареєстрували достовірне збільшення секреції – 158,73±2,53 нг/мл ($p = 0,01$). Такі результати знаходяться у контексті раніш отриманих нами даних: із зниженням проліферативної активності клітин підвищується стан їх диференціювання.

Підсумовуючи результати даного підрозділу, одержані дані свідчать про високу функціональну активність отриманих нами мезенхімних

стовбурових клітин кісткового мозку мишей на ранніх етапах культивування (другий – четвертий пасажі) за наступними показниками: висока життєздатність, високі адгезивні властивості, високий проліферативний потенціал, низька чутливість до індукції апоптозу. Такі характеристики відповідають стандартам МСК, запропонованих Міжнародним товариством з клітинної терапії.

Водночас, можна зробити висновок щодо поступового реплікаційного старіння МСК культури кісткового мозку мишей в процесі культивування. Воно проявляється наступними показниками: особливостями морфології клітин: збільшенням об'єму цитоплазми ($r = 0,73$; $p = 0,01$); зниженням ядерно-цитоплазматичного співвідношення ($r = -0,87$; $p = 0,001$); збільшенням кількості виростів цитоплазми; зниженням коефіцієнту проліферації ($p < 0,01$) та життєздатності клітин ($r = -0,70$; $p < 0,05$); поступовим зменшенням кількості клітин у фазах G_2/M і S та відповідним збільшенням кількості клітин у G_0/G_1 фазах клітинного циклу ($p < 0,001$); підвищенням чутливості до апоптозу, індукованому відсутністю факторів росту ($r = 0,81$; $p = 0,001$); збільшенням рівня секреції ІЛ-6 ($p < 0,01$).

Отже, перші характерні ознаки старіння культури стовбурових клітин культури кісткового мозку з'являються вже на 7-му пасажі культивування.

3.1.10. Морфологія та функціональна активність мезенхімних стовбурових клітин культури жирової тканини миші за різних пасажів культивування. На ранніх пасажах культивування стовбурових клітин культури жирової тканини зареєстровано клітини фібробластоподібної морфології переважно з двома, рідко з трьома, видовженими відростками цитоплазми. Ядра мали овальну форму. Біля ядра чітко визначався комплекс Гольджі у вигляді зони просвітлення, який добре виражений у клітин у стані проліферації. Реєстрували також незначну кількість клітин овальної форми і круглим ядром (рис. 3.19).

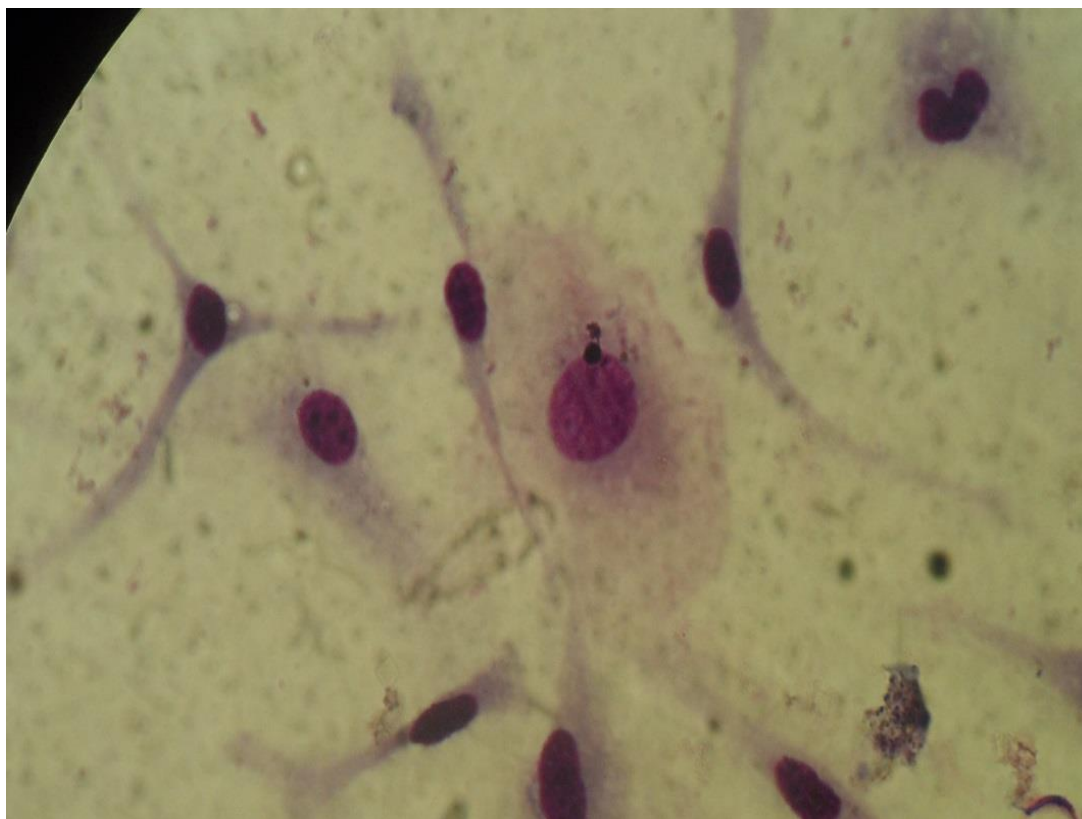


Рис. 3.19. Мезенхімні стовбурові клітини культури жирової тканини миші, другий пасаж. Фарбування за Папенгеймом. Мікропрепарат, $\times 900$.

Як і за культивуванні МСК кісткового мозку, в подальшому морфологія МСК з жирової тканини змінювалася (рис. 3.20).

У клітинах з'являлося більше виростів цитоплазми, вони мали меншу довжину; площа клітини збільшувалась. Це підтверджується морфометричними показниками МСК культури жирової тканини на різних пасажах культивування (табл. 3.14).

Отже, площа ядра на 2-му та 4-му пасажах достовірно не змінювалась, а на 7-му пасажі ми прослідковували тенденцію до її зменшення. На 12-му пасажі нами зареєстровано достовірне зменшення площі ядра до $135,78 \pm 11,21 \mu\text{m}^2$ у порівнянні з такою у МСК 2-го пасажу ($p < 0,05$).

Аналогічно, площа цитоплазми МСК на 2-му та 4-му пасажах не має достовірних відмінностей, на 7-му пасажі ми бачимо тенденцію до її

залежить від багатьох факторів, зокрема від тих, що синтезують і виділяють у середовище культивування самі клітини.

Таблиця 3.14

**Функціональна активність та морфологічні показники
мезенхімних стовбурових клітин культури жирової тканини миші за
різних пасажів культивування, $M \pm m$, $n = 5$**

Параметри	Пасаж			
	2-ий	4-ий	7-ий	12-ий
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 2 8,42	748,11 \pm 25,90	841,56 \pm 46,96	1416,90 \pm 151,97***
ЯЦС	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*

Примітки: * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$, *** – $p < 0,001$ у порівнянні з другим пасажем.

Оскільки первинний матеріал обробляли за новою методикою, можна припустити, що у середовище культивування надійшла значна кількість цитокінів та факторів росту, що і забезпечило високий коефіцієнт проліферації. У процесі культивування швидкість формування моношару зменшується і, на нашу думку, це пояснюється саме зниженням синтезу розчинних стимулюючих факторів, що виділяють самі клітини у середовище культивування. Коефіцієнт проліферації зі збільшенням кількості пасажів

знижується, спочатку у межах тенденції, а на пізніх пасажах – достовірно знижується до $2,55 \pm 0,01$ ($p < 0,001$), хоч і залишається на високому рівні.

Життєздатність МСК культури жирової тканини в процесі культивування сягає високих показників, але зі збільшенням кількості пасажів знижується і на 12-му пасажі становить $84,67 \pm 1,36$ % ($p < 0,05$), хоча і залишається на високому рівні. На нашу думку, це відображає процеси біологічного старіння клітин за культивування *in vitro*.

3.1.11. Клітинний цикл мезенхімних стовбурових клітин культури жирової тканини за різних пасажів культивування. Аналіз показників, отриманих за проточної цитометрії надав можливість оцінити розподіл клітин культур МСК різних пасажів за фазами клітинного циклу і оцінити їх рівень генетичної стабільності. Встановлено, що за умов культивування відбувалися достовірні зміни у розподілі популяції клітин на диплоїдні та анеуплоїдні, а також за фазами клітинного циклу.

Ранні пасажі культури МСК з жирової тканини характеризуються високим вмістом диплоїдних клітин, кількість яких становить на другому пасажі $98,45 \pm 0,39$ % (табл. 3.15). Уміст анеуплоїдних клітин на другому пасажі низький із показником $1,55 \pm 0,43$ %. Це засвідчує сталість каріотипу клітин, що культивуються на ранніх пасажах. Серед диплоїдних клітин зафіксовано високий показник проліферативного пулу $G_2/M+S$, який становить $29,51 \pm 3,56$ %. Уміст диплоїдних клітин у G_0/G_1 фазі становив $70,49 \pm 3,17$ %. Серед анеуплоїдних клітин в у G_0/G_1 фазі зареєстровано $87,35 \pm 1,29$ %, а показник проліферативного пулу $G_2/M+S$ становив $12,65 \pm 1,02$ % (табл. 3.16). Такі дані вказують на затримку анеуплоїдних клітин у фазі репродуктивного спокою G_0 . На 7-му пасажі культивування МСК культури жирової тканини кількість диплоїдних клітин та розподіл клітин за фазами клітинного циклу не має достовірних змін порівняно з клітинами другого пасажу. Отримані дані дають підставу зробити висновок, що у культурі

клітин культури жирової тканини на 7-му пасажі відсутні суттєві ознаки змін, пов'язаних з біологічним віком клітин та впливу на них реагентів під час культивування.

Таблиця 3.15

Вміст диплоїдних клітин та розподіл мезенхімних стовбурових клітин культури жирової тканини за фазами клітинного циклу за різних пасажів культивування, $M \pm m$, $n = 9$, %

Пасаж	Вміст диплоїдів	G_0/G_1	S	G_2/M	$G_2/M + S$
2-й	$98,45 \pm 0,39$	$70,49 \pm 3,17$	$20,58 \pm 1,94$	$8,93 \pm 1,63$	$29,51 \pm 3,56$
7-й	$98,28 \pm 0,56$	$73,52 \pm 5,01$	$17,43 \pm 0,91$	$9,05 \pm 1,16$	$26,15 \pm 0,29$
12-й	$96,51 \pm 0,38^*$	$81,07 \pm 0,61^*$	$13,42 \pm 0,82^*$	$5,51 \pm 0,52$	$18,93 \pm 0,66^*$

Примітки: * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$ – порівняно з показниками 2-го пасажу.

Таблиця 3.16

Вміст анеуплоїдних клітин та розподіл мезенхімних стовбурових клітин культури жирової тканини різних пасажів культивування за фазами клітинного циклу, %, $M \pm m$, $n = 9$

Пасаж	Вміст клітин	G_0/G_1	S	G_2/M	$G_2/M + S$
2-й	$1,55 \pm 0,43$	$87,35 \pm 1,29$	$8,74 \pm 0,47$	$3,91 \pm 0,58$	$12,65 \pm 1,02$
7-й	$1,72 \pm 0,19$	$86,37 \pm 0,93$	$8,12 \pm 0,72$	$5,43 \pm 0,57$	$13,55 \pm 0,31$
12-й	$3,49 \pm 0,38^*$	$88,31 \pm 0,69$	$9,43 \pm 0,62$	$2,26 \pm 0,18$	$11,69 \pm 1,12$

Примітки: * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$ – порівняно з показниками 2-го пасажу.

Зберігаються всі ознаки якісної культури клітин і її можна застосовувати для подальших досліджень.

Зовсім іншу картину ми спостерігали на 12-му пасажі культивування. Уміст диплоїдних клітин у культурі залишався на високому рівні, але достовірно зменшувався від такого на другому пасажі культивування. Фаза спокою G_0/G_1 характеризувалася достовірним підвищенням показника вмісту клітин на 10,58 %. S фаза реплікації ДНК та синтезу гістонів за 12-го пасажу характеризувалася достовірним зниженням показника кількості диплоїдних клітин на 7,38 % порівняно з другим пасажем.

Вміст диплоїдних клітин премітотичної і мітотичної фази G_2/M на 12-му пасажі зменшувався на 3,42 % у межах тенденції, що характеризує зниження проліферативної активності культури. За дисперсійним аналізом кількість пасажів чинить сильний вплив на вміст клітин проліферативного пулу $G_2/M + S$ у культурі. Показник сили впливу пасажування на вміст клітин проліферативного пулу $G_2/M + S$ в культурі становив $\eta^2_x = 70$ % ($p < 0,05$).

Кількість анеуплоїдних клітин достовірно зростала до $3,49 \pm 0,38$ % ($p < 0,05$). Серед анеуплоїдних клітин 12-го пасажу, загальна кількість яких зростала в процесі культивування, вміст клітин G_0/G_1 пулу підвищувався в межах тенденції. Уміст клітин проліферативного пулу $G_2/M + S$, навпаки, знижувався в межах тенденції. На нашу думку, це пов'язано з обмеженням нерегульованого розмноження клітин завдяки дії стимулюючого фактора на рівні точки рестрикції R при переході клітин з фази спокою G_0/G_1 до S періоду.

Стійкість клітин до апоптозу, індукованого культивуванням у безсироватковому середовищі, знижувалась з кількістю пасажів (табл. 3.17).

Достовірне підвищення кількості апоптичних клітин порівняно з клітинами, які знаходились на ранніх етапах культивування (другий пасаж) реєстрували вже на 7-му пасажі – $21,33 \pm 1,36$ ($p < 0,05$), а на 12-му їх кількість зросла ще більше – до $23,67 \pm 0,97$ % ($p < 0,05$).

Таблиця 3.17

**Кількість апоптотичних клітин в культурах МСК жирової
тканини миші різних пасажей залежно від умов культивування,
 $M \pm m, n = 9, \%$**

Умови культивування	Пасаж			
	2-ий	4-ий	7-ий	12-ий
Середовище з 20 % FBS	1,21±0,09	1,48±0,11	2,47±0,75	6,09±1,01
Безсироваткове середовище	14,33± 1,94 ^{^^}	18,67± 0,77 ^{^^}	21,3± 1,36* ^{^^}	23,67± 0,97 * ^{^^}

Примітки: * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$ – порівняно з показниками 2-го пасажу; ^ – $p < 0,05$, ^^ – $p < 0,01$; ^^^ – $p < 0,001$ – порівняно з кількістю апоптотичних клітин за культивування у середовищі з сироваткою

Підсумовуючи результати даного підрозділу, одержані дані свідчать про високу функціональну активність отриманих нами мезенхімних стовбурових клітин з жирової тканини собак на ранніх етапах культивування (другий – четвертий пасажі) за наступними показниками: висока життєздатність, високі адгезивні властивості, високий проліферативний потенціал, низька чутливість до індукції апоптозу. Такі характеристики відповідають стандартам МСК, запропонованих Міжнародним товариством з клітинної терапії.

При тривалому культивуванні МСК з жирової тканини спостерігаються достовірні зміни морфологічних показників клітин, що відображується на їх функціональному стані. Зокрема, на 7-му та 12-му пасажах культивування відбуваються зміни морфології клітин (зниження ядерно-цитоплазматичного співвідношення за рахунок збільшення площі цитоплазми, збільшення кількості виростів цитоплазми), достовірне зниження коефіцієнту проліферації клітин, показників життєздатності, вмісту диплоїдних клітин

проліферативного пулу; підвищення анеуплоїдії та чутливості до індукції апоптозу в умовах безсироваткового культивування. Це свідчить на користь реплікаційного старіння культур та обумовлює доцільність використання у подальших експериментах МСК жирової тканини ранніх, а не пізніх, етапах культивування.

3.1.12. Імунофенотипова характеристика стовбурових клітин культури жирової тканини собаки на різних етапах культивування. Дослідження проведено на культурах МСК жирової тканини собак 4-го та 10-го пасажів. Непрямим імуноферментним методом досліджувались три групи маркерів: білки цитоскелету та міжклітинної адгезії; маркери проліферативної активності клітин; маркери, асоційовані з чутливістю до апоптозу.

Для визначення проліферативної активності клітин застосовували мкАТ Ki-67 і PCNA – класичні маркери проліферації клітин.

Назва мкАТ Ki-67 походить від назви міста, в лабораторії якого воно було отримано (Кіль, Німеччина), та номера лунки у 96-луночній планшеті, де був виявлений оригінальний клон. Ядерний антиген Ki-67 вперше описаний Gerdes і співавторами в 1983 році, він складається з двох поліпептидних ланцюгів з молекулярною масою 345 і 395 кДа. Достеменно роль цього протеїну в процесі клітинного поділу досі остаточно не з'ясована, але відомо що експресія Ki-67 дозволяє виділити клітини, що знаходяться в активній фазі клітинного циклу – G₁, S, G₂ і М фази. Експресія Ki-67 відсутня тільки в G₀ періоді клітинного циклу, тобто коли клітина знаходиться в стані спокою.

Проліферативна активність є провідним фактором біологічної поведінки клітин і це одна з найбільш важливих характеристик фенотипу, яка у значній мірі визначає швидкість росту клітин, їх рухову активність.

МСК культури жирової тканини інтенсивно експресували Ki-67 (рис. 3.21).

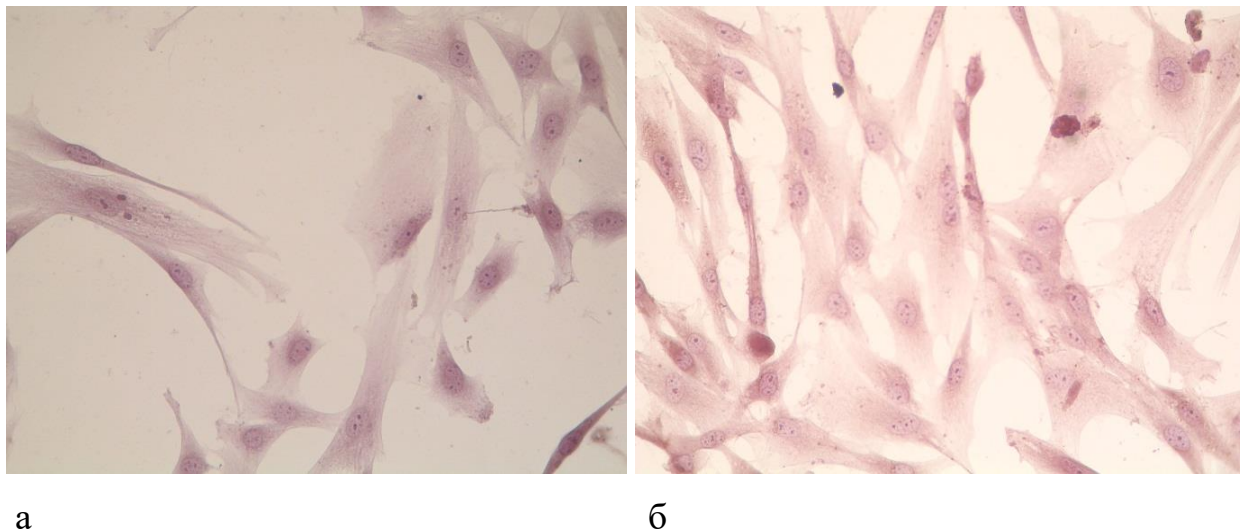


Рис. 3.21. Експресія проліферативного маркера Ki-67 МСК жирової тканини собаки: а – контроль, б – Ki-67-позитивні клітини. Мікропрепарат, $\times 400$.

Ядерний антиген проліферуючих клітин (PCNA) – негістоновий білок, необхідний для синтезу ДНК як допоміжний білок для альфа ДНК-полімерази. Його вміст підвищується у клітинах у G_1/S фазах клітинного циклу. У фазі G_0 і ранній G_1 фазі він не виявляється (рис. 3.22).

Як бачимо з даних таблиці 3.18, проліферативна активність МСК жирової тканини собаки висока як на ранньому, так і на пізньому етапах культивування.

Однак, поступово вона знижується. Так, на четвертому пасажі показник кількості PCNA-позитивних клітин становив $275,0 \pm 9,0$ балів, тоді як на десятому пасажі відбувалося достовірне зниження рівня експресії цього білку до $208,0 \pm 11$ балів, що нижче на 24 % ($p < 0,01$) у порівнянні з 4 пасажем. Також достовірно зменшувалась і кількість Ki-67-позитивних клітин – з $299 \pm 1,0$ до $251,0 \pm 12,0$ балів ($p < 0,05$).

Таблиця 3.18

**Експресія ядерних і цитоплазматичних білків МСК культури
жирової тканини собаки за різних пасажів культивування,
М ± m, n = 3, H-Score, бали**

Антиген	IV пасаж	X 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		
E - 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*

*Примітки: * – p < 0,05; ** – p < 0,01 у порівнянні з 4-м пасажем*

Таким чином, визначення спектру експресії білків поверхневих мембран та ядерних маркерів підтвердив мезенхімне походження отриманих стовбурових клітин, їх високу проліферативну активність, резистентність до індукції апоптозу, високі адгезивні властивості, активний стан Wnt/β-катенін сигнального шляху трансдукції внутрішньоклітинного сигналу.

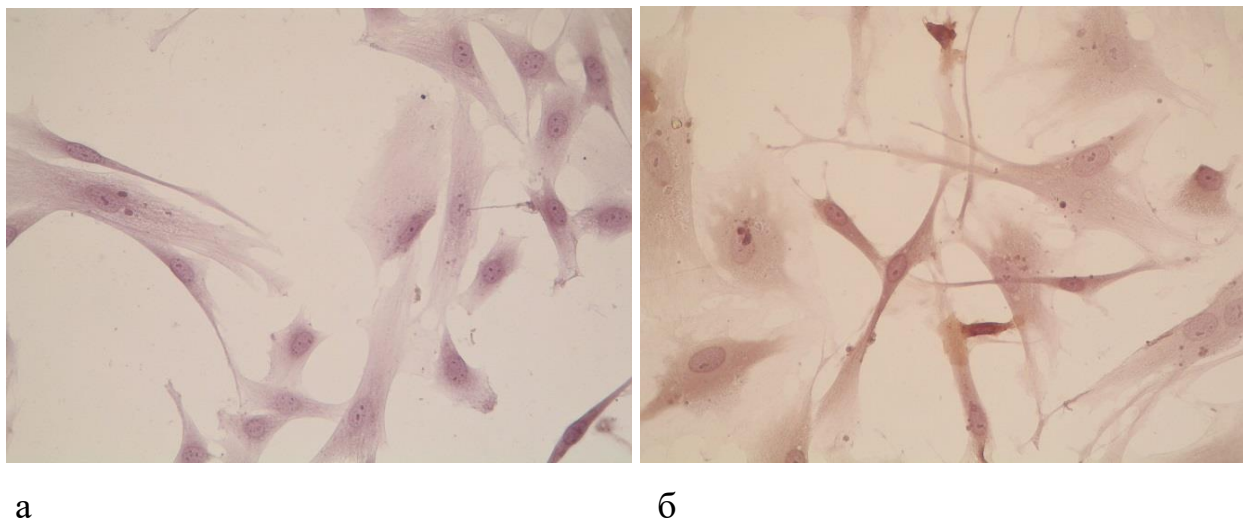


Рис. 3.22. Експресія PCNA у МСК жирової тканини собаки: а – контроль, б – PCNA-позитивні клітини. Мікропрепарат, $\times 400$.

В ході досліджень встановлено достовірний обернений кореляційний зв'язок між кількістю пасажів культури МСК із експресією маркерів проліферації: $r = -0,78$ ($p < 0,05$). Встановлено достовірні обернені кореляційні зв'язки кількості пасажів культури стовбурових клітин із експресією ядерних і цитоплазматичних білків

Для дослідження причинно-наслідкової залежності було проведено дисперсійний аналіз рівня експресії проліферативного маркера Ki-67 стовбурових клітин за різних пасажів культивування.

Було визначено, що $\eta^2=0,83$, що характеризує достовірний вплив процесу культивування МСК культури жирової тканини собаки *in vitro* на показник експресії проліферативного маркера Ki-67, який з кількістю пасажів знижувався. Зі збільшенням тривалості культивування експресія більшості визначених антигенів знижувалась. (табл. 3.19).

Отримані дані узгоджуються з раніш отриманими нами даними протокової цитофлуориметрії щодо високої проліферативної активності МСК.

Серед білків адгезії досліджували Е - кадгерин, N – кадгерин, β -катенін і антиген CD44.

Таблиця 3.19

Вплив пасажування культури на імунофенотип стовбурових клітин культури жирової тканини собаки η^2 ; n = 3

Досліджуваний антиген	Сила впливу, η^2
Віментин	0,73*
Актин	0,79*
Е-кадгерин	0,87**
CD44	0,74*
Ki-67	0,83*
PCNA	0,83*

Примітка: * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$.

Е-кадгерин відноситься до родини трансмембранних глікопротеїнів, що забезпечують кальцій-залежне гомологічне з'єднання клітин в тканинах. Прикріплення цитоплазматичного домена Е-кадгерину до актинового цитоскелету клітини здійснюється білком β -катеніном через білок α -катенін. β -катенін, крім адгезійної, виконує в клітині ще і важливу сигнальну функцію, бере участь у процесах проліферації, диференціювання, міграції клітин, і є ключовим білком Wnt-сигнального шляху – ланцюга сигнальних механізмів, який задіяний у процесах проліферації та диференціації стовбурових клітин.

Рівень експресії Е-кадгерину на четвертому пасажі сягає максимальних значень і на десятому його кількість достовірно знижується ($p < 0,01$) (рис. 3.23).

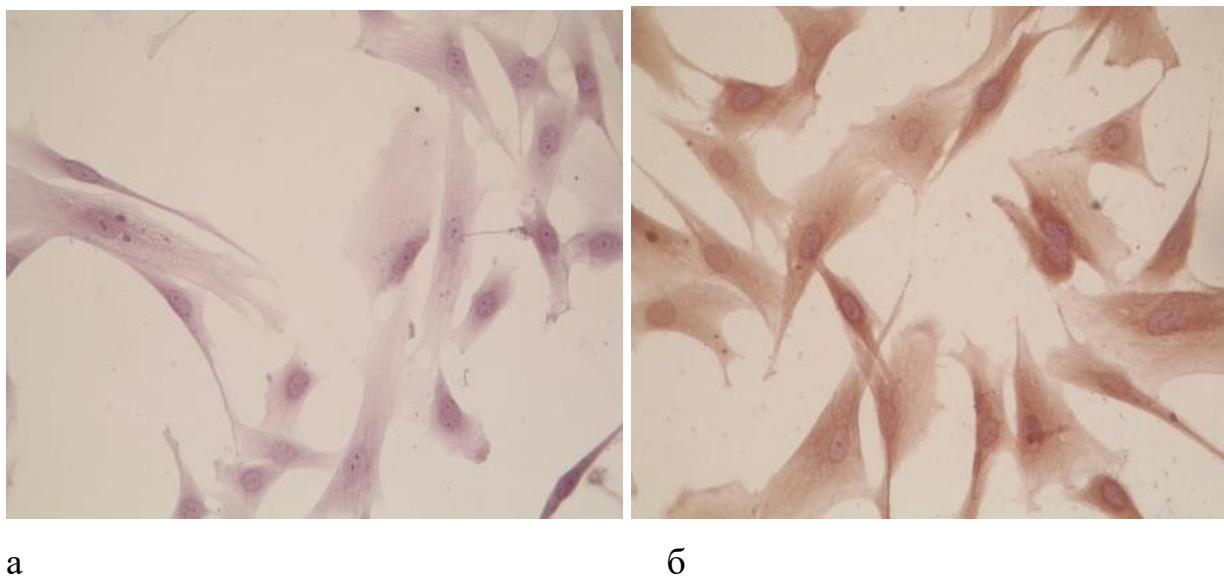


Рис. 3.23. Експресія Е-кадгерину МСК культури жирової тканини собаки: а – контроль, б – експресія Е-кадгерину. Мікропрепарат, × 400.

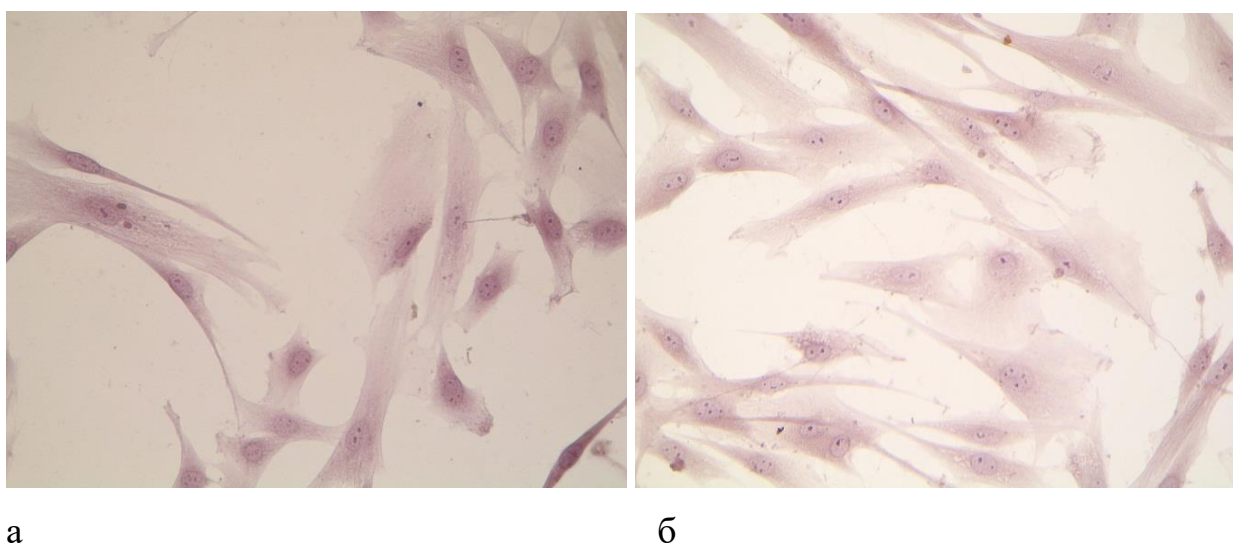


Рис. 3.24. Результати експресії N - кадгерину МСК жирової тканини собаки: а – контроль, б – N - кадгерин-негативні клітини. Мікропрепарат, × 400.

N - кадгерин, як маркер нейральних клітин не реєструвався на МСК культури жирової тканини (рис.3.24).

Експресія β -катеніну, яка визначалась переважно у ядрі клітин, свідчить про активний стан β -катенін-опосередкованої експресії, тобто активацію Wnt/ β -катенін сигнального шляху (рис. 3.25).

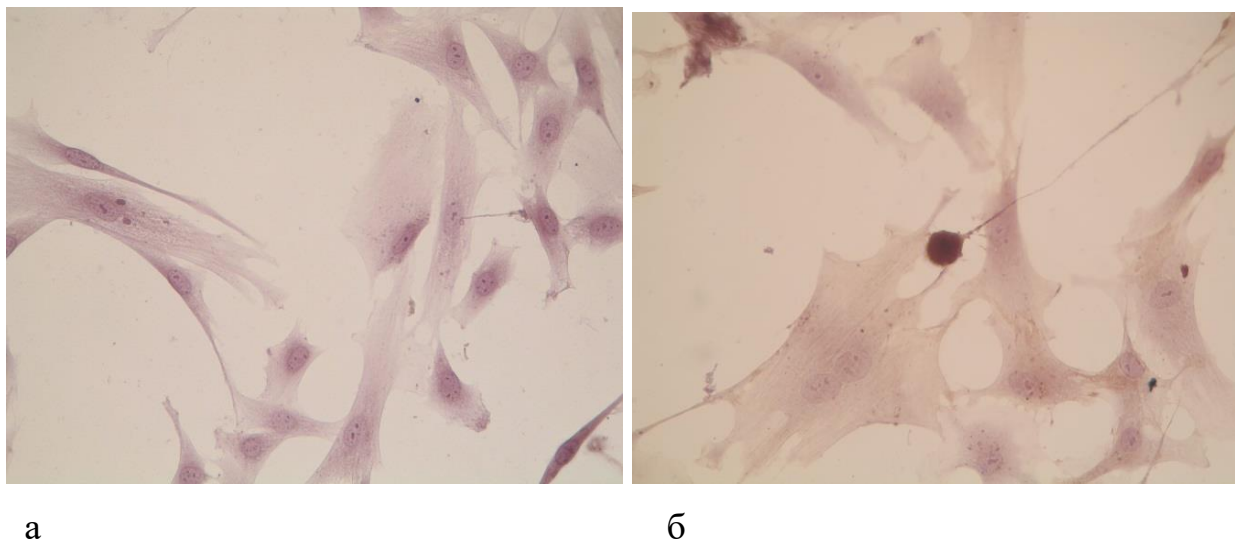


Рис. 3.25. Результати експресії β -катеніну МСК культури жирової тканини: а – контроль, б – експресія β -катеніну. Мікропрепарат, $\times 400$.

Маркер Bcl-2 є відомим антигеном, асоційованим з пригніченням процесів апоптозу у багатьох клітинних системах, включаючи лімфогематопоеичні, нейрональні клітини. Він регулює клітинну загибель, є основним фактором стабільності мітохондріальних мембран, попереджає порушення їх цілісності за дії про-апоптотичних факторів контролюючи проникність мітохондріальної мембрани. Пригнічує каспази, формування апоптосом і власно розвиток апоптозу за рахунок запобігання виходу цитохрому С з мітохондрій і/або зв'язуючи фактор, що активує апоптоз - АРАF1.

Рівень експресії Bcl-2 був високим на четвертому пасажі $103,67 \pm 6,78$ балів і знижувався в клітинах на 10-му пасажі до $66,67 \pm 5,03$ балів; ($p < 0,05$), (рис. 3.26), що засвідчує резистентність клітин до індукції апоптозу.

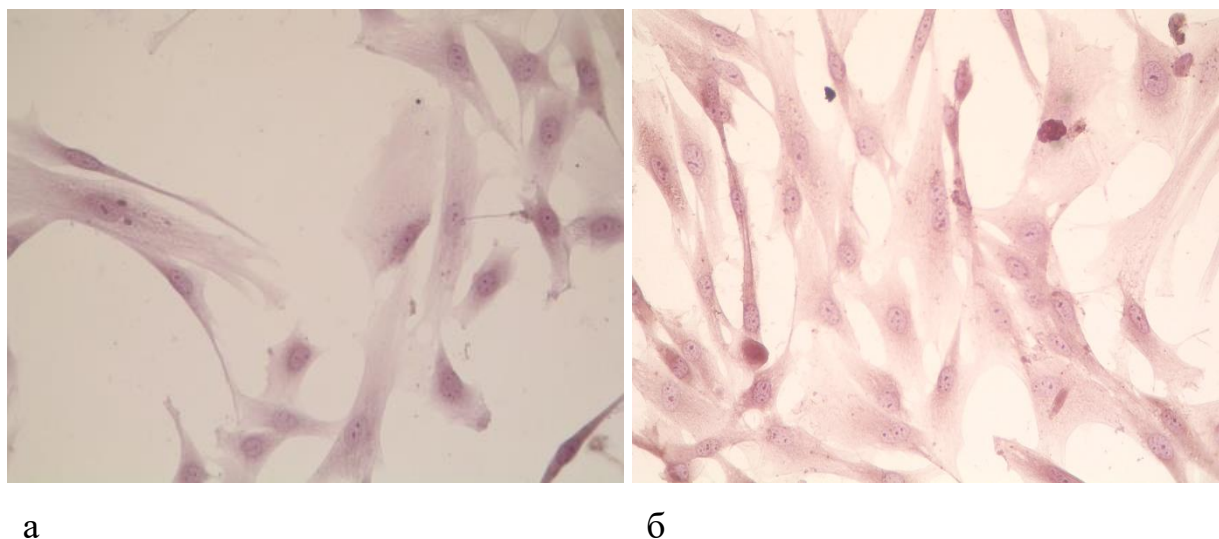


Рис. 3.26. Експресія Bcl-2 МСК культури жирової тканини собаки: а – контроль, б – експресія Bcl-2. Мікропрепарат, $\times 400$.

Ці дані показують чітку кореляцію з підвищенням чутливості до індукції апоптозу в умовах безсироваткового культивування в культурах МСК на пізніх етапах культивування. Відомо, що за таких умов клітини не отримують достатню кількість ростових факторів, що пригнічує експресію анти-апоптичної молекули Bcl-2 на мембрані мітохондрій. У свою чергу знижена експресія Bcl-2 сприяє «розкриттю» мітохондріальних пор, виходу у цитоплазму каспаз, з їх наступною активацією, що викликає фрагментацію ДНК та власне розвиток апоптотичного процесу.

Що ж до показника експресії β - катеніну, то він виявляється в ядрах більшості клітин, що свідчить про його знаходження у стабільному стані та участь в процесах регуляції структури цитоскелету та активації фактора транскрипції Wnt. Рівень експресії β - катеніна у МСК помірний і дорівнює 98 ± 9 балів в клітинах 4-го пасажу, достовірно знижуючись до 64 ± 4 балів в клітинах 10-го пасажу ($p < 0,05$).

У цілому, ці дані засвідчують на користь активного стану Wnt / β -катенін сигнального шляху трансдукції внутрішньоклітинного сигналу у МСК з жирової тканини, особливо на ранніх стадіях культивування.

Антиген CD44 експресується на поверхневих мембранах багатьох типів клітин та відіграє роль у міжклітинній взаємодії; відомий як рецептор гіалуронової кислоти. За даними окремих авторів, також може виконувати роль рецептора колагену і позаклітинних металопротеїназ. Його помірна експресія виявлена у МСК культури жирової тканини та знижувалась у процесі культивування.

3.1.13. Імунофенотипова характеристика стовбурових клітин культури нервової тканини кота за різних пасажів культивування. Для визначення антигенного спектру клітин культури нервової тканини досліджували культури 2-го і 4-го пасажів. Методом імуноцитохімічного аналізу було досліджено експресію білків цитоскелету та міжклітинної адгезії, антиген PCNA як показник проліферативної активності клітин. Результати дослідження наведено у таблиці 3.20.

Таблиця 3.20

Порівняльна експресія ядерних і цитоплазматичних білків МСК нервової тканини кота різних пасажів, H-Score, бали ($M \pm m$, $n = 3$)

Антиген	Другий пасаж	Четвертий пасаж
Е-кадгерин	$122,3 \pm 10,1$	$96,0 \pm 5,8^*$
N-кадгерин	$84,0 \pm 7,6$	$79,3 \pm 9,4$
β -катенін	$73,0 \pm 1,6^*$	$54,0 \pm 4,6$
CD44	$77,0 \pm 1,6^{**}$	$28,3 \pm 2,5^{**}$
Віментин	$299,1 \pm 2,6^*$	$247,7 \pm 7,2^*$
Актин	$130,7 \pm 16,7^*$	$91,0 \pm 8,7^*$
PCNA	$96,0 \pm 6,6$	$74,2 \pm 4,1$

*Примітки: * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$ у порівнянні з 4-м пасажем*

Експресія віментину підтверджує мезенхімальне походження отриманих СК з нервової тканини, а актину – процеси адгезії до поверхні культурального посуду, міграційну активність клітин. Характерним маркером мезенхімних клітин є віментин. Це білок групи проміжних філаментів цитоскелета клітини. Як і очікувалось, в культурах МСК переважали позитивні клітини із високим рівнем експресії цього білку. Порівняно з клітинами 4-го пасажу ($265,7 \pm 20,7$ балів), рівень експресії знижувався до $189 \pm 13,4$ балів у клітинах 10-го пасажу ($p < 0,05$). Така зміна експресії свідчить на користь зниження рівня клітинної адгезії, проліферації, клітинної сигналізації і процесів міграції зі збільшенням кількості пасажів.

Нами встановлено середній рівень експресії в цитоплазмі СК культури нервової тканини актину – глобулярного білка, основного компонента мікрофіламентів, що пронизують цитоплазму клітин і служать її опорним скелетом. Максимальний рівень експресії актину був на другому пасажі та становив $130,7 \pm 16,7$ балів і знижувався 4-му пасажі до $98,3 \pm 2,8$ балів ($p < 0,05$). Значною мірою така активність актину обумовлена культивуванням клітин на субстраті. Актин є необхідним для прикріплення клітин до поверхні культурального посуду, розпластування клітин, а також їх рухової активності. Швидкість формування моношару у культурі залежить від швидкості полімеризації актину, формування актоміозинових комплексів та їх скорочення.

Як ми бачимо, найбільш інтенсивно експресувались віментин – білок проміжних філаментів (рис. 3.27) і актин – компонент мікрофіламентів (рис. 3.28). Експресія β -катеніну, яка визначалась переважно у ядрі клітин, свідчить про активний стан β -катенін-опосередкованої експресії, тобто активацію Wnt / β -катенін сигнального шляху (рис. 3.29).

Таким чином, за більшістю показників антигенний спектр СК культур нейральної і жирової тканин співпадав, однак експресія окремих антигенів

(PCNA, E – кадгерину, актину) була нижча в стовбурових клітинах культури нервової тканини.

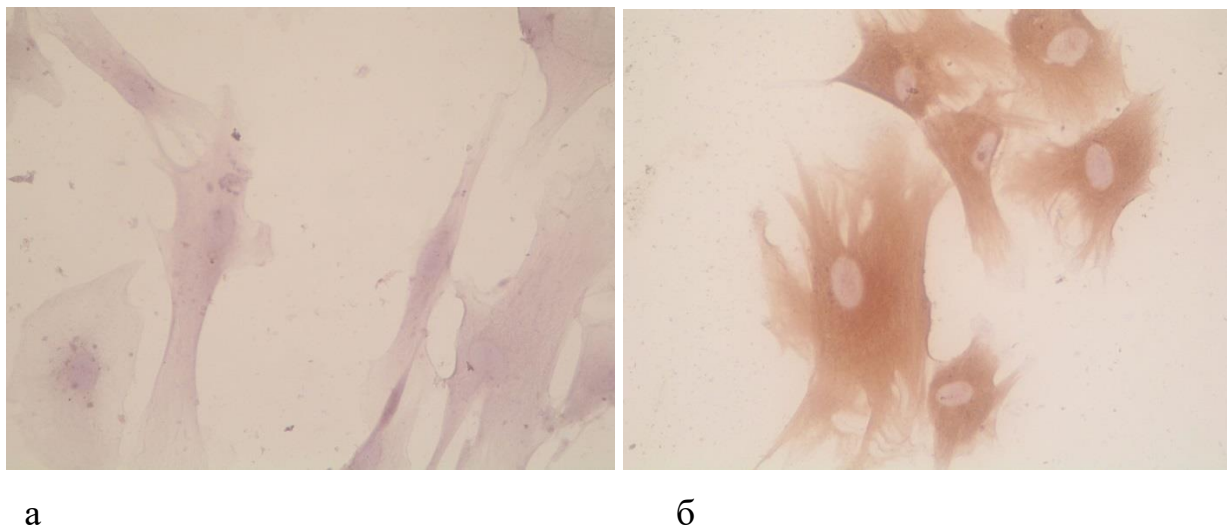


Рис. 3.27. Експресія віментину в цитоплазмі СК культури нервової тканини kota, а – контроль, б – експресія віментину. Мікропрепарат, $\times 400$.

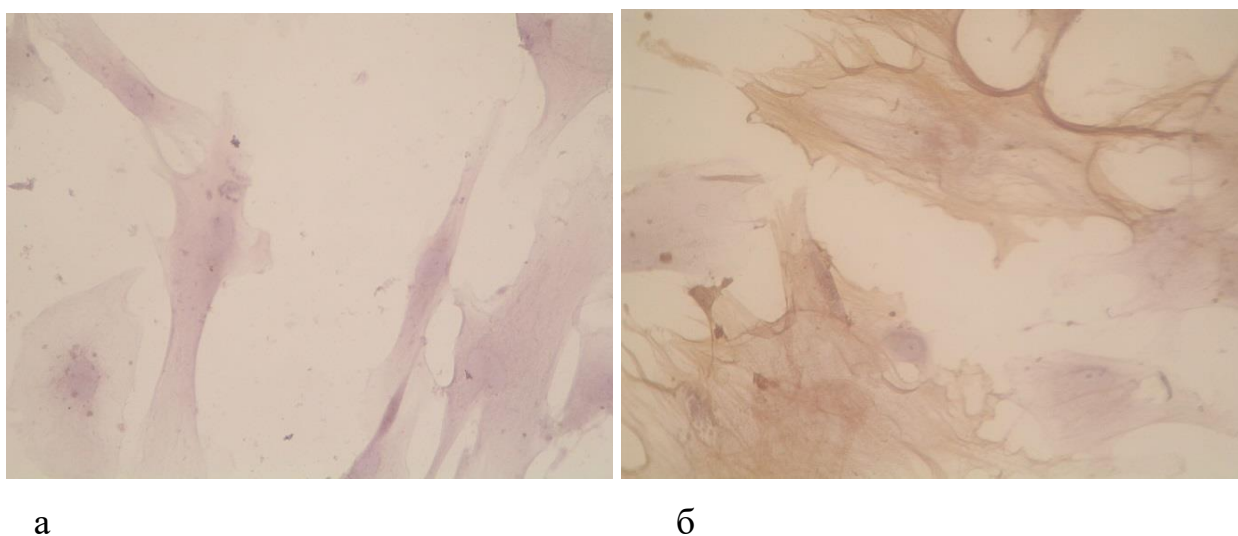


Рис. 3.28. Експресія актину в цитоплазмі СК культури нервової тканини kota, а – контроль, б – експресія актину. Мікропрепарат, $\times 400$.

Розбіжності були виявлені за експресією N-кадгерину, який визначався в стовбурових клітинах культури нервової тканини, що є їх характерною ознакою, та був відсутній в МСК культури жирової тканини (рис. 3.30). Зі

збільшенням тривалості культивування експресія майже усіх визначених антигенів знижувалась.

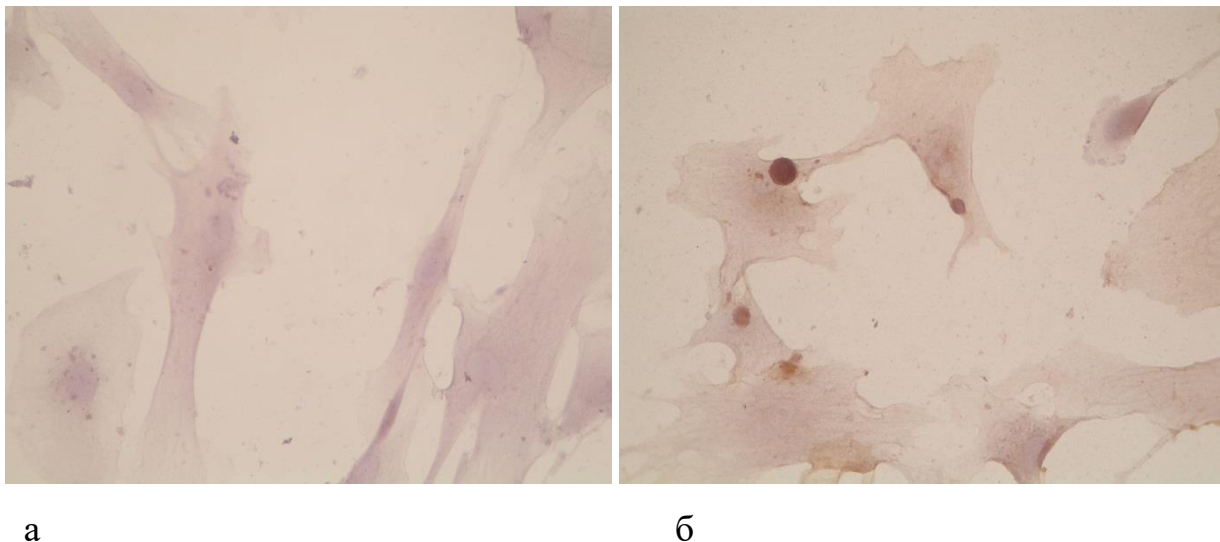


Рис. 3.29. Експресія β -катеніну в ядрах СК культури нервової тканини kota, а – контроль, б – експресія β -катеніну. Мікропрепарат, $\times 400$.

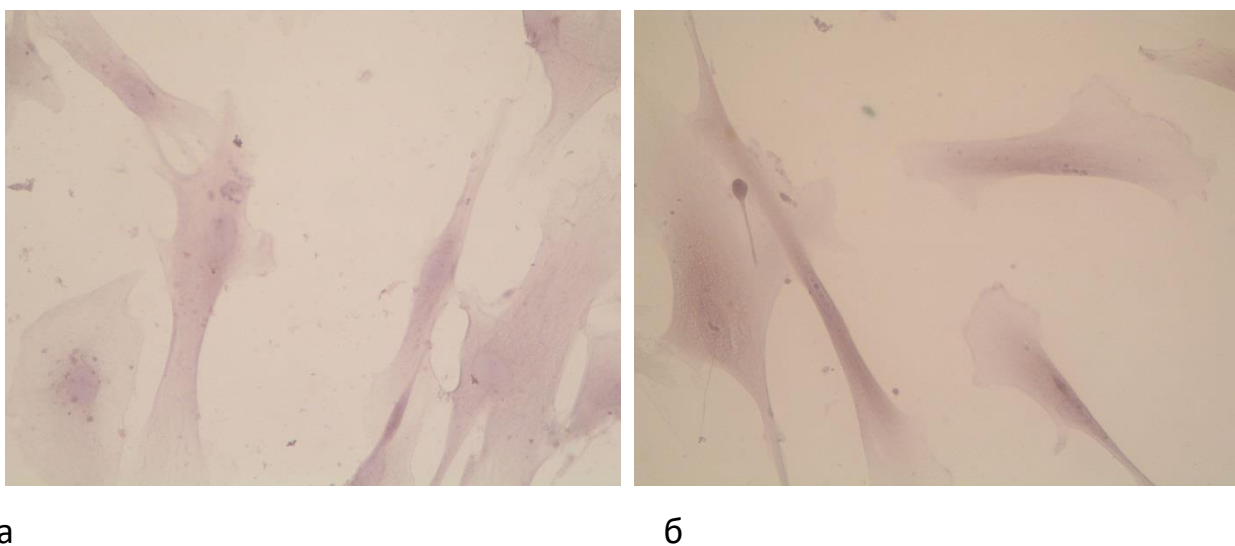


Рис. 3.30. Експресія N- кадгерину СК культури нервової тканини kota, а – контроль, б – експресія N – кадгерину. Мікропрепарат, $\times 400$.

Підсумовуючи результати даного підрозділу, можна зробити висновок що в СК культури нервової тканини визначена експресія більшості антигенів,

які притаманні саме стовбуровим клітинам і активний стан Wnt/ β -катенін сигнального шляху трансдукції внутрішньоклітинного сигналу. За більшістю показників антигенний спектр СК культур нервової і жирової тканин співпадав.

3.1.14. Імунофенотипова характеристика мультипотентних стовбурових клітин кісткового мозку мишей на різних етапах культивування. У культурах першого та четвертого пасажів МСК кісткового мозку мишей методом прямого імунофлуоресцентного аналізу було досліджено експресію маркерів, які зазвичай асоціюються з фракцією стовбурових клітин – антигенів CD34, CD90 і CD117.

Антиген CD117 є рецептором фактору росту стовбурових клітин та тучних клітин (мастоцитів). Відомий також як протоонкоген c-kit, або тирозин протеїн кіназа c-kit. Експресується на поліпотентних стовбурових клітинах різного походження.

Антиген CD34 – трансмембранний фосфоглікопротеїн, який бере участь у міжклітинній адгезії. Присутній на поверхні стовбурових клітин гемопоетичного і мезенхімного походження.

Функція антигену CD90 остаточно невідома. Передбачають, що він бере участь у процесах міжклітинної адгезії. Експресія знайдена на широкому колі клітин, включаючи і МСК.

Як видно з даних рис. 3.31 експресія вказаних антигенів на першому пасажі спостерігалась на 12-15 % МСК та становила $15,42 \pm 0,05$ % при визначенні антигену CD34; $15,68 \pm 0,04$ % при визначенні антигену CD117 і $12,21 \pm 0,03$ % при визначенні антигену CD90.

Більшість клітин у культурі були негативними. Ми вважаємо, що це свідчить про існування в культурах різних за ступенем диференціювання та поліпотентності клітин, тобто, існування власно фракції стовбурових клітин та їх більш диференційованих нащадків.

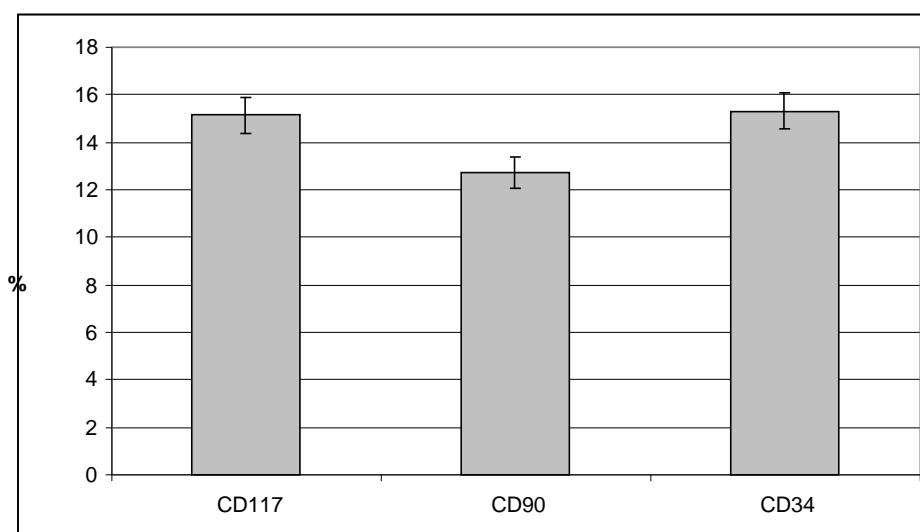


Рис. 3.31. Експресія антигенів CD34, CD90 і CD117 на мезенхімних стовбурових клітинах культури червоного кісткового мозку першого пасажу.

На четвертому пасажі культивуванні кількість $CD34^{+}$ та $CD117^{+}$ клітин достовірно знижувалась 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) (рис. 3.32, 3.33). Тоді, як кількість $CD90^{+}$ клітин зростала до $47,5 \pm 0,06$ % ($p < 0,001$). Таким чином, отримані результати підтвердили низький рівень експресії антигенів CD34 і CD117 на мезенхімних стовбурових клітинах, на відміну від стовбурових клітин гемопоетичного походження.

Підібні дані були отримані 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.

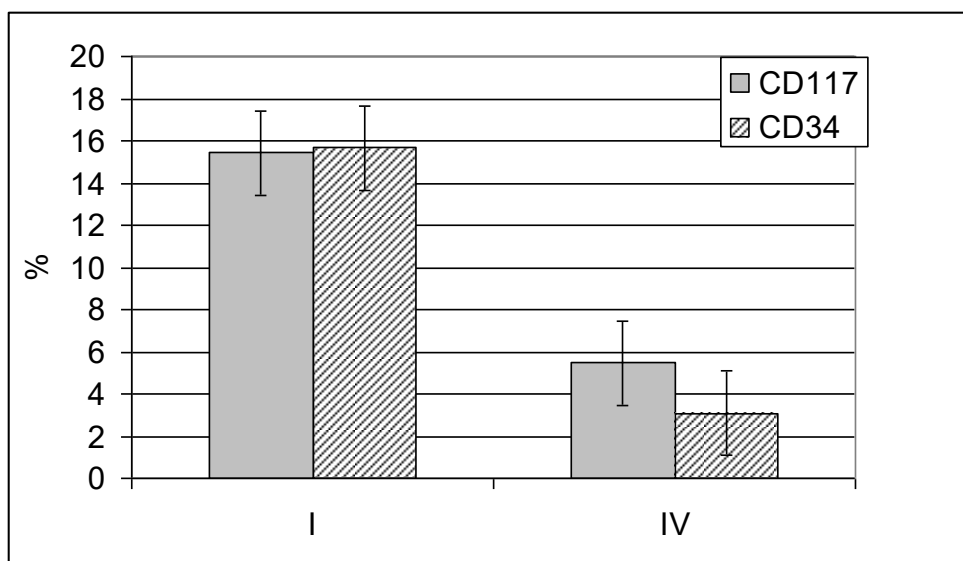


Рис. 3.32. Експресія антигенів CD34 і CD117 на МСК кісткового мозку мишей першого (I) та четвертого (IV) пасажів.

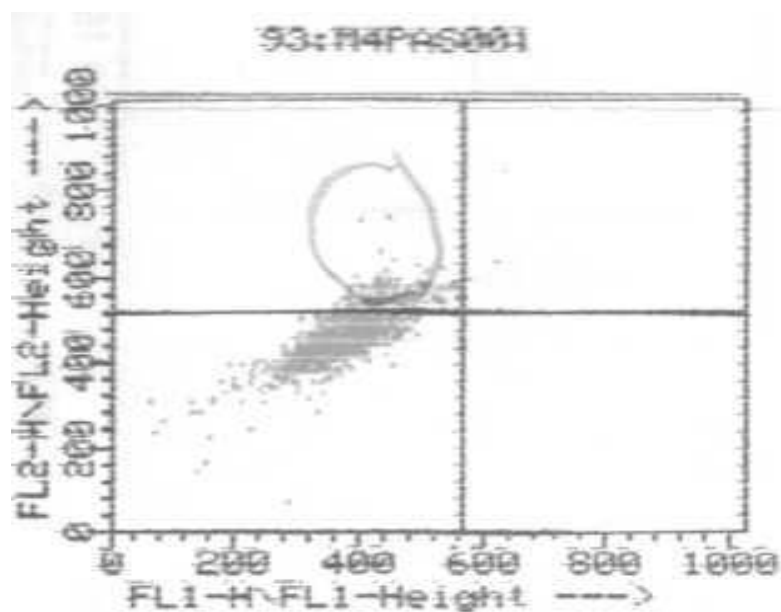


Рис. 3.33. Гістограма. CD117 (позитивні за PE) на МСК культури кісткового мозку мишей першого пасажу. Нижній лівий квадрант: % популяції клітин, негативних за флюорофорами FITS та PE; нижній правий квадрант: % популяції клітин, позитивних тільки за флюорофором FITS; верхній лівий квадрант: % популяції клітин, позитивних за флюорофором

PE; верхній правий квадрант: % популяції клітин, позитивних за флюорофорами FITS та PE.

3.1.15. Жирнокислотний склад ліпідів мультипотентних стовбурових клітин культури кісткового мозку, жирової та нервової тканин. Вміст жирних кислот визначали в СК культури кісткового мозку, нервової та жирової тканини методом газорідинної хроматографії. Використовували клітини ранніх пасажів – 10-12 доби культивування.

Отримані мезенхімні стовбурові клітини культури червоного кісткового мозку досліджували на вміст жирних кислот. У спектрі жирних кислот МСК культури червоного кісткового мозку виявлено коротко-, середньо- та довголанцюгові жирні кислоти (рис. 3.34, табл. 3.21).

Насичені жирні кислоти (НЖК) екстрактів ліпідів мезенхімних стовбурових клітин червоного кісткового мозку були представлені в діапазоні від C6:0 до C18:0.

Їх уміст у екстракті зростає у ряду в наступній послідовності: C15:0 < C8:0 < C6:0 < C10:0 < C12:0 < C18:0 < C14:0 < C16:0. Звертає на себе увагу наявність в біологічному матеріалі пентадеканової кислоти, яка відноситься до жирних кислот з непарною кількістю атомів вуглецю в ланцюгу. Значення C15:0 для організму недостатньо вивчене, хоча її визначають у різних біологічних об'єктах, в тому числі і у молоці корів.

Із групи НЖК у кількісному відношенні переважає пальмітинова кислота, яка в середньому становить 32,46 % від суми всіх жирних кислот.

Міристинова і стеаринова кислоти становлять відповідно 10,92 та 10,59 %. Четверте місце за кількістю серед насичених жирних кислот займає лауринова кислота 3,20 %.

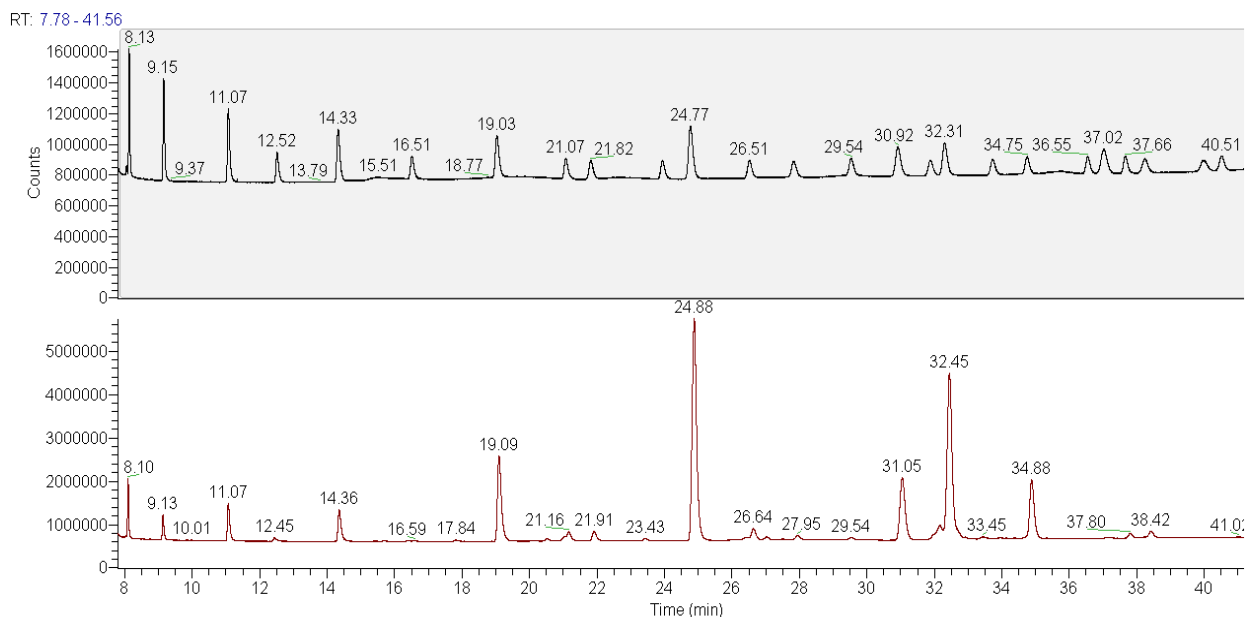


Рис. 3.34. Хроматограма жирнокислотного складу ліпідів стандарту (а – верхня – стандарт) та ліпідів МСК культури кісткового мозку (б – нижня – проба).

Уміст моноєнових жирних кислот у екстрактах мезенхімних стовбурових клітин червоного кісткового мозку зростала в ряду в наступному порядку: $C_{20:1} < C_{16:1n9c} < C_{18:1n9c}$. Причому, вміст олеїнової кислоти складав $23,15 \pm 0,05$ % від загальної кількості виявлених кислот, а цис-11-ейкозенової – $0,99 \pm 0,01$ %.

Відстовковий уміст поліненасичених жирних кислот у екстрактах мезенхімних стовбурових клітин культури червоного кісткового мозку підвищувався в ряду в наступному порядку: $C_{20:3n6} < C_{20:2n6} < C_{20:4n6} < C_{22:6n3} < C_{22:5n3} < C_{20:3n3} < C_{18:2n6c}$.

Серед полієнових ННЖК переважає лінолева – 8,51 %, найнижчий вміст спостерігався у цис-8, 11, 14-ейкозатрієнової кислоти – 0,01 %. Сумарний рівень НЖК вищий за сумарний рівень ННЖК, коефіцієнт насиченості становить 1,85. Загальна кількість НЖК у досліджуваних зразках становила 64,88 %, тоді як ННЖК – 35,12 %.

Таблиця 3.21

**Уміст жирних кислот у ліпідах мезенхімних стовбурових клітин
культури червоного кісткового мозку, $M \pm m$, $n = 3$, %**

Найменування показників	Масова частка жирної кислоти,
Масляна кислота (C6:0)	$2,22 \pm 0,02$
Каприлова кислота (C8:0)	$1,36 \pm 0,01$
Капринова кислота (C10:0)	$2,90 \pm 0,01$
Лауринова кислота (C12:0)	$3,20 \pm 0,02$
Міристинова кислота (C14:0)	$10,92 \pm 0,06$
Пентадеканова кислота (C15:0)	$1,27 \pm 0,01$
Пальмітинова кислота (C16:0)	$32,46 \pm 0,05$
Пальмітолеїнова кислота (C16:1n9c)	$1,58 \pm 0,01$
Стеаринова кислота (C18:0)	$10,59 \pm 0,07$
Олеїнова кислота (C18:1n9c)	$23,15 \pm 0,05$
Лінолева кислота (C18:2n6c)	$8,51 \pm 0,04$
Цис-11-ейкозенова кислота (C20:1)	$0,99 \pm 0,01$
Цис-11, 14-ейкозадієнова кислота (C20:2n6)	$0,06 \pm 0,01$
Цис-8, 11, 14-ейкозатрієнова кислота (C20:3n6)	$0,01 \pm 0,00$
Цис -11, 14, 17-ейкозатрієнова кислота (C20:3n3)	$0,31 \pm 0,01$
Цис-5, 8, 11, 14-ейкозатетраєнова кислота (арахідонова) (C20:4n6)	$0,12 \pm 0,01$
Цис-7, 10, 13, 16, 19-докозапентаєнова кислота (C22:5n3)	$0,25 \pm 0,02$
Цис-4, 7, 10, 13, 16, 19-докозагесаєнова кислота (C22:6n3)	$0,15 \pm 0,01$
Σ НЖК	$64,88 \pm 0,02$
Σ ННЖК	$35,12 \pm 0,02$
НЖК /ННЖК	1,85
Σ Моноєнові НЖК	$25,71 \pm 0,02$
Σ Полієнові ННЖК	$9,41 \pm 0,02$
n 3/ n 6	0,08

Моноєнові жирні кислоти визначено у кількості 25,71 % , а полієнові – 9,41 %.

Слід відмітити, що трансізомери жирних кислот у МСК кота відсутні. Наявність у харчових продуктах транс-ізомерів ненасичених жирних кислот давно пов'язують із негативним впливом на організм.

Серед омега-6 кислот у досліджених зразках переважала лінолева кислота, середній вміст якої становив $8,51 \pm 0,04\%$; виявлено також ейкозодієнову, ейкозотрієнову та докозагексаєнову кислоти.

Серед омега-3 кислот виявлено цис-11, 14, 17-ейкозатрієнову, цис-7, 10, 13, 16, 19-докозапентаєнову та цис-4, 7, 10, 13, 16, 19-докозагесаєнову кислоту. Серед омега-6 кислот встановлено наявність лінолевої, цис-11, 14-ейкозадієнової, цис-8, 11, 14-ейкозатрієнової та арахідонової кислоти. Індекс співвідношення поліненасичених жирних кислот $n3$ до $n6$ становить 0,08.

Таким чином, у складі ліпідів мезенхімних стовбурових клітин культури червоного кісткового мозку виявлено 18 жирних кислот, із насичених – найбільше пальмітинової кислоти (32,46 %), із мононенасичених – олеїнової кислоти (23,15 %), з поліненасичених – лінолевої кислоти (8,51 %). Найменший вміст у складі клітин виявлено цис-8, 11, 14-ейкозатрієнової кислоти (0,01 %). Сумарна кількість насичених жирних кислот становила 64,88 %, ненасичених жирних кислот – 35,12 %. Моноєнові жирні кислоти складала 25,71%, а полієнові – 9,41 %. Індекс співвідношення поліненасичених жирних кислот $n3$ до $n6$ в мезенхімних стовбурових клітин культури кісткового мозку становить 0,08.

Уміст жирних кислот у ліпідах стовбурових клітин культури нервової тканини.

За результатами газорідинної хроматографії в ліпідах стовбурових клітин культури нервової тканини головного мозку кота виявлено коротко-, середньо- та довголанцюгові жирні кислоти.

Насичені жирні кислоти екстрактів ліпідів стовбурових клітин культури нервової тканини головного мозку були представлені в діапазоні від C6:0 до C18:0 (табл. 3.22). Їх вміст у екстракті зростав у ряді в наступному порядку: C8:0 < C15:0 < C6:0 < C10:0 < C12:0 < C14:0 < C18:0 < C16:0.

Серед НЖК у кількісному відношенні переважала C16:0, яка в середньому становила $34,53 \pm 0,58$ % від суми всіх жирних кислот. Уміст C18:0 і C14:0 становив відповідно $13,45 \pm 0,06$ % та $9,88 \pm 0,06$ %.

Четверте місце за кількістю серед насичених жирних кислот займала лауринова кислота (C12:0) – 3,07 %. Відомо, що вона, на відміну від попередніх, знижує концентрацію холестерину в крові, та володіє тромбогенними властивостями.

Уміст моноєнових жирних кислот у екстракті фетальних стовбурових клітин kota зростав у ряду в такій послідовності: C20:1 < C16:1n9c < C18:1n9c. Причому, вміст C18:1n9c складав $20,20 \pm 0,93$ % від загальної кількості виявлених кислот, а C20:1 – $0,95 \pm 0,05$ %.

Уміст поліненасичених жирних кислот у екстрактах фетальних стовбурових клітин kota підвищувався в ряду в наступній послідовності: C20:3n6 < C20:2n6 < C22:2n6 < C20:3n3 < C22:6n3 < C22:5n3 < C18:2n6c. Серед полієнових ННЖК переважала C18:2n6c, вміст якої становить $6,27 \pm 0,01$ %, найнижчий вміст спостерігався C20: 3n6 – $0,03 \pm 0,01$ %.

Сумарний рівень НЖК вищий такого ННЖК, коефіцієнт насиченості становив 2,10.

Загальна кількість НЖК у досліджуваних зразках становила 67,75 %, тоді як ННЖК – 32,25 %. Моноєнові жирні кислоти визначено у кількості 23,19 %, а полієнові – 9,41 %.

Транс-ізомери жирних кислот у стовбурових клітинах культури нервової тканини головного мозку відсутні.

Таблиця 3.22

**Уміст жирних кислот у ліпідах стовбурових клітин культури нервової
тканини, $M \pm m$, $n = 3$, %**

Найменування показників	Масова частка жирної кислоти,
Масляна кислота (C6:0)	$1,87 \pm 0,05$
Капронова кислота(C8:0)	$1,21 \pm 0,05$
Капринова кислота (C10:0)	$2,28 \pm 0,08$
Лауринова кислота (C12:0)	$3,07 \pm 0,08$
Міристинова кислота (C14:0)	$9,88 \pm 0,06$
Пентадеканова кислота (C15:0)	$1,51 \pm 0,01$
Пальмітинова кислота (C16:0)	$34,53 \pm 0,58$
Пальмітолеїнова кислота (C16:1n9c)	$2,04 \pm 0,04$
Стеаринова кислота (C18:0)	$13,45 \pm 0,06$
Олеїнова кислота (C18:1n9c)	$20,20 \pm 0,93$
Лінолева кислота (C18:2n6c)	$6,27 \pm 0,01$
Ціс-11-ейкозенова кислота (C20:1)	$0,95 \pm 0,05$
Ціс-11, 14-ейкозадієнова кислота (C20:2n6)	$0,05 \pm 0,01$
Ціс-8, 11, 14-ейкозатрієнова кислота (C20:3n6)	$0,03 \pm 0,01$
Ціс-11, 14, 17-ейкозатрієнова кислота (C20:3n3)	$0,55 \pm 0,03$
Ціс-13, 16-докозадієнова кислота (C22:2n6)	$0,52 \pm 0,00$
Ціс-7, 10, 13, 16, 19-докозапентаєнова кислота (C22:5n3)	$1,07 \pm 0,06$
Ціс-4, 7, 10, 13,16,19-докозагексаєнова кислота (C22:6n3)	$0,58 \pm 0,01$
Σ НЖК, %	$67,75 \pm 0,02$
Σ ННЖК, %	$32,25 \pm 0,02$
НЖК/ННЖК	2,10
Σ Моноєнові ННЖК, %	$23,19 \pm 0,02$
Σ Полієнові ННЖК, %	$9,06 \pm 0,02$
Омега 3/ омега 6	0,35

Варто зазначити, що наявність у харчових продуктах транс-ізомерів ненасичених жирних кислот давно пов'язують із негативним впливом на організм.

Доведено, що транс-жирні кислоти суттєво підвищують імовірність виникнення серцево-судинних захворювань.

Серед омега-6 кислот у досліджених зразках переважала лінолева кислота, середній вміст якої становив $6,27 \pm 0,01$ %; виявлено також ейкозодієнову, ейкозотрієнову та докозагексаєнову кислоти.

Серед омега-3 кислот виявлено цис-11, 14, 17-ейкозатрієнову, цис-7, 10, 13, 16, 19-докозапентаєнову та цис-4, 7, 10, 13, 16, 19-докозагесаєнову кислоту.

Індекс співвідношення поліненасичених жирних кислот $n3$ до $n6$ становив 0,35.

Таким чином, у складі ліпідів фетальних стовбурових клітин кота виявлено 18 жирних кислот, з насичених – найбільше пальмітинової кислоти $34,53 \pm 0,58$ %, з мононенасичених – олеїнової ($20,20 \pm 0,93$ %), з поліненасичених – лінолевої ($6,27 \pm 0,01$ %).

Найменше у складі ліпідів стовбурових клітин культури нервової тканини головного мозку клітин виявлено цис-8,11,14-ейкозатрієнової кислоти $0,03 \pm 0,01$ %.

Сумарна кількість насичених жирних кислот у стовбурових клітинах культури нервової тканини головного мозку становила 67,75, ненасичених жирних кислот – 32,25 %.

Моноєнові жирні кислоти визначено у кількості 23,19, а полієнові – 9,06 %. Індекс співвідношення поліненасичених жирних кислот $n3$ до $n6$ стовбурових клітин культури нервової тканини головного мозку становив 0,35.

Уміст жирних кислот у ліпідах стовбурових клітин культури жирової тканини.

Насичені жирні кислоти екстрактів ліпідів мезенхімних стовбурових клітин культури жирової тканини були представлені в діапазоні від C6:0 до C18:0 (табл. 3.23). Їх вміст в екстракті зростав у ряді в наступній послідовності: C8:0 < C15:0 < C6:0 < C10:0 < C12:0 < C14:0 < C18:0 < C16:0.

Із групи НЖК у кількісному відношенні переважала пальмітинова кислота, яка в середньому становила $33,70 \pm 0,02$ % від суми всіх жирних кислот. Міристинова і стеаринова кислоти становили відповідно $10,18 \pm 0,04$ % та $11,12 \pm 0,07$ %. Четверте місце за кількістю серед насичених жирних кислот займала лауринова кислота – $3,08 \pm 0,01$ %.

Вміст моноєнових жирних кислот у екстрактах мезенхімних стовбурових клітин з жирової тканини зростала в ряду в наступному порядку: C20:1 < C16:1n9c < C18:1n9c. При чому, вміст олеїнової кислоти складав $21,63 \pm 0,03$ % від загальної кількості виявлених кислот, а вміст цис-11-ейкозенової – $0,81 \pm 0,01$ %.

Процентний вміст поліненасичених жирних кислот у екстрактах мезенхімних стовбурових клітин культури жирової тканини підвищувався в ряду в наступному порядку: C20:2n6 < C20:3n3 < C22:2n6 < C20:3n3 < C20:6n3 < C22:5n3 < C18:2n6c.

Серед полієнових ННЖК переважала лінолева – $6,45 \pm 0,07$ %, найнижчий вміст спостерігався цис-8,11,14-ейкозадієнової кислоти – $0,04 \pm 0,01$ %.

Сумарна кількість НЖК вища за сумарний рівень ННЖК, коефіцієнт насиченості становить 1,91.

Загальна кількість НЖК у досліджуваних зразках становила 65,65 %, тоді як ННЖК – 34,35 %. Моноєнові жирні кислоти визначено у кількості 24,46 % , а полієнові – 9,89 %.

Таблиця 3.23

**Уміст жирних кислот у ліпідах
стовбурових клітин культури жирової тканини, % ($M \pm m$, $n = 3$)**

Найменування показників	Масова частка жирної кислоти,
Масляна кислота (C6:0)	2,08 \pm 0,01
Капронова кислота (C8:0)	1,26 \pm 0,02
Капринова кислота (C10:0)	2,76 \pm 0,01
Лауринова кислота (C12:0)	3,08 \pm 0,01
Міристинова кислота (C14:0)	10,18 \pm 0,04
Пентадеканова кислота (C15:0)	1,51 \pm 0,02
Пальмітинова кислота (C16:0)	33,70 \pm 0,02
Пальмітолеїнова кислота (C16:1n9c)	2,02 \pm 0,01
Стеаринова кислота (C18:0)	11,12 \pm 0,07
Олеїнова кислота (C18:1n9c)	21,63 \pm 0,03
Лінолева кислота (C18:2n6c)	6,45 \pm 0,07
Ціс-11-ейкозенова кислота (C20:1)	0,81 \pm 0,01
Ціс-11,14-ейкозадієнова кислота (C20:2n6)	0,04 \pm 0,01
Ціс-8,11,14-ейкозатрієнова кислота (C20:3n6)	0,06 \pm 0,01
Ціс-11,14,17-ейкозатрієнова кислота (C20:3n3)	0,69 \pm 0,02
Ціс-13,16-докозадієнова кислота (C22:2n6)	0,31 \pm 0,01
Ціс-7,10,13,16,19-докозапентаєнова кислота (C22:5n3)	1,49 \pm 0,01
Ціс-4,7,10,13,16,19-докозагексаєнова кислота (C22:6n3)	0,86 \pm 0,04
Σ НЖК, %	65,65 \pm 0,02
Σ ННЖК, %	34,35 \pm 0,02
НЖК/ННЖК	1,91
Σ Моноєнові ННЖК, %	24,46 \pm 0,02
Σ Полієнові ННЖК, %	9,89 \pm 0,02
n 3/ n 6	1,91

Слід відмітити, що транс-ізомери жирних кислот у МСК культури жирової тканини були відсутні.

Порівняльна характеристика складу жирних кислот у ліпідах стовбурових клітин різного походження.

Якщо ми розглянемо показники вмісту жирних кислот у ліпідах стовбурових клітин різного походження – культури червоного кісткового мозку, жирової тканини та нервової тканини, то побачимо достовірну різницю у кількості окремих жирних кислот (табл. 3.24).

Серед насичених жирних кислот найбільший вміст був С16:0 пальмітинової кислоти в усіх зразках. Але більший вміст С16:0 реєстрували у зразках клітин культури нервової тканини з показником $34,53 \pm 0,58 \%$ ($p < 0,05$) та жирової – $33,70 \pm 0,02 \%$ ($p < 0,05$) порівняно з такими культури кісткового мозку $32,46 \pm 0,05 \%$. Також, достовірно більшим був уміст С18:0 стеаринової кислоти у зразках клітин культури нервової тканини ($13,45 \pm 0,06 \%$) порівняно з МСК культури червоного кісткового мозку ($10,59 \pm 0,07 \%$) та у межах тенденції у порівнянні з клітинами культури жирової тканини ($11,12 \pm 0,07 \%$), $p < 0,05$.

Тому, як ми бачимо з даних таблиці 3.25, коефіцієнт співвідношення насичених жирних кислот до ненасичених був вищим саме в зразках стовбурових клітин культури нервової тканини та стовбурових клітин культури жирової тканини порівно з стовбуровими клітинами культури червоного кісткового мозку: 2,1; 1,91 і 1,85, відповідно.

Уміст моноєнових кислот достовірно нижчий у зразках СК нейральних клітин та СК з жирової тканини. Зокрема, вміст С18:1n9с становив $20,20 \pm 0,93 \%$ і $21,63 \pm 0,03 \%$ відповідно в зразках нейральних клітин та СК з жирової тканини у порівнянні з СК кісткового мозку, $p < 0,05$, що відображено показником сумарної кількості моноєнових ННЖК (див. табл. 3.25).

Таблиця 3.24

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

Жирні кислоти	Масова частка жирної кислоти		
	СК культури кісткового мозку	СК культури жирової тканини	СК культури нервової тканини
C6:0	$2,22 \pm 0,02$	$2,08 \pm 0,01$	$1,87 \pm 0,05^*$
C8:0	$1,36 \pm 0,01$	$1,26 \pm 0,02$	$1,21 \pm 0,05$
C10:0	$2,90 \pm 0,01$	$2,76 \pm 0,01$	$2,28 \pm 0,08$
C12:0	$3,20 \pm 0,02$	$3,08 \pm 0,01$	$3,07 \pm 0,08$
C14:0	$10,92 \pm 0,06$	$10,18 \pm 0,04$	$9,88 \pm 0,06$
C15:0	$1,27 \pm 0,01$	$1,51 \pm 0,02$	$1,51 \pm 0,01$
C16:0	$32,46 \pm 0,05$	$33,70 \pm 0,02^*$	$34,53 \pm 0,58^*$
C16:1n9c	$1,58 \pm 0,01$	$2,02 \pm 0,01^*$	$2,04 \pm 0,04^*$
C18:0	$10,59 \pm 0,07$	$11,12 \pm 0,07$	$13,45 \pm 0,06^*$
C18:1n9c	$23,15 \pm 0,05$	$21,63 \pm 0,03^*$	$20,20 \pm 0,93^*$
C18:2n6c	$8,51 \pm 0,04$	$6,45 \pm 0,07^*$	$6,27 \pm 0,01^*$
C20:1	$0,99 \pm 0,01$	$0,81 \pm 0,01$	$0,95 \pm 0,05$
C20:2n6	$0,06 \pm 0,01$	$0,04 \pm 0,01$	$0,05 \pm 0,01$
C20:3n6	$0,01 \pm 0,00$	$0,06 \pm 0,01^*$	$0,03 \pm 0,01$
C20:3n3	$0,31 \pm 0,01$	$0,69 \pm 0,02^*$	$0,55 \pm 0,03^*$
C22:2n6	$0,12 \pm 0,01$	$0,31 \pm 0,01$	$0,52 \pm 0,00$
C22:5n3	$0,25 \pm 0,02$	$1,49 \pm 0,01^*$	$1,07 \pm 0,06^*$
C22:6n3	$0,15 \pm 0,01$	$0,86 \pm 0,04^*$	$0,58 \pm 0,01^*$

Примітка. * – $p \leq 0,05$, ** – $p < 0,01$ *** – $p < 0,001$ у порівнянні з показниками зразків СК культури кісткового мозку

Таблиця 3.25

Сумарний вміст насичених, ненасичених жирних кислот, $\omega 3$ та $\omega 6$ у ліпідах стовбурових клітин культури червоного кісткового мозку, жирової та нервової тканини, %, ($M \pm m$, $n = 3$)

Жирні кислоти	Масова частка жирної кислоти		
	СК культури кісткового мозку	СК культури жирової тканини	СК культури нервової тканини
Сума (Σ) насич. (НЖК), %	64,88 \pm 0,02	65,65 \pm 0,02	67,75 \pm 0,02*
Σ Ненасич (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*

Примітки. * – $p \leq 0,05$, ** – $p < 0,01$ *** – $p < 0,001$ у порівнянні з показниками зразків СК кісткового мозку

Уміст полієнової лінолевої кислоти C18:2n6c був достовірно нижчий в зразках стовбурових клітин нейтрального походження та в МСК з жирової тканини клітин порівняно з МСК з кісткового мозку. В зазначених культурах він становив $6,27 \pm 0,01$ %, $6,45 \pm 0,07$ % та $8,51 \pm 0,04$ %, відповідно ($p < 0,05$).

За результатами наших досліджень достовірно вищим є вміст $\omega 3$ жирних кислот у ліпідах зразків МСК культури жирової тканини та СК культури нервової тканини, тоді як вміст $\omega 6$ жирних кислот у цих зразках – навпаки, достовірно менший (див. табл. 3.25).

Таким чином, СК, отримані з різного первинного матеріалу відрізняються за вмістом жирних кислот у ліпідах.

Ліпіди МСК червоного кісткового мозку характеризувалися вищим вмістом ненасичених жирних кислот $35,12 \pm 0,02 \%$; ($p < 0,05$), нижчим вмістом $\omega 3$ жирних кислот $0,71 \pm 0,02 \%$; ($p < 0,05$), вищим вмістом $\omega 6$ жирних кислот $8,7 \pm 0,02 \%$; ($p < 0,05$) на противагу СК культури жирової та нервової тканини.

Ліпіди МСК культури жирової тканини характеризувалися нижчим вмістом моноєнових ненасичених жирних кислот $24,46 \pm 0,02$; ($p < 0,05$), вищим вмістом $\omega 3$ жирних кислот $3,04 \pm 0,02 \%$; ($p < 0,05$), нижчим вмістом $\omega 6$ жирних кислот $6,86 \pm 0,02 \%$; ($p < 0,05$) на противагу ліпідам СК червоного кісткового мозку.

Ліпіди СК культури нервової тканини головного мозку характеризувалися вищим вмістом насичених жирних кислот $67,75 \pm 0,02 \%$; ($p < 0,05$), нижчим вмістом ненасичених жирних кислот $32,25 \pm 0,02 \%$; ($p < 0,05$), зокрема моноєнових $23,19 \pm 0,02 \%$; ($p < 0,05$), вищим вмістом $\omega 3$ жирних кислот $2,23 \pm 0,02 \%$; ($p < 0,05$), нижчим вмістом $\omega 6$ жирних кислот $6,87 \pm 0,02 \%$; ($p < 0,05$) у порівнянні з ліпідами МСК культури червоного кісткового мозку.

Тому, можна висловити припущення, що СК культур жирової та нервової тканини, які мали більший вміст $\omega 3$ жирних кислот, можуть більш активно впливати на проліферацію та диференціювання клітин та проявляти себе у впливі на імунні реакції, протизапальні функції організму.

Маючи певні відмінності у жирнокислотному складі, стовбурові клітини, отримані з різного первинного матеріалу характеризувались і спільними рисами даної ланки ліпідного обміну.

У культурах СК різного походження переважали насичені жирні кислоти (НЖК) в діапазоні від C6:0 до C18:0 (рис. 3.35).

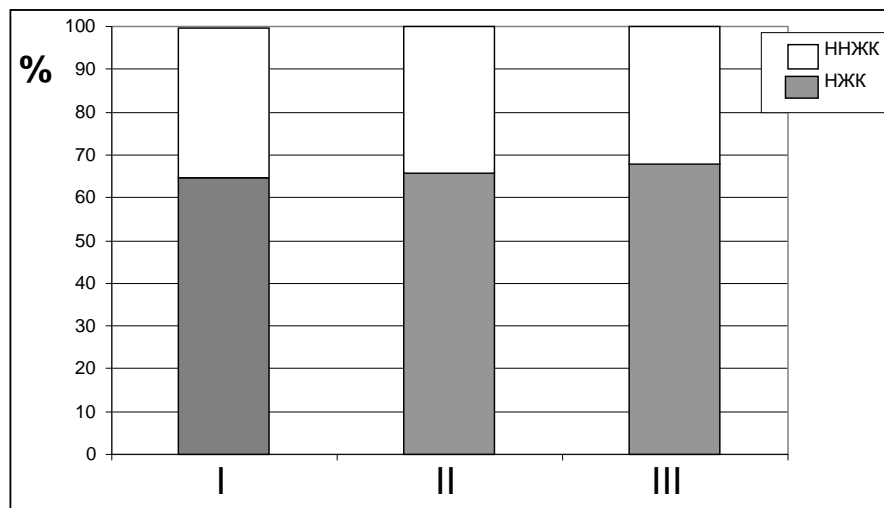


Рис. 3.35. Співвідношення насичених і ненасичених жирних кислот в СК культури червоного кісткового мозку (I), жирової (II) та нервової тканини (III).

Уміст окремих НЖК у екстрактах СК культури жирової та нервової тканини зростала в ряду в наступному порядку: $C8:0 < C15:0 < C6:0 < C10:0 < C12:0 < C14:0 < C18:0 < C16:0$ (табл. 3.26).

Співвідношення насичених (НЖК) і ненасичених жирних кислот (ННЖК) становило 1,85; 1,91 та 2,1 у СК культури червоного кісткового мозку, жирової та нервової тканини, відповідно. З групи НЖК у кількісному відношенні переважала пальмітинова кислота, вміст якої становив 32,46 – 34,53 % від суми всіх жирних кислот. Уміст міристинової і стеаринової кислот була приблизно однакова і становила відповідно 9,88 - 10,92 % та 10,59 – 13,45 % в МСК різного походження. На четвертому місці за кількістю серед насичених жирних кислот займала лауринова кислота. Її вміст у складі МСК різного походження коливався від 3,07 до 3,20 %. НЖК $C20:0$, $C22:0$ і $C24:0$ не визначались.

Серед ненасичених жирних кислот переважали мононенасичені, або моноєнові (рис. 3.36).

Таблиця 3.26

Вміст насичених жирних кислот у ліпідах стовбурових клітин культури кісткового мозку, жирової та нервової тканини, $M \pm m$, $n = 9$, %

Жирні кислоти	Масова частка жирної кислоти, $M \pm m$		
	СК культури кісткового мозку	СК культури жирової тканини	СК культури нервової тканини
Капронова, C8:0	$1,36 \pm 0,01$	$1,26 \pm 0,02$	$1,21 \pm 0,05$
Пентадеканова, C15:0	$1,27 \pm 0,01$	$1,51 \pm 0,02$	$1,51 \pm 0,01$
Масляна, C6:0	$2,22 \pm 0,02$	$2,08 \pm 0,01$	$1,87 \pm 0,05$
Капрінова, C10:0	$2,90 \pm 0,01$	$2,76 \pm 0,01$	$2,28 \pm 0,08$
Лауринова, C12:0	$3,20 \pm 0,02$	$3,08 \pm 0,01$	$3,07 \pm 0,08$
Міристинова, C14:0	$10,92 \pm 0,06$	$10,18 \pm 0,04$	$9,88 \pm 0,06$
Стеаринова, C18:0	$10,59 \pm 0,07$	$11,12 \pm 0,07$	$13,45 \pm 0,06$
Пальмітинова, C16:0	$32,46 \pm 0,05$	$33,70 \pm 0,02$	$34,53 \pm 0,58$

Як бачимо з даних таблиці 3.27, основною моноєсною кислотою була олеїнова, вміст якої коливався в межах 20,2 - 23,15 % від загальної кількості жирних кислот в МСК різного походження. На другому місці знаходилась пальмітолеїнова кислота.

Відомо, що присутність олеїнової та пальмітолеїнової кислот в клітинах обумовлена як надходженням із культурального середовища, так і синтезом *de novo*. Останній пов'язаний активністю фермента стеарол-КоА десатурази (SCD, stearoyl-CoA desaturase).

Співвідношення ненасиченої олеїнової до насиченої стеаринової кислот ($C18:1/C18:0$), яке відображає активність SCD, було високим та перевищувало 1,0 (рис. 3.37) та становило у СК культури кісткового мозку 2,18, жирової – 1,94, та нервової тканини – 1,5.

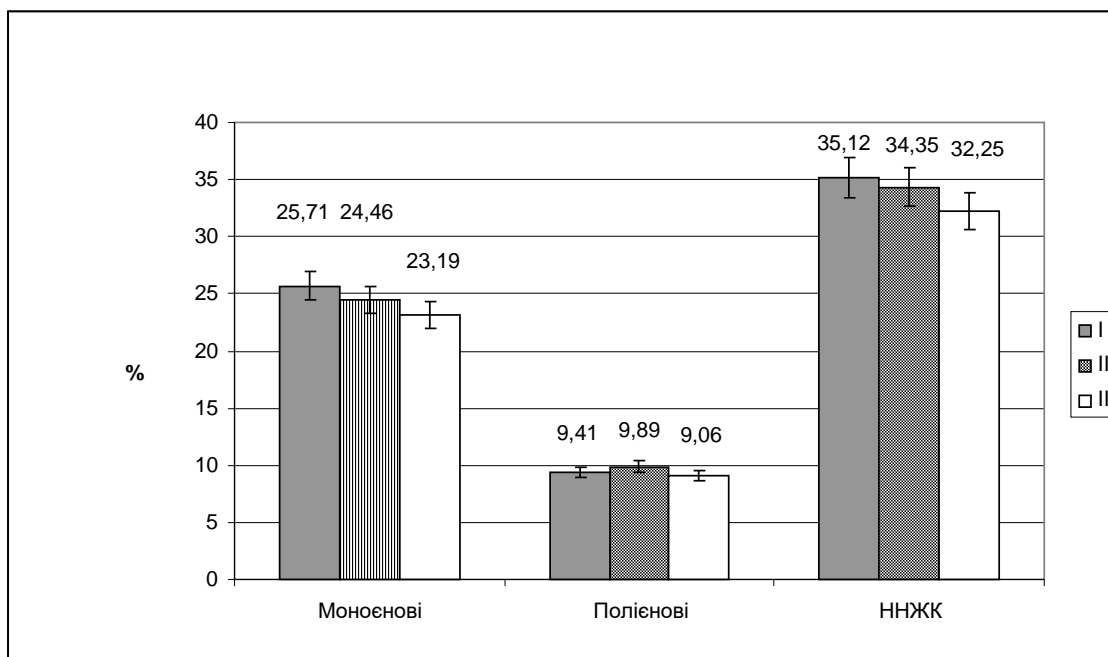


Рис. 3.36. Вміст ненасичених жирних кислот (ННЖК) в СК культури червоного кісткового мозку (I), жирової (II) та нервової тканини (III).

Навпаки, співвідношення пальмітолеїнової і пальмітинової кислот ($C16:1/C16:0$) було низьким (рис. 3.38).

Аналогічні дані щодо високого $C18:1/C18:0$ співвідношення на фоні вкрай низького $C16:1/C16:0$ співвідношення були знайдені й іншими авторами, і скоріше за все вони відображають різну афінність ферменту SCD до субстратів – стеаринової і пальмітинової кислот. Визначене нами співвідношення $C18:1 / C18:0$ значно перевищувало показник, типовий для сироватки крові тварин і людей (в середньому 0,8), і наближувалось до показників, характерних для МСК з кісткового мозку людини – 1,6 та перевищувало його.

Отже, за показником співвідношення ненасиченої олеїнової до насиченої стеаринової кислот ($C18:1 / C18:0$), можна зробити висновок щодо підвищення активності SCD у порівнянні з таким у сироватці крові тварин і людини та неоднакової його активності в СК, отриманих нами з різних культур тканин.

Таблиця 3.27

**Вміст ненасичених жирних кислот у ліпідах МСК з кісткового мозку,
жирової та нервової тканини, $M \pm m$, $n = 3$, %**

	МСК культури червоного кісткового мозку	МСК культури жирової тканини	СК культури нервової тканини
Пальмітолеїнова, C16:1n9c	1,58 \pm 0,01	2,02 \pm 0,01	2,04 \pm 0,04
Олеїнова, C18:1n9c	23,15 \pm 0,05	21,63 \pm 0,03	20,20 \pm 0,93
Гондоїнова, C20:1n9c	0,99 \pm 0,01	0,81 \pm 0,01	0,95 \pm 0,05
Лінолева, C18:2n6c	8,51 \pm 0,04	6,45 \pm 0,07	6,27 \pm 0,01
Ейкозадієнова, C20:2n6	0,06 \pm 0,01	0,04 \pm 0,01	0,05 \pm 0,01
Дігомоліноленова, C20:3n6	0,01 \pm 0,00	0,06 \pm 0,01	0,03 \pm 0,01
Докозадієнова, C22:2n6	0,12 \pm 0,01	0,31 \pm 0,01	0,52 \pm 0,00
Ейкозатрієнова, C20:3n3	0,31 \pm 0,01	0,69 \pm 0,02	0,55 \pm 0,03
Докозапентаєнова, C22:5n3	0,25 \pm 0,02	1,49 \pm 0,01	1,07 \pm 0,06
Докозагексаєнова, C22:6n3	0,15 \pm 0,01	0,86 \pm 0,04	0,58 \pm 0,01

Серед усіх жирних кислот у СК різного походження вміст моноєнної олеїнної кислоти знаходився на другому місці після вмісту насиченої пальмітинової кислоти. Наявність у клітинах олеїнної кислоти асоційована з високою проліферативною активністю та резистентністю до індукції апоптозу.

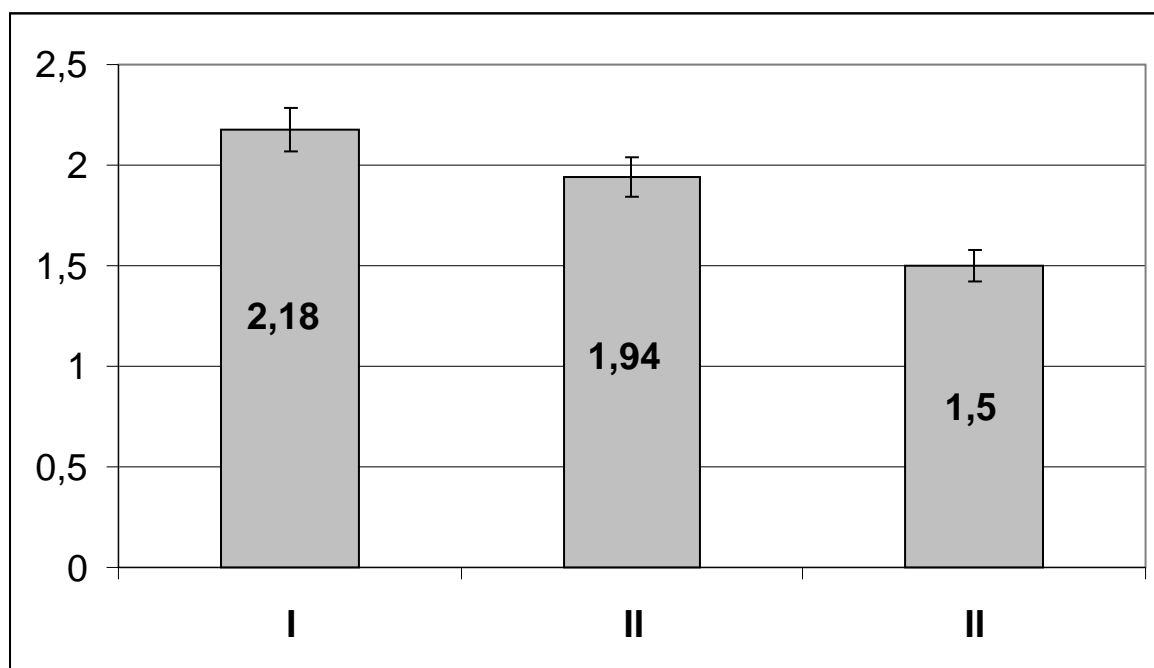


Рис. 3.37. Співвідношення олеїнової і стеаринової кислот (C18:1/C18.0) у СК культури червоного кісткового мозку (I), жирової (II) та нервової тканини (III).

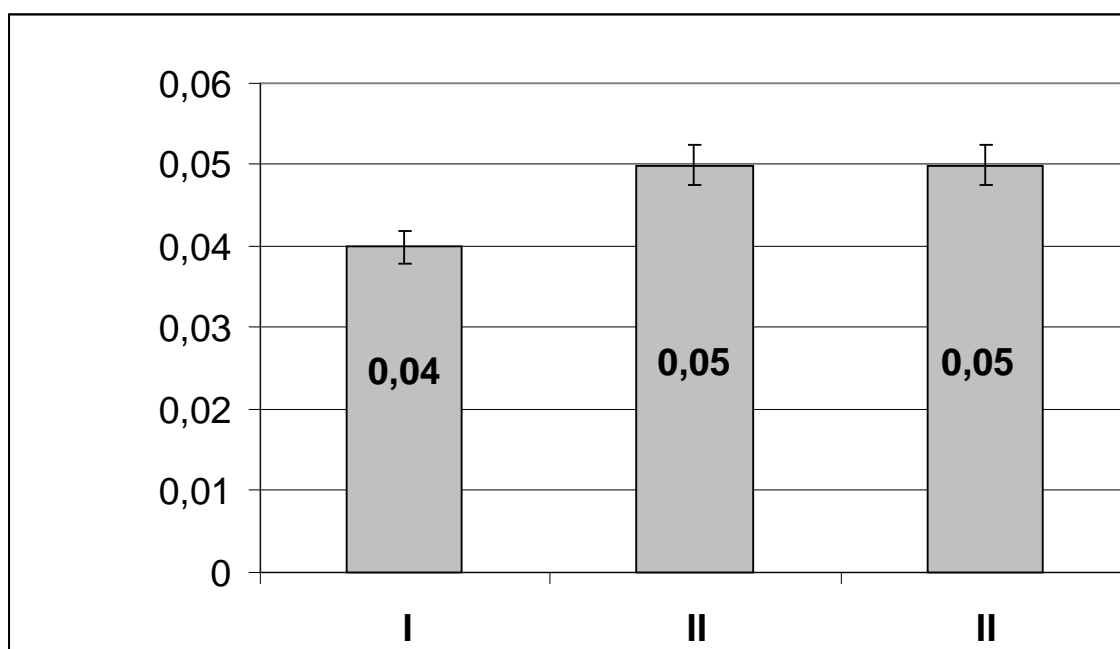


Рис. 3.38. Співвідношення пальмітолеїнової і пальмітинової кислот (C16:1/C16.0) в СК культури червоного кісткового мозку (I), жирової (II) та нервової тканини (III).

Поліненасичені, або полієнові, жирні кислоти групи Омега-6 та Омега-3 відносяться до незамінних. Тому їх присутність у складі МСК в основному відображує концентрацію цих кислот у культуральному середовищі.

Серед Омега-6 кислот у досліджених зразках переважала лінолева кислота, вміст якої коливався в межах від 6,27 до 8,51 %; у слідових концентрація також були присутні ейкозадієнова (0,04–0,06 %), ейкозатрієнова (0,32 – 0,55 %) та дігомоліноленова (0,01 – 0,06 %).

Серед Омега-3 кислот виявлено ейкозатрієнову (0,31–0,69 %), докозапентаєнову (0,25 – 1,47 %) та докозагесаєнову кислоту (0,15 – 0,86 %). У всіх досліджених зразках переважали кислоти групи Омега-6 (рис. 3.39). Тобто, співвідношення Омега-3 і Омега-6 поліненасичених жирних кислот було низьким і становило в середньому 0,08 в МСК з кісткового мозку, 0,46 в МСК з жирової тканини і 0,35 в МСК з нервової тканини.

Клітини людини та більшості тварин не можуть синтезувати незамінні жирні кислоти з більш простих речовин, але здатні до утворення більш довгих форм із коротколанцюгового попередника. В досліджених зразках МСК в достатній кількості була присутня лінолева кислота (C18:2n6c), яка може виступати як субстрат для синтезу *de novo*, однак вміст форм з більшою кількістю атомів вуглероду був незначним. Арахідонова (C20:4n6) і докозататраєнова кислота (C22:4n6) як кінцеві продукти метаболізму лінолевої кислоти у зразках були відсутні. Тому ми вважаємо, що переконливих доказів активації синтезу поліненасичених жирних кислот в МСК нами не отримано. За результатами наших досліджень вміст $\omega 3$ жирних кислот у ліпідах МСК жирової та нервової тканини був достовірно вищим порівняно з МСК з кісткового мозку ($p < 0,05$). Це було обумовлено достовірно більш високим вмістом ейкозатрієнової (C20:3n3), докозапентаєнової (C22:5n3) і докозагексаєнової (C22:6n3) кислот ($p < 0,05$).

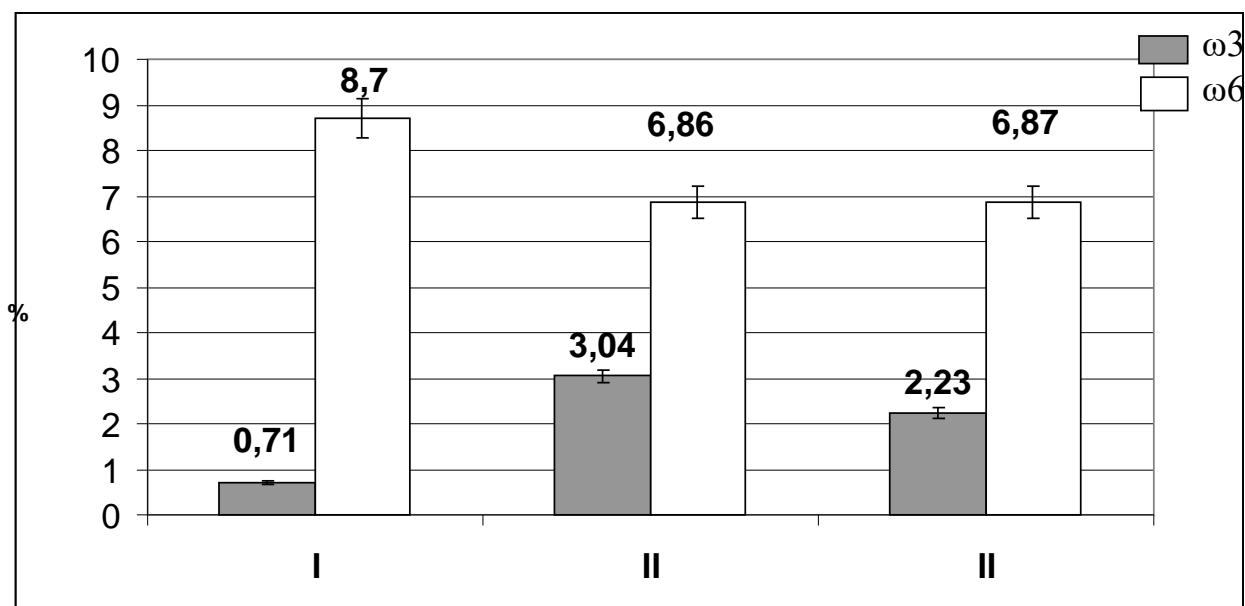


Рис. 3.39. Уміст поліненасичених Омега-3 і Омега-6 жирних кислот в СК культури червоного кісткового мозку (I), жирової (II) та нервової тканини (III).

Ми пов'язуємо це з особливостями отримання МСК з жирової і нервової тканин. Як зазначалось у розділі «Матеріали і методи», клітини цих тканин культивували у присутності експланту, шматочки якого механічно вилучали після прикріплення клітин до дна культурального посуду навколо експланту та формування моношару. Це дозволяє уникнути пошкоджуючого механічного та хімічного впливу на клітини, зберегти тканинні цитокіни і фактори росту та забезпечити їх надходження з фрагментів тканини у середовище. Вірогідно, що такий метод культивування призводить і до підвищення концентрації Омега-3 жирних кислот поживному середовищі, оскільки саме в клітинах нервової і жирової тканини в нормі концентрується переважна кількість Омега-3 кислот в організмі.

Таким чином, проведені дослідження вмісту жирних кислот ліпідів стовбурових клітин культур червоного кісткового мозку, жирової та нервової тканини дало підставу зробити висновки, що МСК різного походження

мають наступні особливості ліпідного обміну: високий вміст олеїнової кислоти, що характерно для клітин, резистентних до апоптозу та з високим проліферативним потенціалом; високе співвідношення ненасиченої лінолевої до насиченої стеаринової кислот (C18:1 / C18:0), яке відображує високу активність фермента SCD та активний стан Wnt/ β -катенін сигнального шляху; нездатність до подовження ланцюга насичених жирних кислот; відсутність або низьку активність синтезу *de novo* Омега-6 поліненасичених жирних кислот.

Виявлено розбіжності в концентрації Омега-3 жирних кислот та, відповідно, у співвідношенні Омега-3/Омега-6 жирних кислот в МСК жирової та нервової тканини порівняно з МСК кісткового мозку, що ми пов'язуємо з особливостями культивування.

3.1.16 Біологічна активність мезенхімних стовбурових клітин культури жирової тканини за кріоконсервування методом вітрифікації при застосуванні кріосередовищ різного складу. Отриманий цінний біологічний матеріал – мезенхімні стовбурові клітини технологічно не завжди використовують одразу, і зберігають у рідкому нітрогені, або в низькотемпературних морозильних камерах для створення банку клітин з подальшим їх використанням.

Перенесення клітин цілісного організму в штучні умови припиняє їх існування як одного з численних елементів тканини, до складу якої вони входили. При цьому клітини позбавляються контролю нейрогуморальних факторів організму і набувають таких особливостей, які залежать від самого факту їх існування в штучних умовах. Склад середовища кріоконсервування, правильне співвідношення неорганічних речовин, вуглеводів, білків, амінокислот, гормонів, вітамінів та інших біологічно активних речовин, кислотність середовища – усі ці фактори чинять суттєвий вплив на виживаність та проліферацію клітин. Для збереження морфологічної

цілісності клітин, структури органел використовують кріозахисні середовища, які за своїм впливом є токсичними для клітин.

Як вже зазначалось у розділі «Матеріали і методи», при кріоконсервуванні МСК культури жирової тканини досліджували вплив середовища кріоконсервування різного складу на виживаність та життєздатність клітин абдомінальної і підшкірної жирової тканини у наступних дослідках:

1-й дослід: склад середовища кріоконсервування містив 90 % FBS та 10 % ДМСО;

2-й дослід: склад середовища кріоконсервування містив 45 % FBS, 45 % середовища ДМЕМ, 10 % ДМСО;

3-й дослід: склад середовища кріоконсервування містив 95 % FBS і 5 % ДМСО.

За тридцять діб після внесення МСК у кріосередовище та зберіганні зразків у рідкому нітрогені у посудинах Дюара визначали збереженість клітин, їх життєздатність та проліферативну активність.

Оцінювали морфологічні особливості клітин. Досліджували також вплив середовища кріоконсервування на проліферативну активність клітин (визначали індекс проліферації клітин) дослідних зразків шляхом культивування за стандартних умов і однакової посадкової кількості клітин – 3×10^4 кл / cm^2 ($2,8 \times 10^5$ кл / чашку діаметром 3,5 см) на чашку. За 24 години культивування, ми зареєстрували адгезію до пластика значно більшої кількості стовбурових клітин зразків досліді №1 (рис. 3.40).

Зберігання клітин у рідкому нітрогені чинило вплив на біологічні властивості МСК культури жирової тканини. При використанні суміші для кріоконсервування, що містила 90 % FBS + 10 % ДМСО у досліді 1, ми отримали достовірно вищий показник виживаності клітин – $2,37 \pm 0,03 \times 10^5$ ($p < 0,01$), з яких $79,2 \pm 0,01$ % ($p < 0,01$) зберегли свою життєздатність

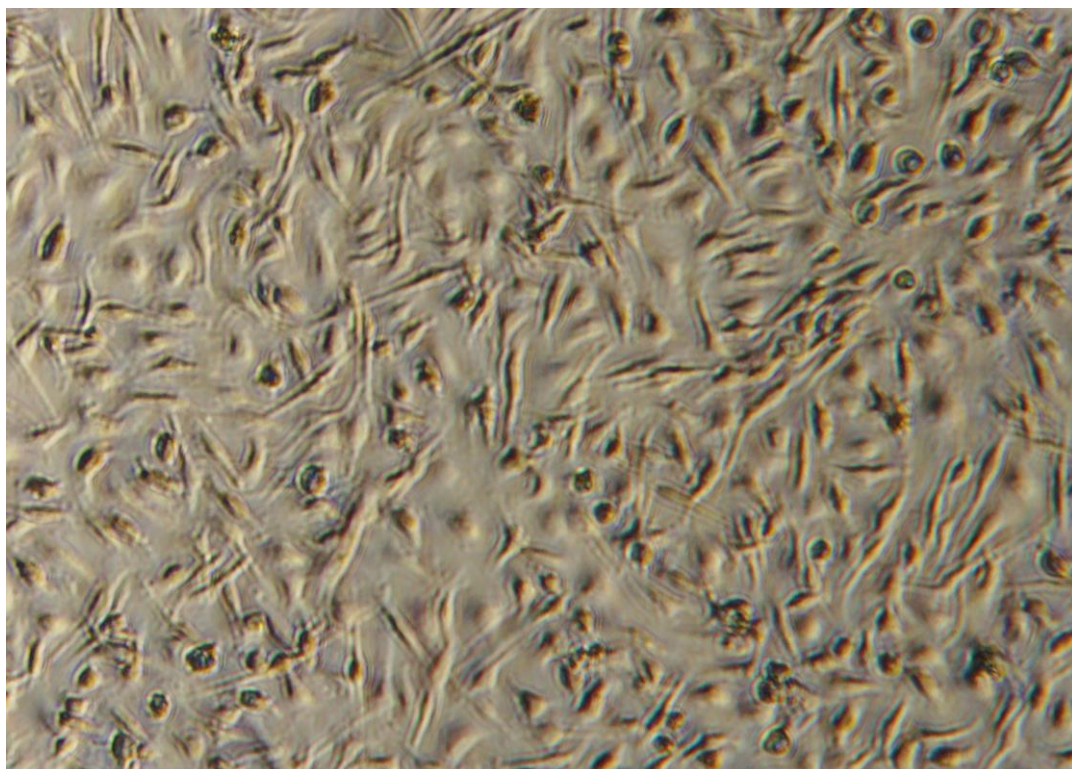


Рис. 3.40. Стовбурові клітини культури жирової тканини за умов досліді №1. Мікропрепарат, $\times 100$.

За умов досліді 2 показник збереженості клітин становив $1,86 \pm 0,04 \times 10^5$ % ($p < 0,05$) у порівнянні з клітинами досліді 3. Життєздатність їх становила $62,4 \pm 0,01$ % ($p < 0,05$) (рис.3.41).

Тобто, якщо за умов досліді 1 більш ніж дві третини заморожених клітин, а саме 79,2 % ($p < 0,001$) зберегли свою життєздатність, то зміна складу середовища кріоконсервування, а саме, зниження вмісту сироватки або кріоконсерванту ДМСО, призводило за їх субкультивування до зменшення проліферативної активності розморожених клітин, майже удвічі ($p < 0,01$), життєздатності – до 50 % ($p < 0,01$), з числа тих клітин, що залишилися життєздатні (рис. 3.42).

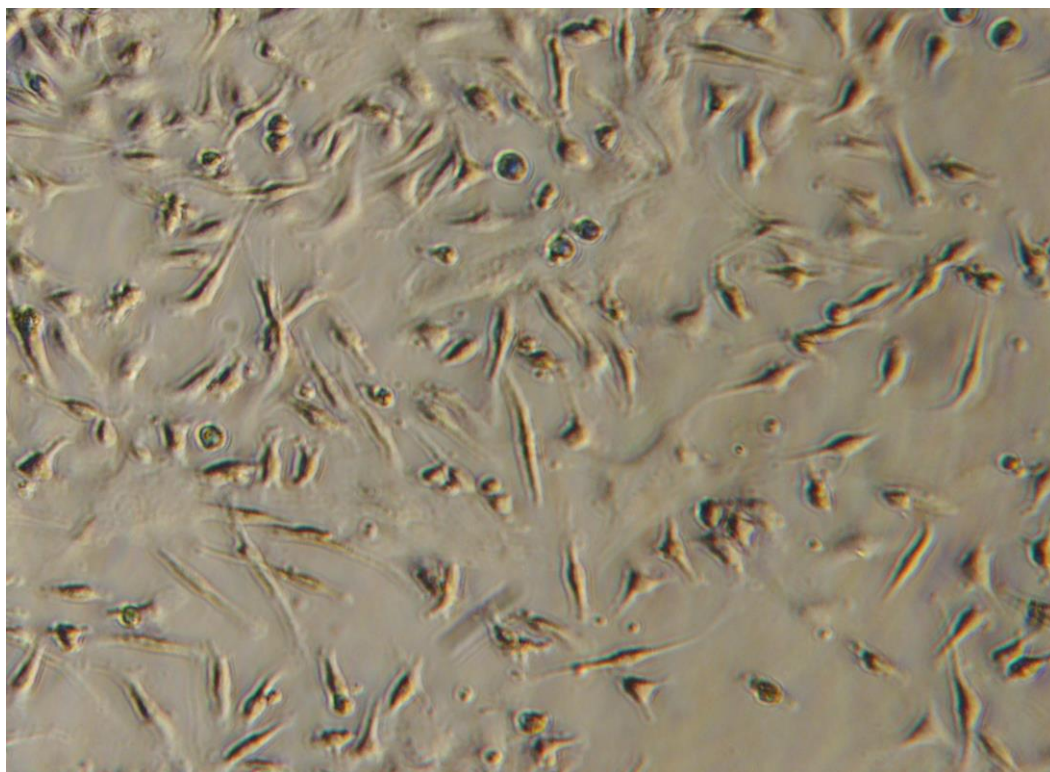


Рис. 3.41. Стівбурові клітини культури жирової тканини за умов дослідіу №2. Мікропрепарат, $\times 100$.

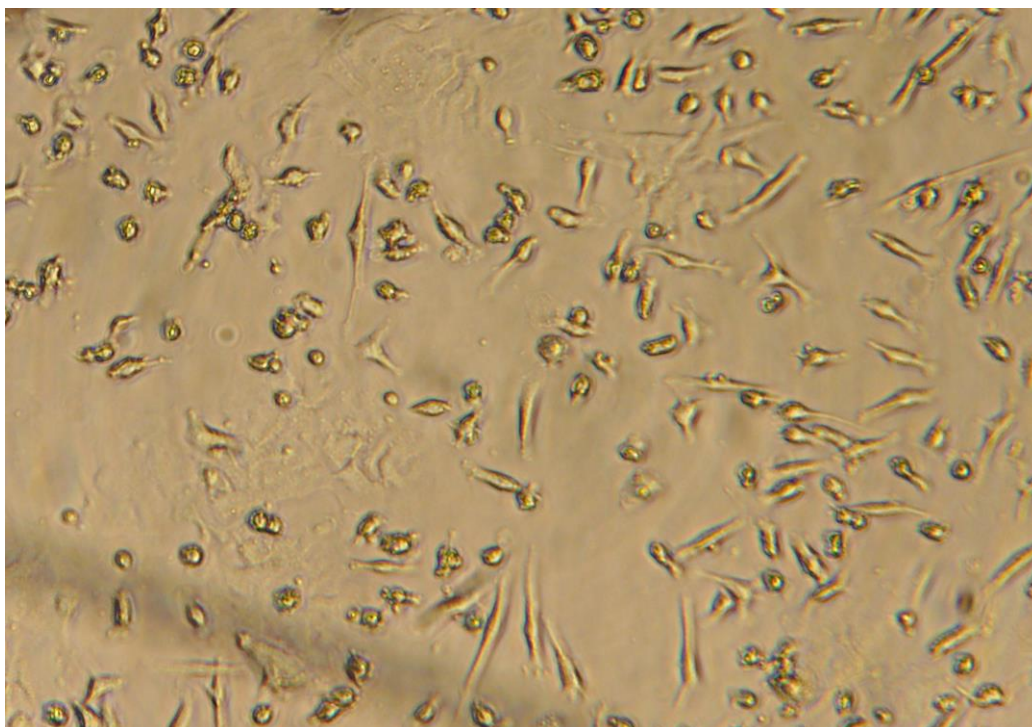


Рис. 3.42. Стівбурові клітини культури жирової тканини за умов дослідіу №3. Нативний препарат. Зб.: $\times 320$

Показники кількості клітин, що збереглися, та їх життєздатності у зразках досліду 1 були найвищими $79,2 \pm 0,01$ і достовірно відрізнялися від таких у досліді 2 – $62,4 \pm 0,01$ і 3 – $50,3 \pm 0,02$ % (табл. 3.28).

Таблиця 3.28

**Біологічна активність мезенхімних стовбурових клітин культури
жирової тканини після кріоконсервування, $M \pm m$, $n = 5$**

№ досліду	Життєздатність до заморожування	Кількість клітин за 24 год культивування, $\times 10^5$	Життєздатність після розморожування, %
1	$95,1 \pm 0,01$	$2,37 \pm 0,03^{**}$	$79,2 \pm 0,01^{**}$
2	$95,1 \pm 0,01$	$1,86 \pm 0,04^*$	$62,4 \pm 0,01^*$
3	$95,1 \pm 0,01$	$1,49 \pm 0,05$	$50,3 \pm 0,02$

Примітки: * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$, *** – $p < 0,001$ порівняно з клітинами досліду №3

За 48 годин культивування МСК знімали з дна культурального посуду, підраховували у камері Горяєва та визначали індекс проліферації. Отримані дані засвідчують достовірно вищу проліферативну активність клітин зразків досліду 1 (табл. 3.29) .

Отже, за результатами наших досліджень встановлено, що хімічний склад середовища кріоконсервування методом вітрифікації чинить вплив на життєздатність МСК культури жирової тканини та їх наступну проліферацію за культивування *in vitro* після 30-ти добового зберігання.

Нами визначено, що середовище кріоконсервування, яке містило 90% фетальної сироватки бичків та 10 % диметилсульфоксиду, забезпечує найбільшу збереженість з показником життєздатності 79,2 % ($p \leq 0,01$) та достовірно вищий індекс проліферації 1,94 ($p \leq 0,01$) при культивуванні *in*

vitro клітин культури жирової тканини після кріоконсервування методом вітрифікації.

Таблиця 3.29

**Проліферативна активність мезенхімних стовбурових клітин
культури жирової тканини після кріоконсервування $M \pm m$, $n = 5$**

№ дослідів	Посадкова кількість клітин, $\times 10^5$	Кількість клітин після культивування, $\times 10^5$	Коефіцієнт проліферації
1	2,8	$5,43 \pm 0,1^{**}$	$1,94 \pm 0,03^{**}$
2	2,8	$3,73 \pm 0,31^*$	$1,33 \pm 0,11^*$
3	2,8	$3,27 \pm 0,14$	$1,17 \pm 0,05$

Примітка: * – $p \leq 0,05$; ** – $p \leq 0,01$; *** – $p \leq 0,001$ порівняно з клітинами дослідів 3

Висновки до підрозділу 3.1

Підсумовуючи результати, отримані при виконанні даного підрозділу дисертаційного дослідження, можна зробити наступні висновки:

1. Розроблені нові методи отримання МСК культури жирової та нервової тканини. 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, зменшення витрат на реагенти.

2. Жирова тканина більшого сальника та 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 – $8,67 \pm 0,2$ штук ($p < 0,001$), життєздатністю – $98,7 \pm 0,31$ % ($p < 0,05$) та кількістю клітин у культурі на 14 добу культивування – $735,83 \pm 15,4 \times 10^3$ ($p < 0,001$).

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 бичків, 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-го 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-му пасажі до $853,78 \pm 36,71$ ($p < 0,01$), на 12-му до $2304,40 \pm 280,12 \mu m^2$ ($p < 0,001$), за рахунок цитоплазми; біля ядра візуалізується комплекс Гольджі, що засвідчує активний стан проліферуючих клітин; знижується життєздатність клітин на 7-му 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 ядерноцитоплазматичного співвідношення і становить на 4-му $0,2262 \pm 0,0074$ ($p < 0,01$), на 12-му пасажі більш, ніж у чотири рази 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-му та 12-му 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-го пасажу і характеризується наступним: на перших пасажах культивування клітини мають веретеноподібну форму з двома, трьома довгими виростами цитоплазми, площею ядра $161,11 \pm 5,65 \mu\text{m}^2$, 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-му пасажі до $135,78 \pm 11,21 \mu\text{m}^2$ ($p < 0,001$) та збільшенням площі клітин на 12-му до $1416,90 \pm 151,97$ ($p < 0,001$) за рахунок цитоплазми; біля ядра візуалізується комплекс Гольджі, що засвідчує активний стан проліферуючих клітин; знижується життєздатність клітин на 12-му пасажі – до $84,67 \pm 1,36$ % ($p < 0,01$) та їх стійкість до апоптозу, індукованого культивуванням у середовищі без додавання сироватки; з 7-го пасажу достовірно зменшується показник ядерно-цитоплазмового співвідношення і становить $0,2189 \pm 0,0122$ ($p < 0,01$), а на 12-му пасажі більш, ніж у два рази $0,1111 \pm 0,0086$ ($p < 0,001$) через достовірне збільшення площі цитоплазми клітини; збільшення вмісту апоптичних клітин, що проявляють чутливість до безсироваткового культивування, на 7-му та 12-му 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 зменшувалась 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 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 b-катеніну (у ядрі) засвідчує активний стан Wnt/b-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 – $299,0 \pm 0,6$, 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 , b-катенін $73 \pm 1,6$, bcl 2 – 64 ± 15 балів, що відрізняє їх від мезенхімальних стовбурових

клітин культури жирової тканини та кісткового мозку за проліферативною здатністю, рухливістю, активністю.

10. Стівбурові 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/b-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.

Результати підрозділу 3.1 опубліковано в працях [9, 18, 21, 22, 24, 27, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 36, 38, 41, 42, 43, 48, 54, 56, 63, 65, 187, 188, 288, 289, 343].

3.2 Вплив мезенхімних стівбурових клітин на стан інтактних тварин-реципієнтів

3.2.1 Вплив алогенних мезенхімних клітин кісткового мозку на функціональний стан імунних органів мишей лінії C57Bl/6. Дослідженнями, проведеними на кафедрі фізіології, патофізіології та

імунології тварин було визначено окремі показники реакції імунної системи тварин-реципієнтів за впливу стовбурових клітин. Даний фрагмент дослідження спрямований на поглиблення отриманих даних та визначення впливу стану імунної системи на пухлинний процес у подальших експериментах.

Для визначення системного впливу МСК на імунну тканину тварин-реципієнтів, ми оцінили морфофункціональний стан тимусу (центрального органу Т-клітинного імунітету) і селезінки (органу переважної проліферації В-лімфоїдної ланки імунітету). Як зазначено в розділі «Матеріали і методи», тварини були розділені на три групи: інтактні (жодних маніпуляцій не проводили), плацебо (введення у хвостову вену 0,5 мл фосфатно-буферного розчину без МСК) та дослідні (введення у хвостову вену 10^4 МСК у 0,5 мл фосфатно-буферного розчину).

Вже на 7-му добу дослідження ми реєстрували значне збільшення відносної ваги тимусу за введення МСК, яке достовірно ($p < 0,05$) перевищувало показники в групі інтактних тварин та плацебо на всіх термінах (рис. 3.43). Однак, якщо у тварин дослідної групи ваговий індекс тимусу за введення МСК на 7-му і 18-му добу спостереження не розрізнявся ($p = 0,373$) і був однаково високим, то на 25-ту добу спостерігалось його поступове зменшення ($p < 0,05$) порівняно з 18-ю добою та ($p < 0,05$) порівняно з 7-ю добою спостереження). Ще раз зазначимо, що навіть на 25-ту добу спостереження ваговий індекс тимусу у тварин дослідної групи на третину перевищував показники в групі інтактних тварин і плацебо.

На перших етапах ініціації імунної відповіді в мишей за впливу алогенних МСК культури червоного кісткового мозку вміст лімфоїдних клітин тимусу достовірно підвищувався у порівнянні з тваринами контрольної групи та плацебо на 79 % та 32 % відповідно (табл. 3.30).

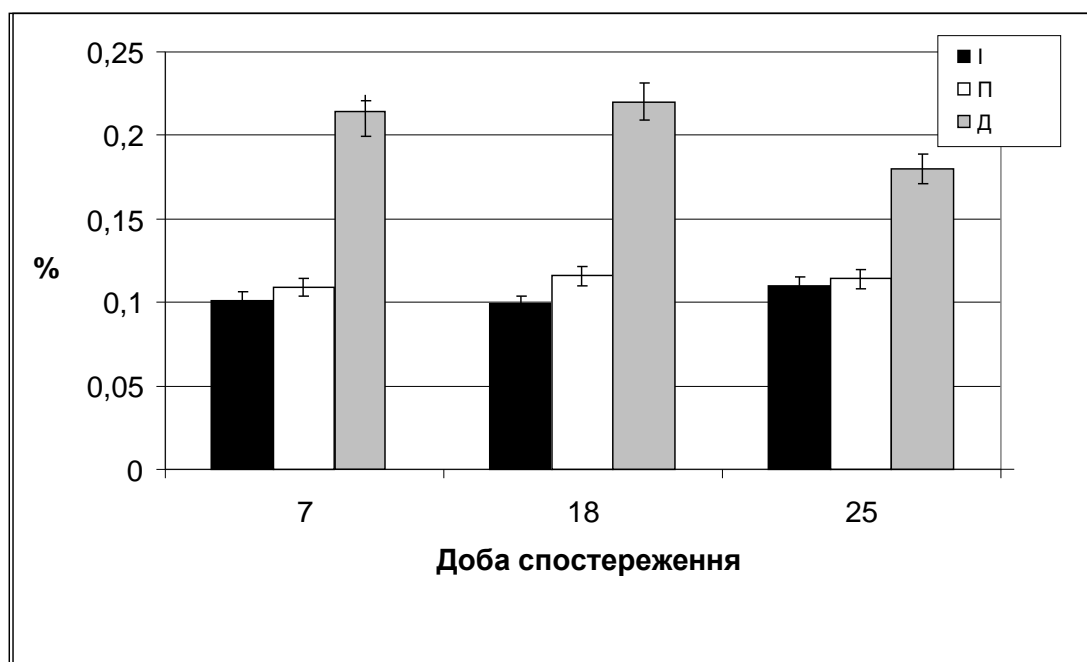


Рис. 3.43. Ваговий індекс тимусу за введення МСК культури кісткового мозку: I – інтактні тварини; П – за введення плацебо; Д – дослідні тварини

На сьому добу спостереження в мазках-відбитках тканини тимуса присутні Т-лімфобласти, які утворюються з попередників, що надходять з кісткового мозку, дозріваючі та зрілі лімфоцити, а також опорні та секреторні клітини стромального компоненту тимусу (рис. 3.44).

За впливу МСК червоного кісткового мозку в тварин-реципієнтів достовірне зростання вмісту лімфоїдних клітин тимусу триває до 18-ої доби дослідження.

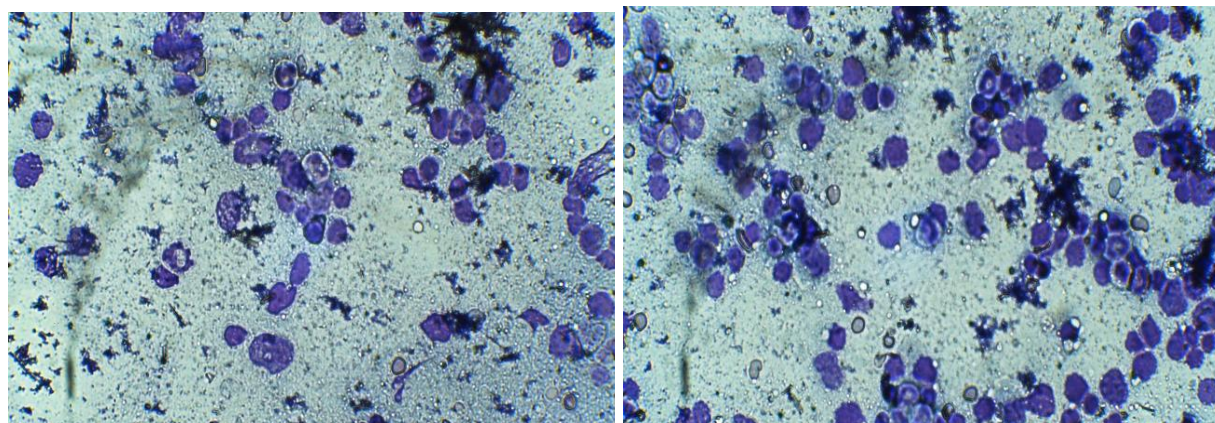
На 18-ту добу експерименту ми реєстрували також достовірно вищі показники кількості лімфоїдних клітин тимусу, ніж в тварин інтактної групи та плацебо. На пізніх етапах трансплантації МСК відбувається зниження вмісту лімфоїдних клітин тимусу у порівнянні з 18-ою добою дослідження, але все одно показники достовірно вищі у порівнянні з інтактними тваринами та групою плацебо.

Таблиця 3.30.

Вміст лімфоїдних клітин у тимусі мишей C57Bl/6 за введення алогенних МСК з кісткового мозку, $M \pm m$, $n = 9$, $\times 10^6 / \text{мг}$

Термін дослідження	Вміст лімфоїдних клітин, $\times 10^6 / \text{мг}$		
	Групи тварин		
	інтактні	плацебо	дослідні
7-ма доба	$1,4 \pm 0,1$	$1,9 \pm 0,2$	$2,5 \pm 0,3^{** \vee}$
18-та доба	$1,4 \pm 0,1$	$1,3 \pm 0,1$	$2,9 \pm 0,1^{*** \vee \vee \vee}$
25-та доба	$1,7 \pm 0,1$	$1,4 \pm 0,1$	$2,5 \pm 0,2^{* \vee \vee}$

Примітки: * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$ – порівняно з показниками інтактних тварин; \vee – $p < 0,05$, $\vee \vee$ – $p < 0,01$; $\vee \vee \vee$ $p < 0,001$ – порівняно з показниками тварин групи плацебо



А

Б

Рис. 3.44 Мазки-відбитки тимусу. Лімфоїдні клітини тимусу на 7-му добу досліду: А – група інтактних тварин, Б – за введення МСК культури червоного кісткового мозку. Мікропрепарат. Фарбування за Паленгеймом, $\times 100$

Це засвідчує поступове зниження процесів диференціювання, міграції та проліферації клітин. В тварин дослідної групи встановлено достовірний

позитивний кореляційний зв'язок клітинності тимуса з ваговим індексом на усіх етапах спостереження: $r = 0,802$; $p < 0,01$.

Аналогічні процеси відбувались і в тканині селезінки. За впливу МСК культури червоного кісткового мозку на 7-му та 18-ту добу спостереження ваговий індекс достовірно ($p < 0,05$) зростав порівняно з інтактними тваринами і тваринами групи плацебо, однак на 25-ту добу спостереження – достовірно знижувався ($p < 0,01$) (рис. 3.45).

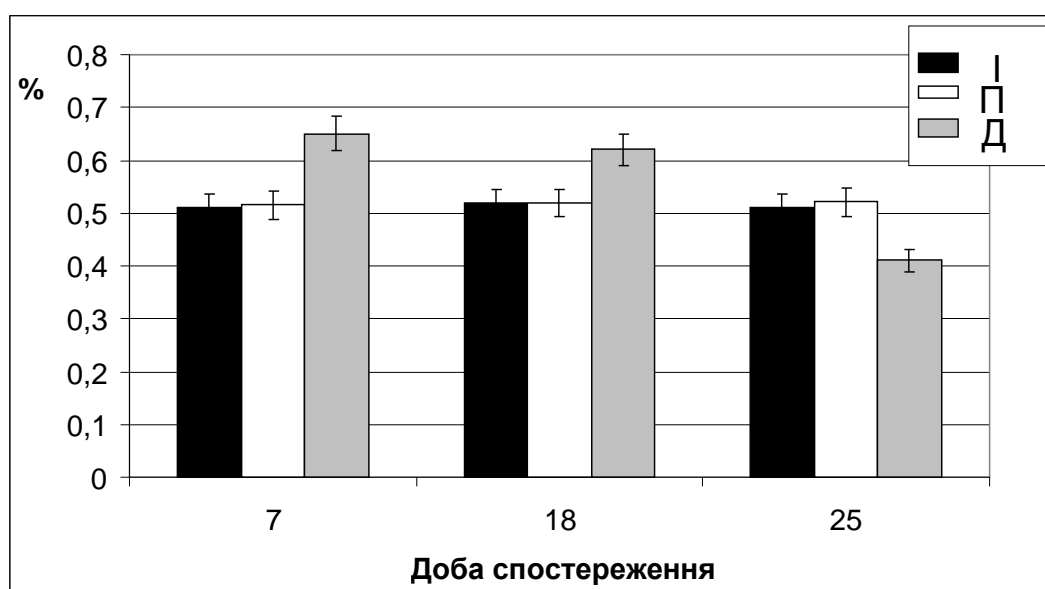


Рис. 3.45. Ваговий індекс селезінки за введення МСК культури червоного кісткового мозку: І – інтактні тварини; П – за введення плацебо; Д – дослідні тварини.

За впливу МСК культури червоного кісткового мозку їх вміст достовірно перевищував показники клітинності органа інтактних тварин та групи плацебо на 7-му і 18-ту добу спостереження, а на 25-ту добу був достовірно нижчим: $1,9 \pm 0,2 \times 10^6$ / мг проти $2,5 \pm 0,1 \times 10^6$ / мг у групах інтактних тварин і плацебо ($p < 0,05$).

Подібна динаміка спостерігалась стосовно вмісту лімфоїдних клітин у тканині селезінці (табл. 3.31). На 7-му добу дослідження показник

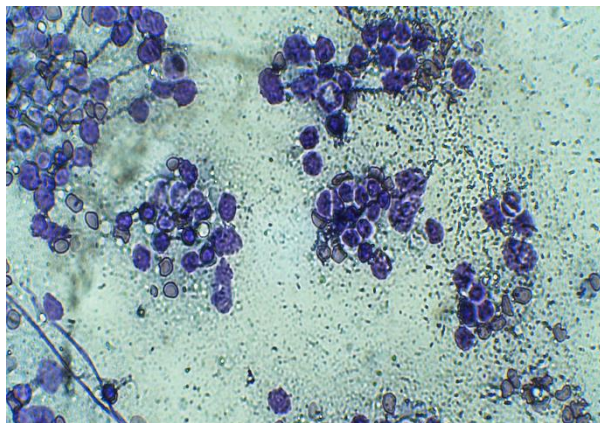
клітинності селезінки був достовірно вищий на 26 %, ніж в тварин контрольної групи та на 17 % від такого в групі плацебо (рис. 3.46).

Таблиця 3.31

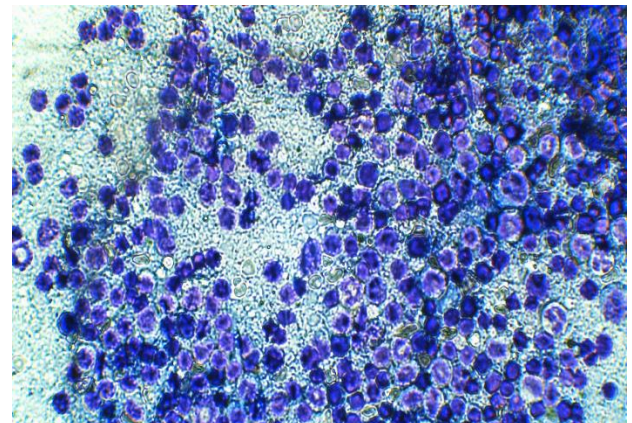
Вміст лімфоїдних клітин селезінки мишей C57Bl/6 за введення алогенних МСК культури червоного кісткового мозку, $M \pm m$, $n = 9$, $\times 10^6 / \text{мг}$

Термін дослідження	Вміст лімфоїдних клітин,		
	Групи тварин		
	інтактні	плацебо	дослідні
7-ма доба	$2,7 \pm 0,1$	$2,9 \pm 0,1$	$3,4 \pm 0,1^{** \vee}$
18-та доба	$2,7 \pm 0,1$	$2,8 \pm 0,4$	$3,1 \pm 0,1^{* \vee}$
25-та доба	$2,7 \pm 0,1$	$2,5 \pm 0,1$	$1,9 \pm 0,2^{* \vee}$

Примітки: * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$ порівняно з показниками інтактних тварин; \vee – $p < 0,05$ – порівняно з показниками тварин групи плацебо



А



Б

Рис. 3.46. Мазки-відбитки селезінки. Лімфоїдні клітини селезінки на 7-му добу досліду: А – інтактна група, Б – за введення МСК культури червоного кісткового мозку. Мікропрепарат. Фарбування за Папенгеймом, $\times 100$

На 25-ту добу спостереження кількість лімфоїдних клітин селезінки достовірно нижча у порівнянні з тваринами контрольної групи і групи плацебо на 42 % та на 32 %, відповідно.

У тварин дослідної групи ваговий індекс селезінки прямо корелював з вмістом лімфоїдних клітин в цьому органі на всіх етапах спостереження: $r = 0,99$; $p < 0,001$ (рис. 3.47).

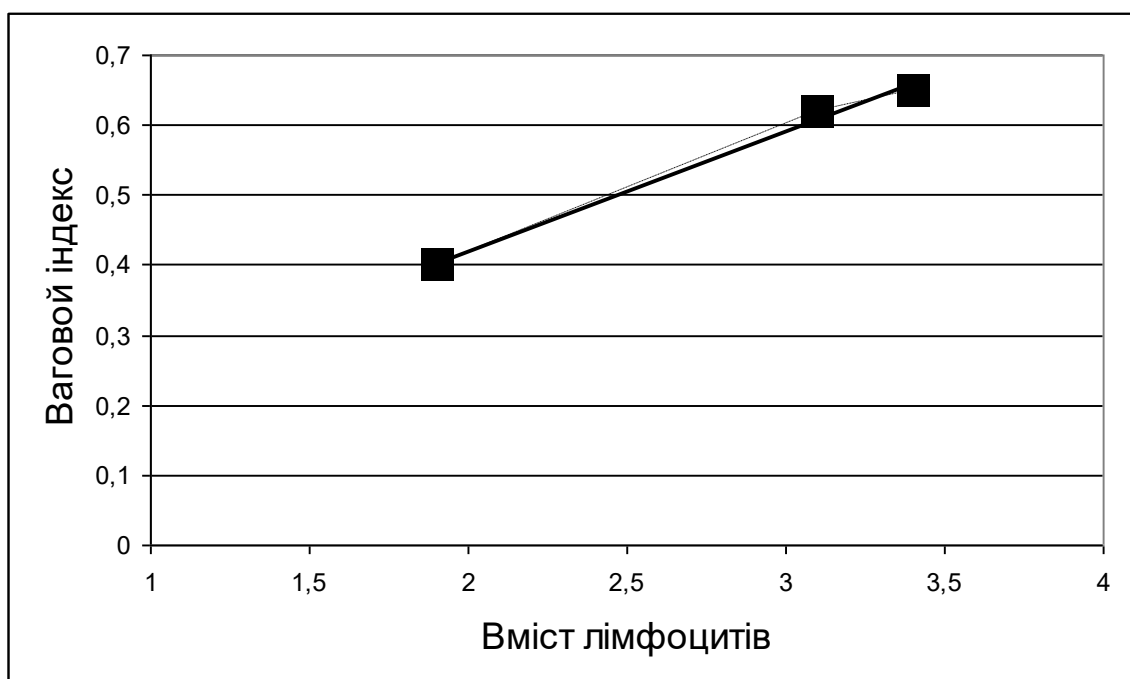


Рис. 3.47. Кореляційна залежність між ваговим індексом селезінки і вмістом лімфоїдних клітин у тварин дослідної групи.

Таким чином, системне введення МСК культури червоного кісткового мозку в організм мишей – реципієнтів на перших етапах призводило до короткострокового підвищення вагового індексу і вмісту лімфоїдних клітин в органах імунної системи (тимусі і селезінці). На 25-ту добу спостереження показники щодо тимусу поступово зменшувалися, але залишалися вищими за такі в контрольних групах тварин, а показники селезінки були, навіть, меншими за контрольні. Це свідчить на користь двофазного впливу МСК на імунні клітини організму: початкову активацію з наступним пригніченням,

що на нашу думку пов'язане з диференціюванням МСК в мікрооточенні і набуттям ними імуносупресивних властивостей.

3.2.2 Вплив алогенних мезенхімних стовбурових клітин культури жирової тканини на функціональний стан імунних органів мишей лінії C57Bl/6. Враховуючи, що функціональні властивості МСК різного походження дещо розрізняються, ми дослідили вплив на імунну систему мишей не тільки МСК культури червоного кісткового мозку, але і культури жирової тканини.

За системного введення МСК культури жирової тканини показник відносної ваги тимусу достовірно зростав вже на 7-му добу спостереження ($p < 0,05$) і перевищував показники в групі інтактних тварин та плацебо на всіх термінах спостереження (рис. 3.48).

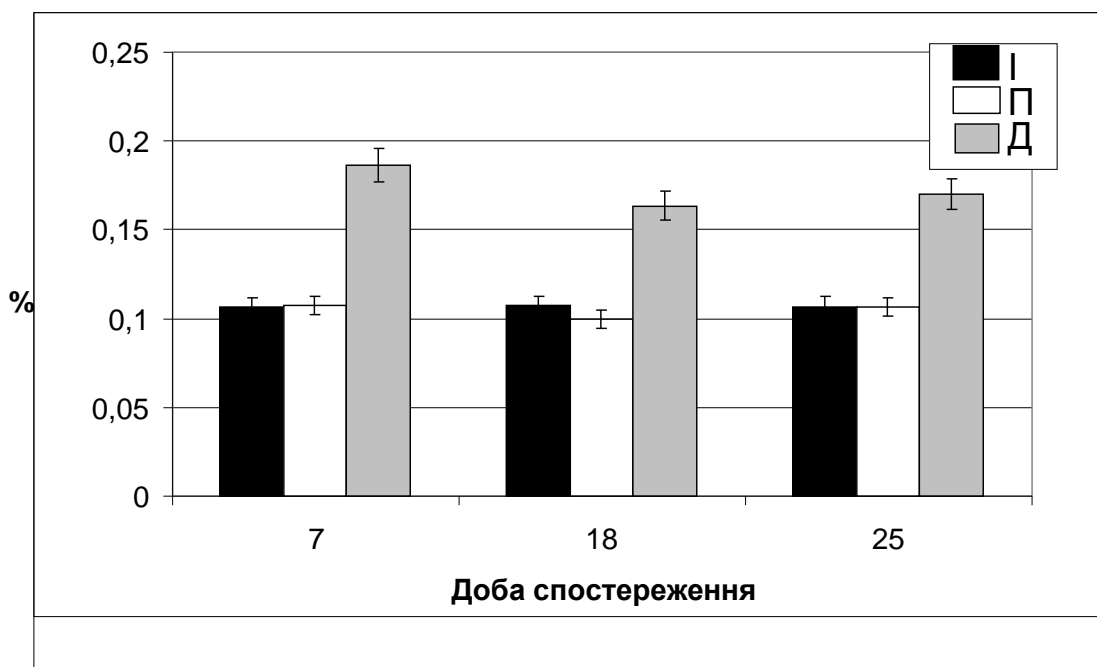


Рис. 3.48. Ваговий індекс тимусу за введення МСК культури жирової тканини: I – інтактні тварини; II – за введення плацебо; Д – дослідні тварини

У дослідних тварин за введення МСК культури жирової тканини достовірних розбіжностей у значеннях вагового індексу тимусу на 7-му, 18-ту і 25-ту добу спостереження не виявлено ($p > 0,05$).

Вміст лімфоїдних клітин тимусу при формуванні відповіді на трансплантацію алогенних МСК з жирової тканини на 7- та 18-ту добу достовірно зростав у порівнянні з тваринами контрольної групи та плацебо на 93 % та 42 % відповідно.

На пізніх етапах відповіді ми реєстрували також достовірно вищі показники кількості лімфоїдних клітин тимуса на 53 % та 86 % відповідно. Встановлено позитивний кореляційний зв'язок клітинності тимусу з ваговим індексом на усіх етапах імунної відповіді за трансплантації МСК з жирової тканини (табл. 3.32).

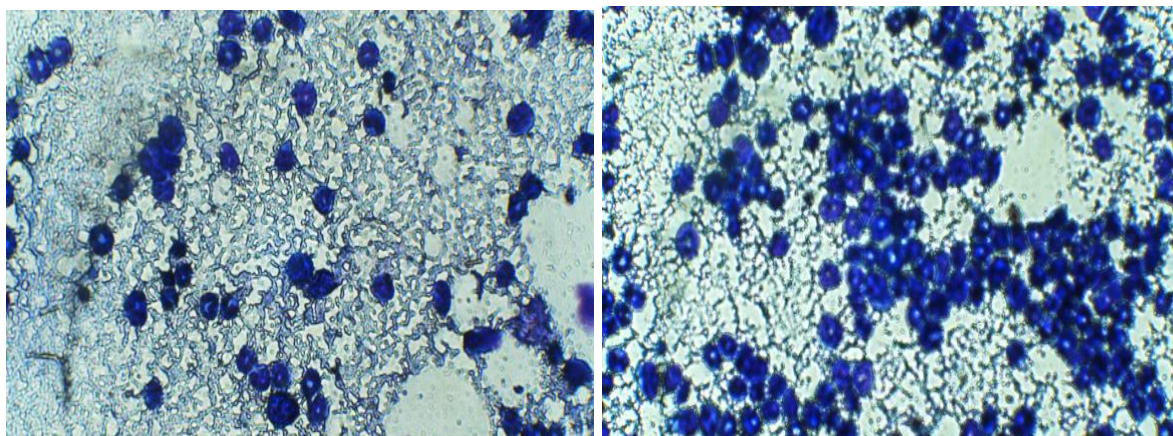
Таблиця 3.32

Вміст лімфоїдних клітин в тимусі мишей C57Bl/6 за введення алогенних МСК культури жирової тканини, $M \pm m$, $n = 9$, $\times 10^6/\text{мг}$

Термін дослідження	Вміст лімфоїдних клітин, $\times 10^6/\text{мг}$		
	Групи тварин		
	інтактні	плацебо	дослідні
7-ма доба	$1,4 \pm 0,1$	$1,9 \pm 0,2$	$2,7 \pm 0,1^*{}^v$
18-та доба	$1,4 \pm 0,1$	$1,3 \pm 0,1$	$2,2 \pm 0,1^{*v}$
25-та доба	$1,7 \pm 0,1$	$1,4 \pm 0,1$	$2,6 \pm 0,3^{*vv}$

Примітки: * – $p < 0,05$ – порівняно з показниками інтактних тварин; v – $p < 0,05$ – порівняно з показниками тварин групи плацебо

На сьому добу спостереження в мазках-відбитках тканини тимуса спостерігалась висока клітинність, поява крупних Т-лімфобластів, значної кількості дозріваючих та зрілих лімфоцитів, елементів строми (рис. 3.49).



А

Б

Рис. 3.49. Мазки-відбитки тимусу. Лімфоїдні клітини тимусу на 7-му добу дослідю: А – група інтактних тварин, Б – за введення МСК культури жирової тканини. Мікропрепарат. Фарбування за Папенгеймом, $\times 100$

За впливу МСК культури жирової тканини показник вагового індексу селезінки достовірно зростав до 18-ої доби від початку експерименту. На 25-ту добу ваговий індекс селезінки був достовірно нижчим за аналогічний показник на 7-иу та 18-ту добу спостереження ($p < 0,001$) та достовірно не відрізнявся від такого у тварин дослідної групи і плацебо (рис. 3.50).

Кількість лімфоїдних клітин в селезінці достовірно збільшувалась на 33 та 24 % у порівнянні з інтактними тваринами та групою плацебо відповідно на 7-му добу дослідження.

На 18-ту добу дослідження показники клітинності селезінки за впливу МСК культури жирової тканини були достовірно вищі на 18 % та 14 %, відповідно (табл. 3.33). На 24-ту добу експерименту показник кількості лімфоїдних клітин достовірно не відрізнявся від контрольних показників (рис. 3.51).

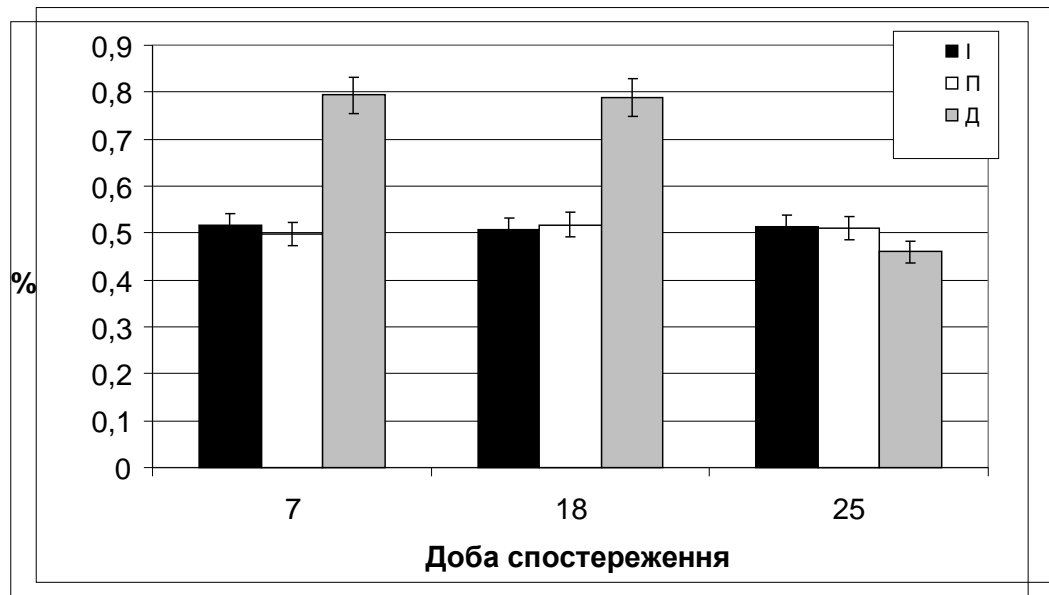


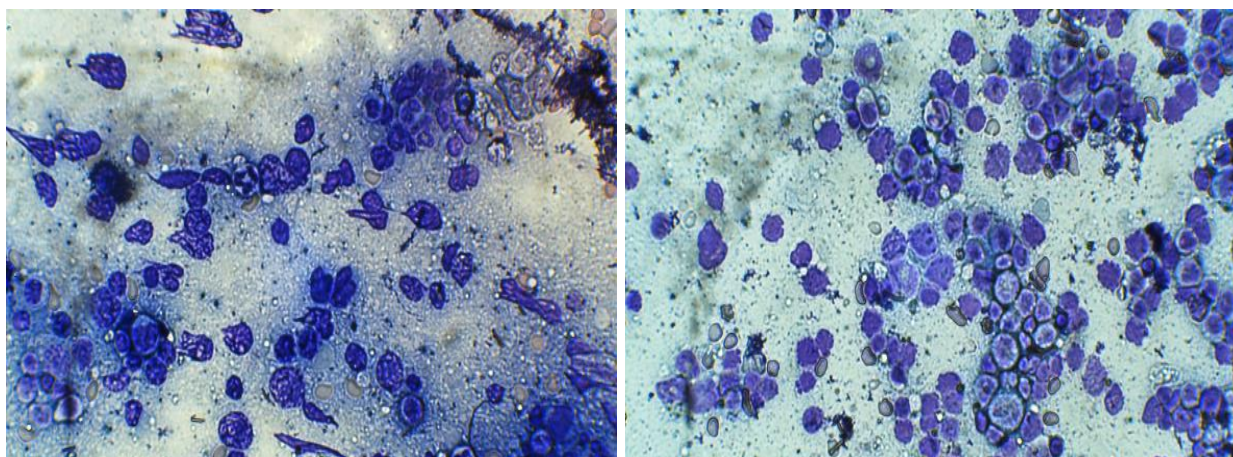
Рис. 3.50. Ваговий індекс селезінки за введення МСК культури жирової тканини: І – інтактні тварини; II – за введення плацебо; Д – дослідні тварини

Таблиця 3.33

Вміст лімфоїдних клітин селезінки мишей C57Bl/6 за введення алогенних МСК культури жирової тканини, $M \pm m$, $n = 9$, $\times 10^6/\text{мг}$

Термін дослідження	Вміст лімфоїдних клітин, $\times 10^6/\text{мг}$		
	Групи тварин		
	інтактні	плацебо	дослідні
7-ма доба	$2,7 \pm 0,1$	$2,9 \pm 0,1$	$3,6 \pm 0,1^{** \vee}$
18-та доба	$2,7 \pm 0,1$	$2,8 \pm 0,4$	$3,2 \pm 0,1^{* \vee}$
24-та доба	$2,7 \pm 0,1$	$2,5 \pm 0,1$	$2,9 \pm 0,1$

Примітки: * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; – порівняно з показниками інтактних тварин; \vee – $p < 0,05$ – порівняно з показниками тварин групи плацебо



А

Б

Рис. 3.51. Мазки-відбитки селезінки. Лімфоїдні клітини селезінки на 7-му добу досліду: А – інтактна група, Б – за введення МСК культури жирової тканини. Мікропрепарат. Фарбування за Папенгеймом, $\times 100$.

Ваговий індекс прямо корелював з вмістом лімфоїдних клітин на всіх етапах спостереження ($p < 0,05$).

У тварин дослідної групи ваговий індекс селезінки прямо корелював з вмістом лімфоїдних клітин в цьому органі на всіх етапах спостереження: $r = 0,837$; $p < 0,001$ (рис. 3.52).

Таким чином, системне введення МСК з жирової тканин на перших етапах призводить до короткострокового підвищення ваги і вмісту лімфоїдних клітин в центральних органах імунної системи (тимусі і селезінці), які поступово повертаються до нормальних показників.

Це свідчить про однотипність впливу на імунну систему реципієнтів МСК культури кісткового мозку та жирової тканини, хоча існують і певні відмінності, що залежить від функціонального стану МСК.

Аналізу цього питання присвячений наступний підрозділ.

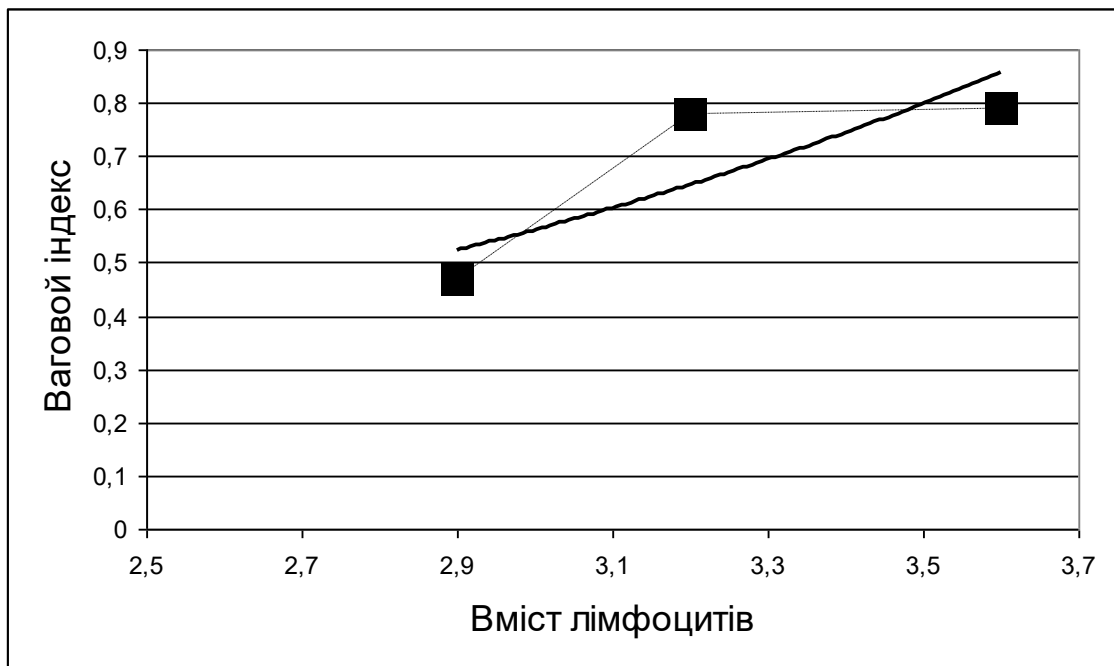


Рис. 3.52. Кореляційна залежність між ваговим індексом селезінки і вмістом лімфоїдних клітин у тварин дослідної групи.

3.2.3. Характеристика впливу алогенних мезенхімальних клітин кісткового мозку та жирової тканини на функціональний стан імунних органів мишей лінії C57Bl/6. Як видно з даних рис. 3.53 і рис. 3.54, системне введення МСК з кісткового мозку приводило до більш виразної активації тимусу (збільшення вагового індексу і клітинності), ніж введення МСК з жирової тканини.

На 18-ту добу спостереження за введення МСК з кісткового мозку ваговий індекс тимусу і клітинність органа були достовірно вищими ($p = 0,01$ та $p = 0,02$, відповідно), ніж за введення МСК з жирової тканини. На 7-му добу спостереження розбіжності між показниками вагового індексу були на рівні тенденції ($p = 0,09$), а клітинність тимусу не розрізнялась ($p > 0,05$). На 25-ту добу спостереження розбіжностей не виявлено.

Навпаки, системне введення МСК культури жирової тканини приводило до більш виразної активації селезінки (збільшення вагового індексу), ніж введення МСК культури кісткового мозку (рис. 3.55, рис. 3.56).

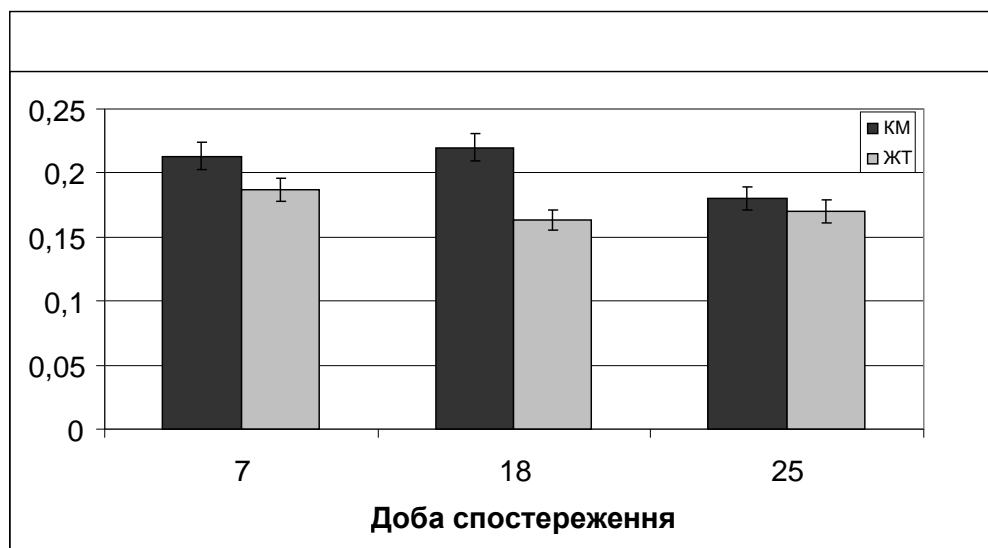


Рис. 3.53. Ваговий індекс тимусу в різні терміни спостереження за введення МСК культури червоного кісткового мозку та жирової тканини

На 7-му та 18-ту добу спостереження за введення МСК культури жирової тканини індекс маси селезінки був достовірно вищими ($p = 0,016$ та $p = 0,01$ відповідно), ніж за введення МСК з кісткового мозку. На 25-ту добу спостереження розбіжностей не виявлено.

Достовірних розбіжностей в клітинності селезінки за умов введення МСК різного походження не виявлено, крім 25-ї доби спостереження.

Таким чином, МСК культури жирової тканини і червоного кісткового мозку мають однаковий за спрямованістю вплив на імунну систему реципієнтів, однак дещо розрізняються за інтенсивністю впливу на окремі ланки імунної системи: МКС культури кісткового мозку більш активні по відношенню до тимусу (Т-клітинний імунітет), МСК з жирової тканини мають переважний вплив на селезінку як один з центральних органів В-ланки імунітету.

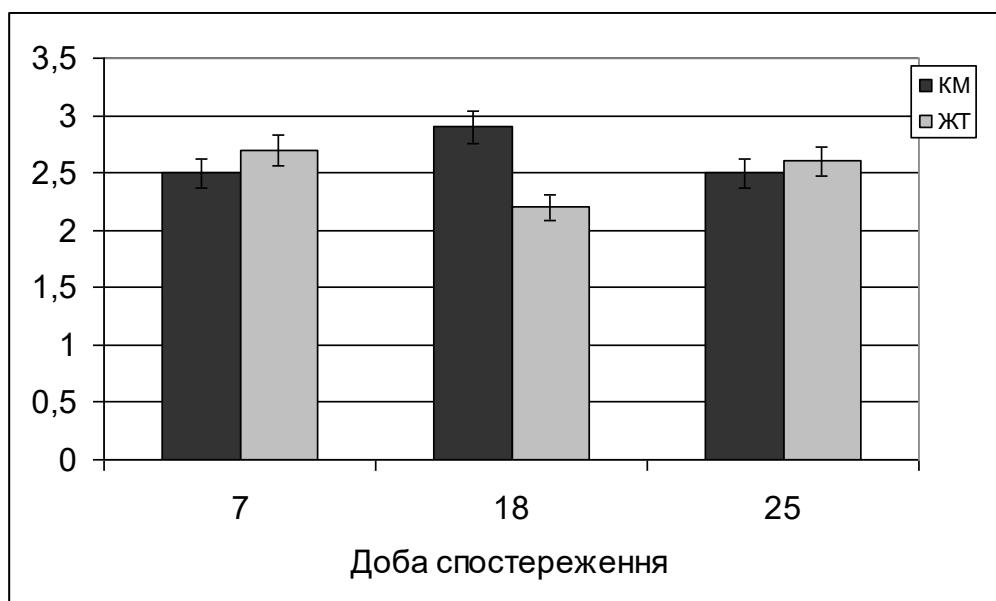


Рис. 3.54. Клітинність тимусу в різні терміни спостереження за введення МСК культури червоного кісткового мозку та жирової тканини

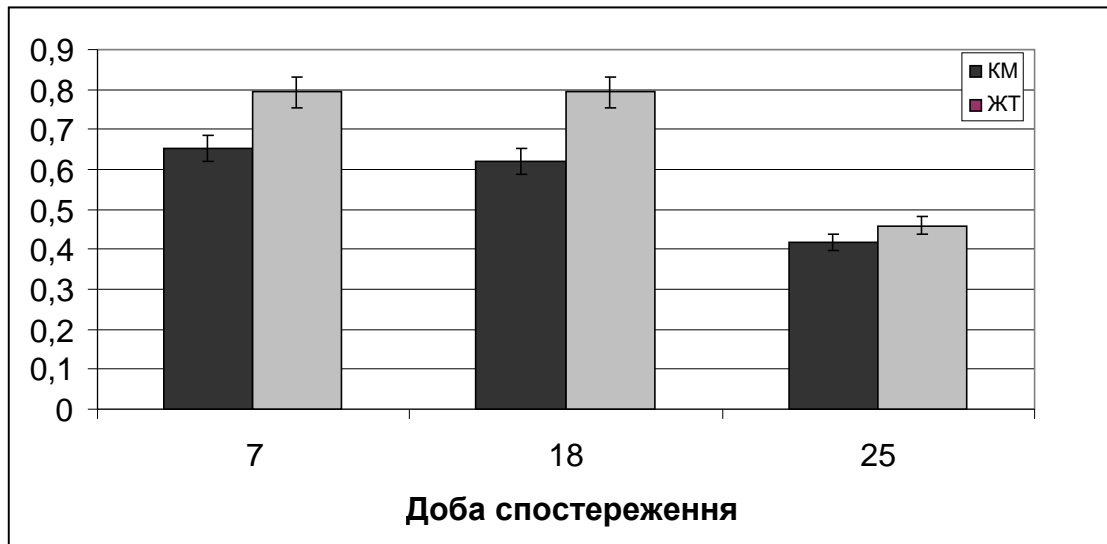


Рис. 3.55. Ваговий індекс селезінки в різні терміни спостереження за введення МСК культури червоного кісткового мозку та жирової тканини

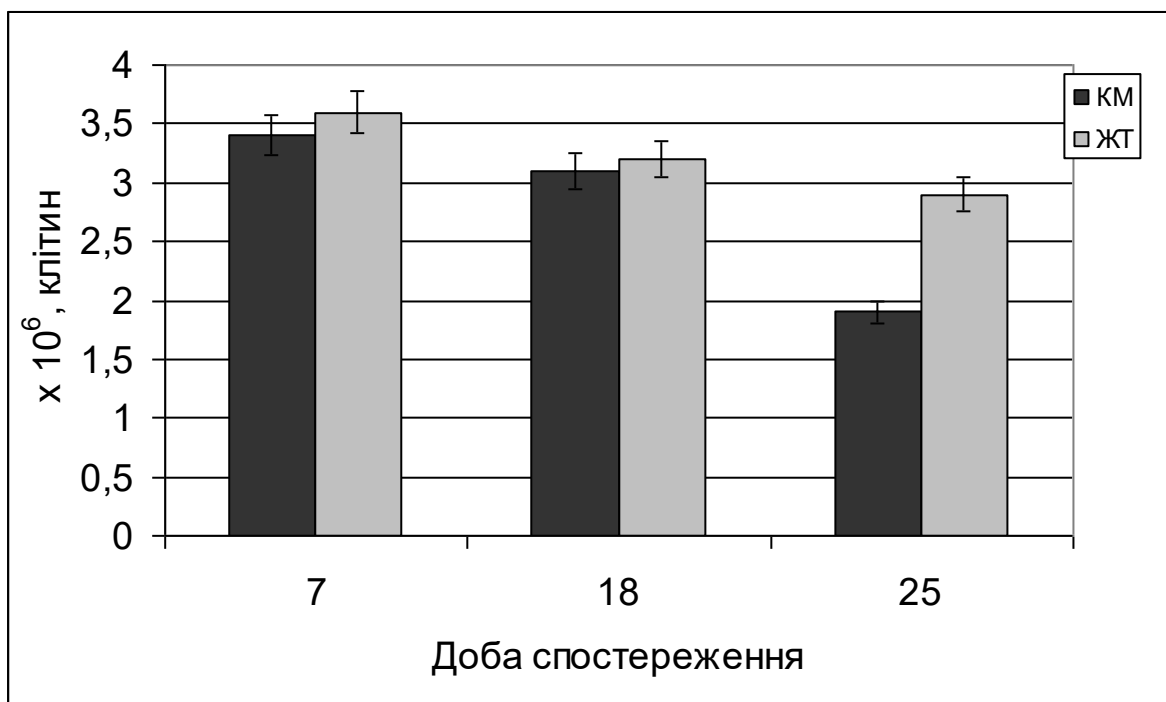


Рис. 3.56. Клітинність селезінки в різні терміни спостереження за введення МСК культури червоного кісткового мозку та жирової тканини.

3.2.4 Біохімічні показники сироватки крові мишей C57Bl/6 та функціональний стан гепатоцитів за трансплантації аlogenних МСК культури червоного кісткового мозку та жирової тканини. Доцільною є всебічна оцінка ефективності проведеної клітинної терапії на загальний стан організму з врахуванням впливу не лише на орган-мішень патологічного стану, імунологічний статус організму реципієнта, але й на біохімічні показники, які часто знаходяться поза увагою дослідників.

Тому метою даного етапу роботи було визначення біохімічних показників сироватки крові експериментальних тварин за системного введення аlogenних МСК кісткового мозку та жирової тканини.

Найбільш значимі з біохімічних показників у сироватці крові є загальна концентрація білків, співвідношення глобулінових та альбумінових фракцій, кінцевих продуктів білкового обміну, а також деяких ферментів.

У всіх групах тварин біохімічні показники знаходились у межах норми (табл. 3.34).

Таблиця 3.34

Біохімічні показники сироватки крові мишей C57 ВІ/6 за трансплантації алогенних МСК культури червоного кісткового мозку та жирової тканини, $M \pm m$, $n = 5$

Показник	Групи тварин			
	Інтактні, ($n = 5$)	Плацебо, ($n = 5$)	МСК культури кісткового мозку, ($n = 5$)	МСК культури жирової тканини, ($n = 5$)
Загальний білок, г/л	$69,7 \pm 1,7$	$70,7 \pm 1,7$	$72,4 \pm 7,5$	$73,8 \pm 4,5$
Альбуміни, г/л	$39,4 \pm 1,4$	$43,5 \pm 2,9$	$35,3 \pm 0,6^{*\wedge}$	$36,4 \pm 1,2^{*\wedge}$
Загальний білірубін, мкмоль/л	$10,6 \pm 1,9$	$10,6 \pm 1,4$	$2,2 \pm 1,0^{*\wedge}$	$3,4 \pm 1,2^{*\wedge}$
Креатинін, мкмоль/л	$19,2 \pm 1,1$	$19,9 \pm 2,7$	$26,8 \pm 1,7^{*\wedge}$	$24,8 \pm 1,5^{*\wedge}$
Сечовина, ммоль/л	$15,4 \pm 1,6$	$14,9 \pm 1,6$	$8,4 \pm 1,0$	$9,5 \pm 1,3$
АлАт, Од/л ммоль/л х год	$70,9 \pm 1,9$	$71,0 \pm 1,6$	$78,2 \pm 1,1$	$76,2 \pm 1,5$
АсАт, Од/л ммоль/л х год	$430,0 \pm 53,4$	$462,8 \pm 35,5$	$312,0 \pm 42,4^{*\wedge}$	$332,0 \pm 22,4^{*\wedge}$

Примітки: ** – $p < 0,01$, *** – $p < 0,001$ у порівнянні з показниками тварин інтактної групи; \wedge – $p < 0,01$, $\wedge\wedge$ – $p < 0,001$ у порівнянні з показниками тварин, яким вводили 0,89 % NaCl

На 18 добу після трансплантації МСК концентрація загального білка у сироватці крові не мала достовірних відмінностей у всіх групах тварин. Проте, вміст фракції альбумінів достовірно знижувався у тварин, яким вводились МСК, а, отже, фракція глобулінів, достовірно зростала у тварин

цих груп. За наведених даних в таблиці 3.34 видно, що вміст загального білірубіну достовірно знизився майже у три та п'ять разів у тварин, яким були введені МСК культури жирової тканини та червоного кісткового мозку, відповідно в порівнянні з контролем та групою плацебо.

Уміст креатиніну достовірно зростав до $26,8 \pm 1,7$ ($p < 0,05$) та $24,8 \pm 1,5$ ($p < 0,05$) ммоль/л. Це може бути пов'язано з більш інтенсивним процесом утворення ендogenous креатиніну. Водночас, ми зареєстрували тенденцію до зниження вмісту сечовини до $8,4 \pm 1,0$ та $9,5 \pm 1,3$ ммоль/л у тварин, яким вводили МСК червоного кісткового мозку та жирової тканини, відповідно.

Уміст аланінамінотрансферази (АлАт) достовірно не змінювався, тоді як вміст аспартатамінотрансферази (АсАт) достовірно знижувався на 38 % і 30 % у тварин, яким вводили МСК культури кісткового мозку та жирової тканини у порівнянні з контролем та на 48 % ($p < 0,05$) і 39 % ($p < 0,05$) у порівнянні з плацебо.

Таким чином, за системного введення МСК культури жирової тканини та червоного кісткового мозку біохімічні показники сироватки крові тварин залишаються в нормі. Деякі з показників мають тенденцію до зниження. Це відображає відсутність суттєвого впливу мезенхімних стовбурових клітин на функціональну активність паренхіматозних органів та свідчить на користь їх безпечного застосування.

3.2.5 Активність сукцинатдегідрогенази внутрішньої мембрани мітохондрій печінки тварин за впливу алогенних мезенхімних стовбурових клітин. На сучасному етапі розвитку клітинної біології проводяться всебічні дослідження імуномодуючих та протизапальних механізмів впливу мезенхімних стовбурових клітин при експериментально змодульованих процесах. З літературних джерел відомо, що мезенхімні стовбурові клітини стимулюють відновлення тканин у різних моделях захворювань, включаючи кардіоміопатію, легеневі ушкодження, церебральні

ішемічні інсульти та нейродегенеративні порушення, такі як хвороба Альцгеймера та Паркінсона. Було запропоновано декілька механізмів, які опосередковують ці сприятливі ефекти МСК, включаючи пригнічення запалення і вивільнення факторів росту.

Мітохондрії являються цитоплазматичними органелами клітин і функціонують в якості енергетичних станцій для виробництва аденозинтрифосфату. Однак, вони додатково приймають участь у різних внутрішньоклітинних процесах, таких як індукція апоптозу, регуляція клітинного циклу, проліферативна активність, диференціювання, перепрограмування, старіння. Зміна морфології мітохондрій тісно пов'язана з їх функціональністю. Мітохондріальна дисфункція асоційована зі старінням організму, втратою синаптичних нервових клітин і загибеллю клітин за багатьох неврологічних захворювань.

Одним з основних маркерних ферментів мітохондрій, що задіяні в окисному фосфорилуванні, є сукцинатдегідрогеназа (СДГ). Зміна активності цього ферменту спряжена також із змінами регуляції клітинного циклу. Метаболічний фенотип клітин за різних патологій, які характеризуються зростанням мітотичної активності, пригніченням каскадів апоптичної загибелі, порушенням прооксидантно-антиоксидантної рівноваги, неможливий без змін структури та функцій мембран мітохондрій.

Визначення активності СДГ може бути маркерним параметром функціонального стану мітохондрій. Раніше нами було визначено вплив алогенних мезенхімальних клітин на активність основних ферментів в сироватці крові експериментальних тварин за умов пухлинного росту [2]. Порушення функції мітохондріальних ферментів в печінці може вказувати на загальний метаболічний синдром за даної патології.

При визначенні маркерного ферменту мітохондріальних мембран в групах експериментальних тварин було показано достовірне підвищення активності сукцинатдегідрогенази в мітохондріях гепатоцитів тварин за

впливу МСК культури жирової тканини в 1,3 та за впливу МСК культури червоного кісткового мозку в 1,2 рази порівняно з групою інтактних тварин (табл. 3.35).

Таблиця. 3.35

Активність сукцинатдегідрогенази внутрішньої мембрани мітохондрій печінки мишей C57Bl/6 за впливу алогенних мезенхімних стовбурових клітин, $M \pm m$, $n = 5$, мкмоль $K_3[Fe(CN)_6]/мг \cdot хв$

Групи тварин			
Інтактні	уведення 0,89 % NaCl	уведення МСК культури ЖТ	уведення МСК культури КМ
$45,9 \pm 0,7$	$43,3 \pm 1,2$	$57,7 \pm 1,6^{**\wedge}$	$53,3 \pm 1,4^{*\wedge}$

Примітки: * – $p < 0,01$, ** – $p < 0,001$ у порівнянні з показниками тварин інтактною групи; ^ – $p < 0,001$ у порівнянні з показниками тварин, яким вводили 0,89 % NaCl

Було встановлено, що на 12-ту добу дослідження активність СДГ в тварин, яким вводили МСК культури жирової, складала $57,7 \pm 1,6$ мкмоль $K_3[Fe(CN)_6] / мг \cdot хв$ ($p < 0,001$), що достовірно вище за показники тварин першої та другої контрольних груп, які становили $45,9 \pm 0,7$ та $43,3 \pm 1,2$ мкмоль $K_3[Fe(CN)_6] / мг \cdot хв$ відповідно.

Активність СДГ в тварин, яким вводили МСК культури червоного кісткового мозку, була також достовірно вищою за показники контрольних груп і становила $53,3 \pm 1,4$ мкмоль $K_3[Fe(CN)_6] / мг \cdot хв$ ($p < 0,01$). Ми не виключаємо, що зміни активності СДГ мітохондрій печінки тварин за впливу алогенних МСК можуть бути пов'язані з мітохондріальним транспортом від трансплантованих МСК до клітин печінки тварин-реципієнтів.

Треба зазначити, що показник активності СДГ мітохондрій печінки тварин-реципієнтів за впливу МСК культури жирової тканини достовірно вищий від такого за впливу МСК культури червоного кісткового мозку ($p <$

0,05). На нашу думку, такі результати можуть пояснюватись неоднаковим вмістом жирних кислот у ліпідах МСК КМ та МСК ЖТ. За результатами наших досліджень, достовірно вищим є вміст $\omega 3$ жирних кислот у ліпідах зразків МСК ЖТ, ніж в МСК КМ. Також це перекикається з особливостями перебігу клітинного циклу МСК ЖТ та МСК КМ. МСК ЖТ на пізніх пасажах характеризуються достовірно вищим вмістом клітин проліферативної фази на відміну від МСК КМ, тоді як серед МСК КМ переважає відсотковий вміст клітин у фазі спокою.

3.2.6 Вплив трансплантації алогенних МСК на оксигензалежний метаболізм перитонеальних макрофагів мишей C57BL/6. З метою визначення впливу МСК не тільки на органи лімфоцитогенезу, але і на макрофаги як центральну ланку системи вродженого імунітету, ми 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 (табл. 3.36).

Таблиця 3.36

Активність перитонеальних макрофагів мишей C57BL/6 за впливу алогенних МСК культури червоного кісткового мозку, $M \pm m$, у. о.

Групи тварин	Активність		Показник стимуляції, %
	спонтанна	індукована	
Інтактні, (n = 8)	$0,25 \pm 0,02$	$0,34 \pm 0,02^{\wedge}$	36
Введення МСК, (n = 8)	$0,6 \pm 0,13^{***}$	$0,59 \pm 0,11$	-12

Примітки: ** – $p < 0,01$, *** – $p < 0,001$ у порівнянні з показниками тварин інтактної групи; \wedge – $p < 0,01$, $\wedge\wedge$ – $p < 0,001$ у порівнянні з показниками тварин, яким вводили 0,89 % NaCl

Додаткова стимуляція зимозаном у інтактних тварин викликала підвищення метаболічної активності ($p < 0,05$), що свідчило про наявність функціональних резервів клітин. Водночас, за впливу МСК додаткової стимуляції перитонеальних макрофагів не відбувалось, що вказує на відсутність функціонального резерву клітин, зумовлену перебуванням їх у активному стані.

Таким чином, системне введення алогенних МСК культури червоного кісткового мозку призводить до різкого підвищення активності НАДФ-Н2-оксидази моноцитів/макрофагів, що є необхідною умовою для їх подальшого диференціювання в М2 макрофаги.

3.2.7. Вплив трансплантації алогенних МСК на розвиток пухлин у мишей C57Bl/6. З метою визначення достовірної онкологічної трансформації МСК, введених в організм інтактних тварин, нами було проведено спостереження за трьома групами мишей: тварини, яким не проводили жодних маніпуляцій; тварини, яким вводили у хвостову вену 0,5 мл фосфатно-буферного розчину без МСК та дослідна група тварин, яким у хвостову вену вводили 10^4 МСК у 0,5 мл фосфатно-буферного розчину. Кожна з описаних вище груп складалась із 50 тварин.

Спостереження проводили протягом трьох місяців. Всі тварини знаходились на звичайному раціоні харчування, який відповідав потребі в поживних речовинах, мікро-, макроелементах та вітамінах, та мали вільний доступ до води.

Протягом періоду спостереження не було зафіксовано появи пухлин в жодної тварини усіх дослідних груп.

Висновки до підрозділу 3.2

Підсумовуючи результати даного підрозділу дисертаційного дослідження, можна зробити наступні висновки:

1. Системне введення МСК культури кісткового мозку та жирової тканини здоровим тваринам не призводить до індукції пухлинного росту, переноситься без ускладнень, біохімічні показники сироватки крові залишаються в нормі, а окремі з них мають тенденцію до зниження (білірубін, сечовина, аспартатамінотрансфераза). Це засвідчує про відсутність негативного впливу МСК на функціональні властивості паренхіматозних органів організму тварин-реципієнтів.

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

3. Системне введення МСК з жирової тканини та кісткового мозку впливає на стан органів імунної системи тварин. Внутрішньовенне введення мезенхімних стовбурових клітин культури жирової тканини 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 або стан їх пригнічується; підвищення активності НАДФ-Н₂-оксидази моноцитів, макрофагів, а саме моноцитів/ макрофагів, що є необхідною умовою для їх подальшого диференціювання в М2 макрофаги.

4. МСК жирової тканини і кісткового мозку мають однаковий за спрямованістю вплив на імунну систему реципієнтів, однак розрізняються за інтенсивністю впливу на окремі ланки імунної системи: МСК культури кісткового мозку більш активні по відношенню до тимусу (Т-клітинний імунітет), МСК культури жирової тканини мають більш виразний вплив на селезінку як центральний орган В-ланки імунітету.

Результати підрозділу опубліковані в працях [2, 10, 15, 37, 53, 189, 241, 416, 435, 442, 447].

3.3 Вплив мезенхімних стовбурових клітин на пухлинний процес на моделі метастазуючої карциноми легені Льюїс

3.3.1. Вплив мезенхімних стовбурових клітин на швидкість росту і метастазування перевивної карциноми легені Льюїс. Самцям мишей лінії C57Bl/6 2 - 3-місячного віку, вагою 20 - 22 г, внутрішньом'язово в ділянці стегна інокулювали клітинну суспензію метастатичної карциноми легені Льюїс у концентрації 1×10^6 життєздатних клітин у загальному об'ємі 0,1 мл розчину Хенкса.

Як зазначалось, після інокуляції пухлинних клітин миші були розділені на три групи. Перша дослідна група включала тварин-пухлиноносіїв (LLC), друга – тварин пухлиноносіїв, яким вводили МСК (LLC + МСК), третя – тварин - пухлиноносіїв, яким вводили 0,89 % NaCl у дозі 0,5 мл/тварину (LLC + 0,89% NaCl . Мишам другої дослідної групи на 8-й день після інокуляції пухлинних клітин вводили внутрішньовенно алогенні МСК 4-го пасажу в концентрації $1,25 \times 10^4$ на тварину.

Життєздатність культури пухлинних клітин, яку ми перевіряли перед введенням тваринам, становила 87 ± 5 %.

Активний ріст інокульованої LLC спостерігався, починаючи з 8-ї доби пересадки пухлинних клітин (табл. 3.37). Починаючи з 11-ої доби ми зареєстрували достовірне зниження показника ваги тварин другої групи у порівнянні з такими першої, що обернено корелює із зміною діаметру пухлини. Таким чином, на 17-ту добу експерименту діаметр пухлини у мишей за впливу МСК був більше в 1,5 рази, а вага тварин була меншою на 8 %. Поканики ваги та діаметру пухлини третьої групи достовірно не

відрізнялися від таких першої. Це засвідчує що за впливу фізіологічного розчину туморогенез у тварин не змінюється.

Таблиця 3.37

**Показники ваги тварин та діаметру первинної пухлини в мишей
C57Bl/6 з трансплантованої карциномою легені Льюїс, $M \pm m$, $n = 24$**

Доба після трансплан тації клітин LLC	Вага тварин, г, I група	Діаметр пухлини, мм, I група	Вага тварин, г, II група	Діаметр пухлини, мм, II група	Вага тварин, г, III група	Діаметр пухлини, мм, III група
8-ма	21,4±0,4	4,8±0,2	20,2±0,7	5,0±0,2	21,3±0,4	4,9±0,3
11-та	21,3±0,5	5,3±0,5	20,9±0,6	7,3±0,2*	21,4±0,3	5,2 ± 0,5
14-та	21,4±0,2	6,2±0,7	19,9±0,6*	9,5±0,4*	21,4±0,5	6,3±0,5
18-та	20,6±0,8	8,1±0,4	18,9±0,4*	12,3±0,3 *	20,4±0,6	8,2±0,4

Примітки: * – $p < 0,05$ порівняно з тваринами I і III груп

Пухлинні клітини активно проліферували у підшкірній тканині, утворюючи ущільнення, потім пухлинний вузол, якій поступово проростав у дерму. На пізніх етапах росту спостерігали нерівномірний, бугристий ріст пухлини, відносну нерухомість стосовно оточуючих тканин і проростання у них, появу геморагій на шкірі. На 18-ту добу спостереження маса первинної пухлини в контрольних групах тварин наближувалась до 2 г, що відповідає 10 % загальної маси тіла тварин.

На 7 - 8 добу після інокуляції пухлина починає активно метастазувати. На 18-ту добу метастази у легенях були виявлені в усіх тварин.

Як видно з даних табл. 3.38, на 18-ту добу досліджень показники маси первинної пухлини у тварин за впливу МСК та тварин-пухлиноносіїв груп контролю достовірно відрізняються.

Таблиця 3.38

**Показники маси первинної пухлини та об'єму метастазів у мишей
C57BL/6 з трансплантованої карциномою легень Льюїс, 18-та доба
досліджень, $M \pm m$, $n = 24$**

Показники	LLC	LLC + МСК	LLC + 0,89 % NaCl
Маса пухлини, г	$1,83 \pm 0,08$	$2,57 \pm 0,21^{*\wedge}$	$1,75 \pm 0,1$
Загальний об'єм метастазів, мм ³	$10,28 \pm 0,85$	$29,62 \pm 6,50^{*\wedge}$	$9,68 \pm 0,95$

Примітки: * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$, *** – $p < 0,001$ порівняно з показниками тварин першої групи; \wedge – $p < 0,05$, $\wedge\wedge$ – $p < 0,01$; $\wedge\wedge\wedge$ – $p < 0,001$ – порівняно з показниками тварин третьої групи

В дослідній групі спостерігається перевищення показника маси первинної пухлини в середньому на 39 % порівняно з контролем ($p < 0,05$).

Розмір, загальний об'єм віддалених метастазів та їх кількість засвідчує швидкість проліферації пухлинних клітин, ступінь васкуляризації пухлинної тканини і рівень злоякісності процесу в цілому, а також дає можливість прогнозу перебігу останнього.

Встановлено, що показник загального об'єму метастазів у тварин дослідної групи суттєво підвищений, а саме у 2,9 рази ($p < 0,05$) у порівнянні з тваринами-пухлиноносіями контрольних груп (див. табл. 3.37), що підтверджується і дисперсійним аналізом. Застосування МСК у мишей з трансплантованою карциномою легені Льюїс чинить сильний вплив на збільшення показника загального об'єму метастазів $\eta^2 = 0,74$, $p < 0,05$.

Ріст пухлини залежить від ступеня розвитку в ній судинної сітки. В новоутвореннях діаметром менше 1 мм поживні речовини і кисень надходять із тканинної рідини шляхом дифузії. Для живлення більших за розміром новоутворень необхідна васкуляризація їх тканини. Тобто, за розміром метастатичного вогнища можна зробити висновок щодо ступеня

його васкуляризації. Треба зауважити, що на 18-ту добу у тварин дослідної групи за впливу МСК зареєстровано появу метастазів розміром 0,5 - 2 мм, в той час як у тварин без впливу МСК розмір метастазів не перевищував 1 мм. Таким чином, за впливу МСК пухлинний процес швидше переходить у васкулярну стадію, що засвідчує підвищення рівня злоякісності останнього.

Оскільки процес метастазування епідерміоїдної карциноми легені Льюїс припадає на 24-ту добу, саме у цей термін спостереження ми досліджували вплив алогенних МСК на біологічні властивості первинної пухлини та процес метастазування.

Встановлено, що показник загального об'єму метастазів на 24-ту добу експеримента у тварин-пухлиноносіїв за впливу МСК достовірно вищий, а саме він у 2,3 рази перевищує відповідні показники у мишей контрольних груп (табл. 3.39).

Таблиця 3.39

**Кількість та об'єм метастазів у мишей C57Bl/6 з
трансплантованої карциномою легені Льюїс за впливу МСК на 24-ту
добу дослідження, $M \pm m$, $n = 6$**

Показники	LLC, 1 група	LLC + МСК, 2 група	LLC + 0,89 % NaCl, 3 група
Загальна кількість метастазів, шт	27,29 \pm 8,26	40,67 \pm 9,57	26,52 \pm 5,43
Загальний об'єм метастазів, мм ³	17,94 \pm 6,59	41,52 \pm 7,9* ^	16,43 \pm 5,32

Примітки: * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$, *** – $p < 0,001$ порівняно з показниками тварин першої групи; ^ $p < 0,05$, ^^ – $p < 0,01$; ^^ – $p < 0,001$ – порівняно з показниками тварин третьої групи

Прослідковується також тенденція до збільшення загальної кількості метастазів у тварин дослідної групи у порівнянні з контролем.

За результатами дисперсійного аналізу отриманих показників сила впливу МСК на загальний об'єм метастазів складає $\eta^2x = 0,26$ при $p < 0,05$. Це дозволяє нам стверджувати, що застосування МСК за перебігу пухлинного процесу чинить вплив на збільшення показника загального об'єму метастазів. Ріст пухлин залежить від ступеня розвинення в них судинної сітки. У тварин дослідної групи було виявлено більшу кількість метастазів у легені розміром 1 - 3 мм, в той час як у тварин контрольних груп більшість метастазів була розміром до 1 мм. Сумарна кількість метастазів розміром 1,0 - 3,0 мм у тварин за впливу МСК становить 52,5 %, що достовірно більше, ніж в тварин першої і третьої дослідних груп ($p < 0,05$). У тварин-пухлиноносіїв контрольних груп цей показник становив 31,4 % в I-й групі і 28,6 % в III-й групі, що достовірно нижче ($p < 0,05$) (табл. 3.40., рис. 3.57).

Таблиця 3.40

**Кількість метастазів за розмірами у мишей C57Bl/6 з
трансплантованої LLC на 24-ту добу дослідження, $M \pm m$, $n = 6$, мм**

Групи тварин	Розмір метастазів					
	0,5	1	1,5	2	2,5	3
LLC	68,60 \pm 2,3	19,8 \pm 1,4	6,3 \pm 1,3	3,7 \pm 0,9	1 \pm 0,2	0,6 \pm 0,1
LLC+МСК	47,50 \pm 1,2	28,3 \pm 1, 3*	13,3 \pm 2, 4*	8,3 \pm 1,3*	1,7 \pm 0,5*	0,9 \pm 0,1
LLC+0,89 % NaCl	71,4 \pm 2, 1	18,2 \pm 0, 4	6,0 \pm 1,4	3,1 \pm 1,2	0,8 \pm 0,2	0,5 \pm 0,1

Примітки: * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$, *** – $p < 0,001$ порівняно з показниками тварин першої групи; ^ – $p < 0,05$, ^^ – $p < 0,01$; ^^ – $p < 0,001$ – порівняно з показниками тварин третьої групи

Водночас, кількість великих метастазів (діаметр яких перевищує 2,5 мм) в тварин дослідних груп статистично значимо не розрізнялась.

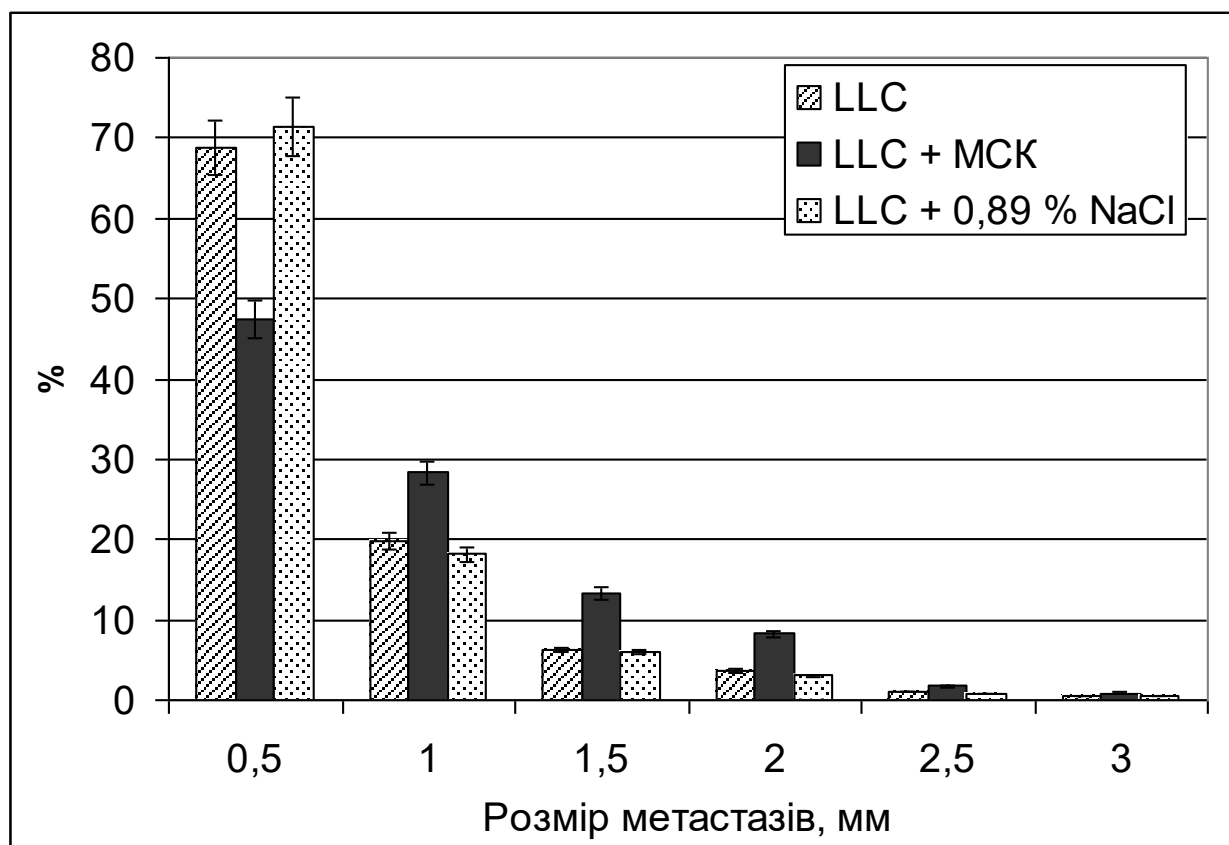


Рис. 3.57. Кількість метастазів за розмірами у мишей C57BL/6 з трансплантованої LLC на 24-ту добу дослідження в різних групах дослідних тварин.

Така динаміка свідчить про суттєвий вплив МСК саме на початкові процеси метастазування, внаслідок чого прискорюється перехід метастатичного пухлинного процесу у васкулярну стадію.

Таким чином, застосування алогенних МСК чинить негативний вплив на перебіг пухлинного процесу у мишей з трансплантованої карциномою легень Льюїс.

За впливу алогенних МСК маса первинної пухлини достовірно зростає. Застосування МСК у мишей з трансплантованою карциномою легень Льюїс збільшує показник загального об'єму метастазів ($\eta^2x = 0,26$, $p < 0,05$).

Пухлинний процес на 18-ту і 24-ту добу дослідження переходить у васкулярну стадію швидше, що засвідчує вищий показник кількості

метастазів розміром 1,0 - 3,0 мм – 52,5% ($p < 0,05$)

Ще однією особливістю було збільшення кількості лімфоїдних клітин, асоційованих з пухлиною – так званих пухлино-асоційованих лімфоцитів, за впливу МСК. Нами встановлено, що інтенсивність інфільтрації пухлини лімфоцитами за впливу МСК достовірно зростала в 1,3 рази (табл. 3.41).

Таблиця 3.41

**Кількість пухлино-асоційованих лімфоцитів, $\times 10^6$ /г пухлинної
тканини, $M \pm m$, $n = 8$, шт.**

Групи тварин	Кількість лімфоцитів
II (LLC пухлиноносії)	$1,83 \pm 0,35$
II (LLC + МСК)	$2,72 \pm 0,11^*$
III (LLC + фізіол. розчин)	$1,79 \pm 0,29$

Примітка: * – $p < 0.05$ у порівнянні з тваринами-пухлиноносіями, яким не вводили МСК

Є дані, що пухлино-асоційовані лімфоцити беруть участь у активації ангиогенезу в пухлинній тканині як продуценти фактору росту ендотелію судин VEGF [326].

Тому отримані нами результати співпадають з виявленим пришвидшенням переходу метастатичного пухлинного процесу перевивної карциноми легень Льюїс у васкулярну стадію.

3.3.2. Мікроскопічні зміни в скелетних м'язах мишей з трансплантованою карциномою легені Льюїс. Гістологічні дослідження скелетних м'язів проводили на 18-ту і 24-ту добу після трансплантації пухлини.

У мишей з трансплантованою карциномою легені Льюїс на 18-ту добу пухлина мала досить чіткі межі (рис. 3.58). М'язова тканина, що оточувала пухлину в цей строк спостережень, була переважно незмінена. Проте на

поодиноких ділянках у частині м'язових волокон, які прилягали безпосередньо до пухлини, істотно зменшувався вміст міоглобіну, внаслідок чого вони помітно менш інтенсивно зафарбовувались еозином.

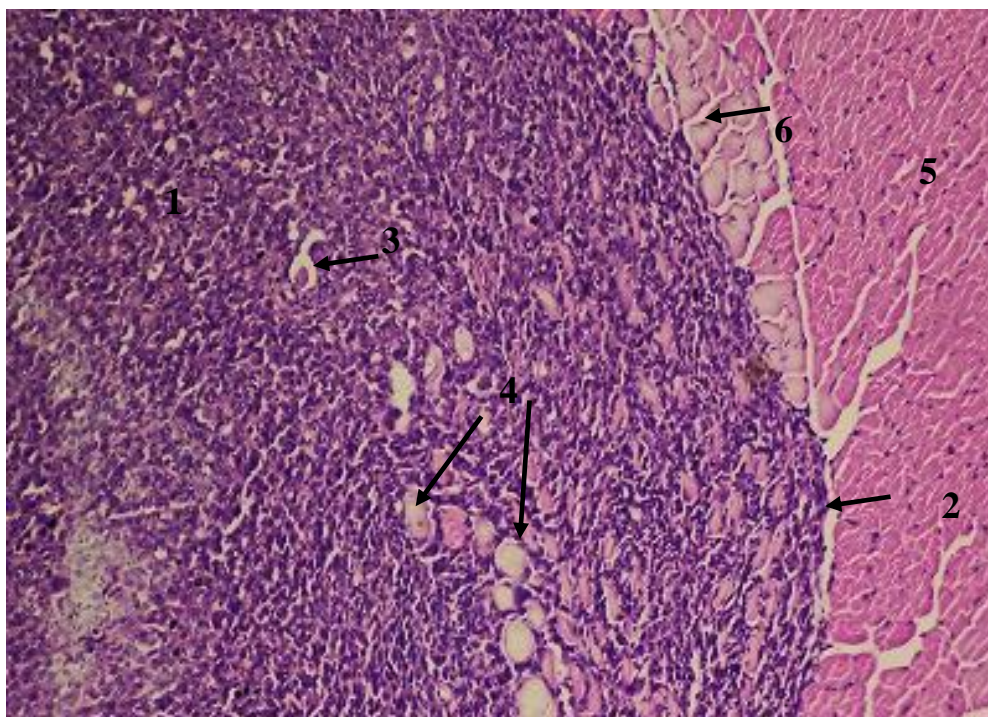


Рис. 3.58. М'яз миші з трансплантованою карциномою легені Льюїс на 18 добу. Гістопрепарат: 1 – клітини пухлини; 2 – межа пухлини; 3 – кровоносна судина; 4 – м'язові волокна в периферичній частині пухлини; 5 – незмінена м'язова тканина; 6 – слабо зафарбовані м'язові волокна. Фарбування гематоксиліном Караці та еозином, $\times 50$.

На нашу думку така деградація міоглобіну в м'язових волокнах була зумовлена цитотоксичними речовинами, які виділяли клітини пухлини.

Зменшення інтенсивності зафарбовування м'язових волокон в більшості випадків було досить рівномірним, але в частині випадків реєструвалось нерівномірне зменшення цієї інтенсивності (див. рис. 3.58).

Клітини пухлини мали досить велику оксифільну цитоплазму, що свідчило про помірно виражені процеси синтезу білкових речовин. У частині клітин виявлялись вакуолізація та набряк ядра, маргінація хроматину ядра, що відповідно до сучасних уявлень є передвісником загибелі клітини шляхом некротичних змін (рис. 3.59).

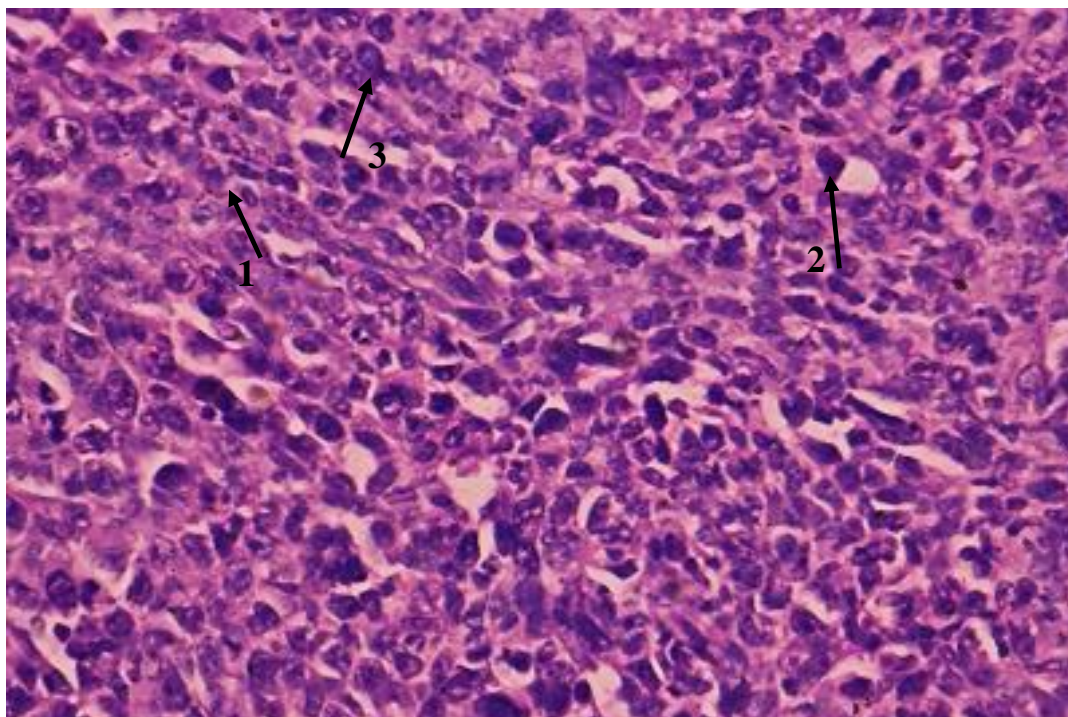


Рис. 3.59. Центральна частина пухлини на 18-ту добу трансплантації при застосуванні МСК. Гістопрепарат: 1 – оксифільна цитоплазма клітин; 2 – набряк ядра клітини пухлини; 3 – маргінація хроматину в ядрах клітин пухлини. Фарбування гематоксиліном Караці та еозином, $\times 400$.

Крім того, слід відзначити, що клітини пухлини мали різні розміри цитоплазми і ядра (виражені анізоцитоз і анізокорія), а також розрізнялись за формою. Переважну більшість становили клітини округлої форми, однак виявлялись і клітини фібробластоїдної форми, клітини, які нагадували за формою дендритні клітини. Ядерно-цитоплазмове співвідношення було високим, ядра переважно крупні, з наявністю ядерець. Відмічені також

гігантські багатоядерні клітини. В окремих клітинах спостерігались фігури мітозів (переважно стадія анафази).

Виходячи з цих даних, пухлину, що виникає в скелетних м'язах мишей при трансплантації карциноми легені Льюїс, слід віднести до поліморфноклітинної саркоми низького ступеня диференціації. У периферичних частинах пухлини реєструвалась відносно невелика кількість кровоносних судин. Між клітинами пухлини виявлялись м'язові волокна. Частина цих волокон мала рівномірне або нерівномірне зменшення вмісту міоглобіну, частина волокон була фрагментована, а інша частина – атрофована. У поодинокі м'язові волокна проникали ізольовані клітини пухлини, що свідчить про початок метастазування первинної пухлини в оточуючі тканини (рис. 3.60).

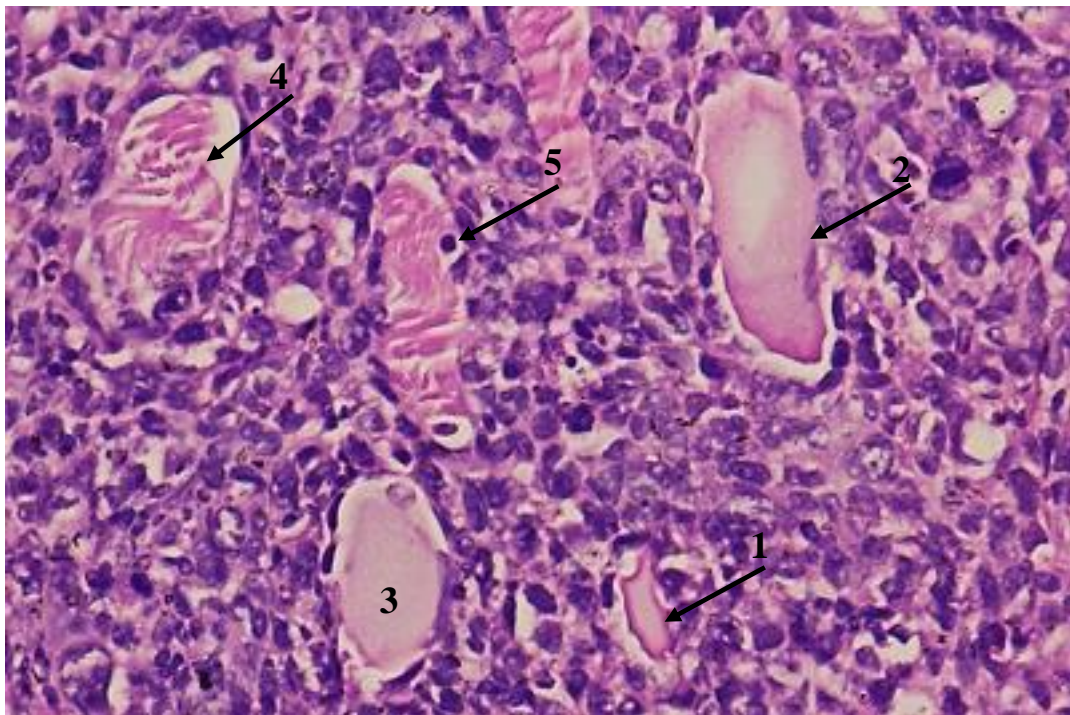


Рис. 3.60. Периферична частина пухлини на 18 добу. Гістопрепарат: 1 – атрофоване м'язове волокно; 2 – м'язове волокно з рівномірно зниженим вмістом міоглобіну; 3 – м'язове волокно з нерівномірно зниженим вмістом міоглобіну; 4 – фрагментація м'язового волокна; 5 – проникнення клітини

пухлини у фрагментоване м'язове волокно. Фарбування гематоксиліном Караці та еозином, $\times 400$.

У таких випадках навколо цих пухлинних клітин виявлялась зона лізису м'язового волокна, що, на нашу думку, свідчило про секрецію цими клітинами цитотоксичних речовин.

На 24-ту добу пухлина мала відносно чіткі границі стосовно оточуючих тканин. Проте в цей строк виявлялись ознаки гематогенного метастазування, у вигляді невеликих осередків розростання пухлинних клітин поряд з кровоносними судинами в пухкій волокнистій сполучній тканині, що обмежує м'яз (рис. 3.61).

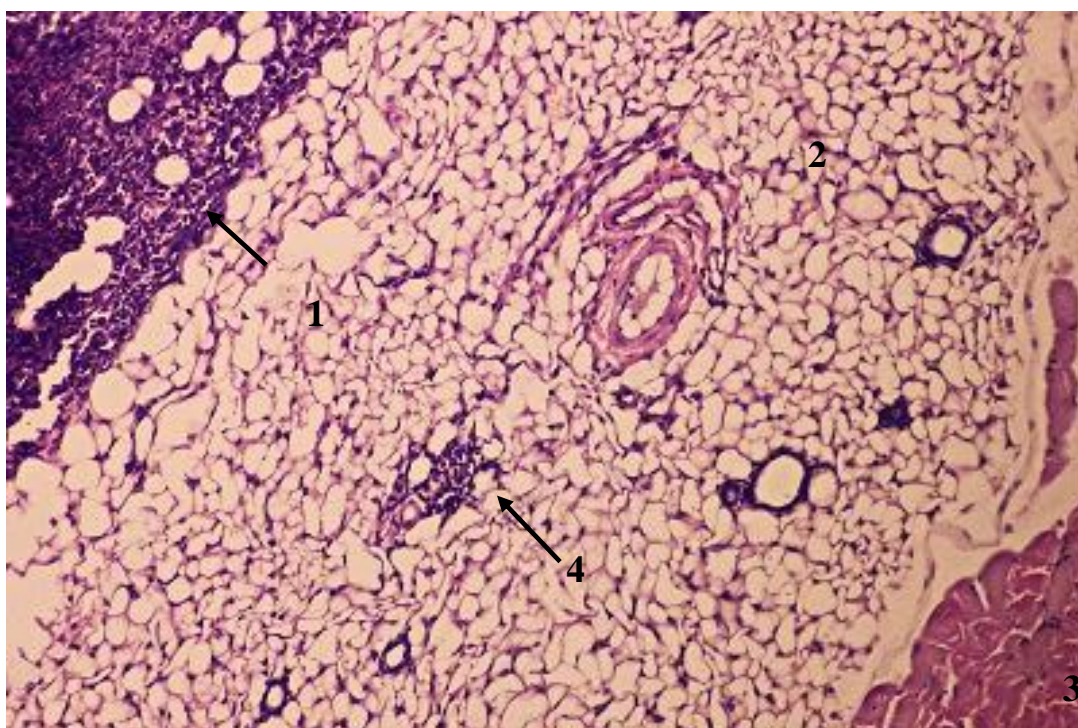


Рис. 3.61. Скелетний М'яз миші з трансплантованою карциномою легені Льюїс на 24-ту добу. Гістопрепарат: 1 – межа пухлини; 2 – міжм'язова пухка волокниста сполучна тканина; 3 – інтактний м'яз; 4 – вогнище пухлинних клітин. Фарбування гематоксиліном Караці та еозином, $\times 50$.

На відміну від 18-ї доби спостереження, це були не поодинокі клітини, а їх комплекси, що свідчить на користь активної проліферації метастазуючих клітин в осередках нового мікрооточення. У центральній частині пухлини виявлялись відносно невеликі за розмірами вогнища некрозу та дистрофічних змін (рис. 3.62, 3.63).

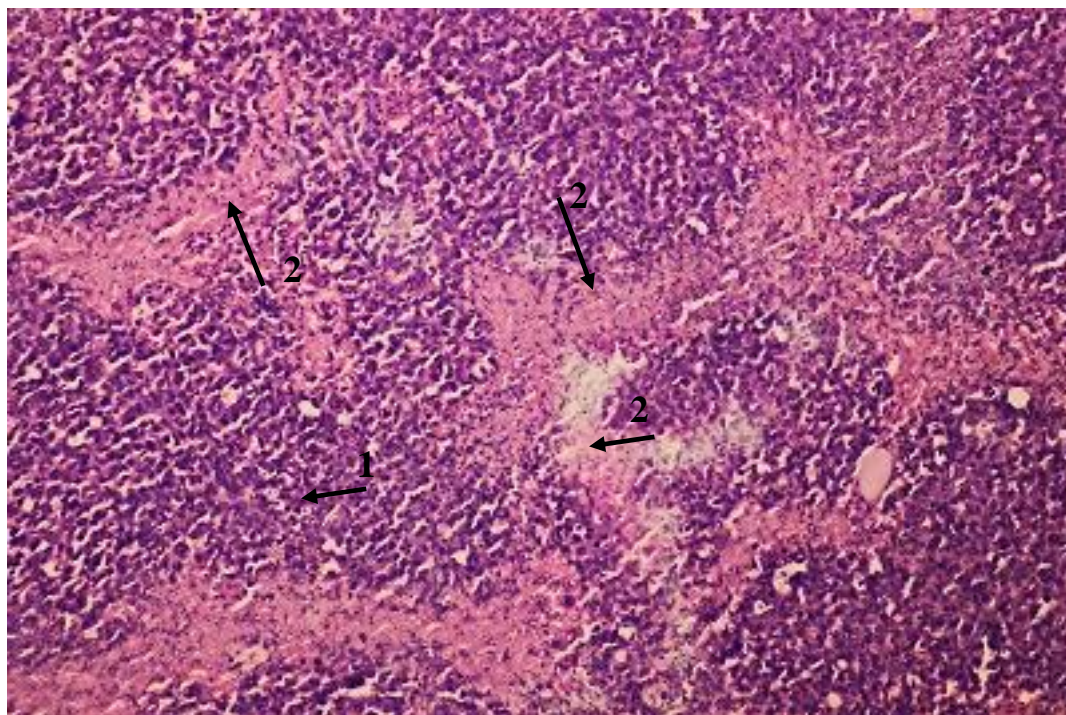


Рис. 3.62. Центральна частина пухлини на 24 добу. Гістопрепарат: 1 – розріджене розташування клітин пухлини; 2 – вогнище некрозу клітин пухлини. Фарбування гематоксиліном Караці та еозином, $\times 100$.

У центральній і периферичних ділянках пухлини її клітини були розріджені, у частини клітин реєстрували набряк ядра та виразну вакуолізацію їх цитоплазми. Останнє свідчило про розвиток у них гідропічної дистрофії (див. рис. 3.62). Більшість клітин пухлини некротизувалось. Некротично змінені клітини спостерігались у зонах паренхіми самої пухлини. Їх некроз характеризувався лізисом цитоплазми та каріорексисом. Ядра недостатньо сприймали фарбування, в частині клітин практично зливались з фоном цитоплазми. Фрагментація ядер (апоптотичні

тільця) не спостерігались. Це свідчить на користь переважання процесів некрозу пухлинної тканини ніж розвиток програмованої клітинної загибелі.

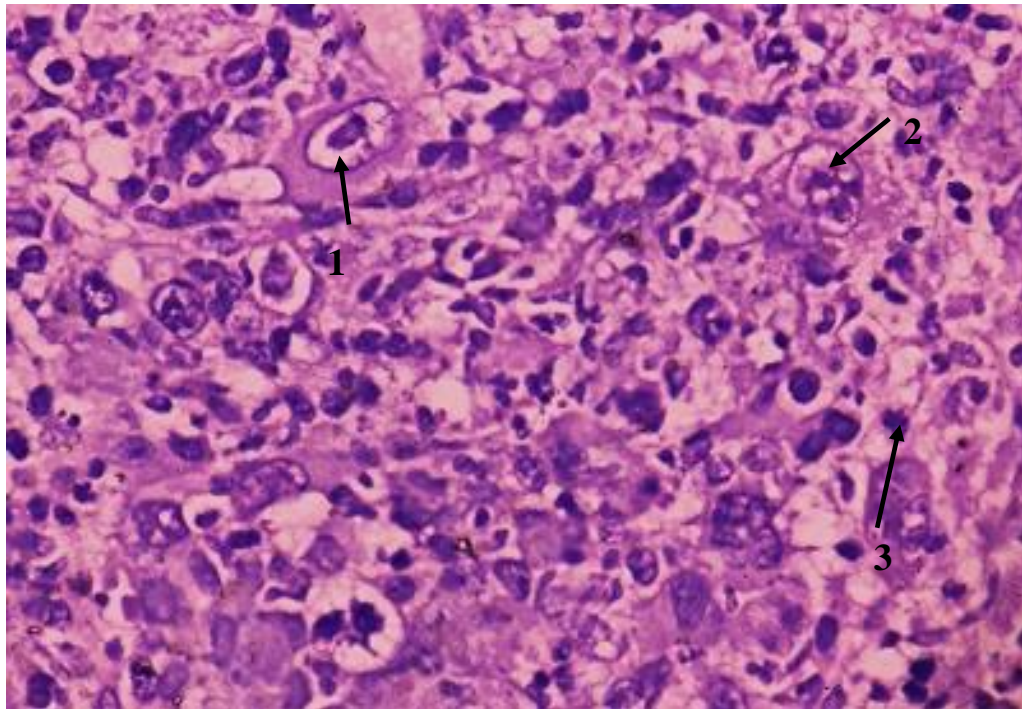


Рис. 3.63. Периферична частина пухлини на 24 добу. Гістопрепарат: 1 – набряк ядра клітин пухлини; 2 – вакуолізація цитоплазми клітин пухлини; 3 – ядра клітин пухлини в стані рексису. Фарбування гематоксиліном Караці та еозином, $\times 400$.

На периферії пухлини виявлялися численні незарощені клітинами ділянки, які за розмірами та формою відповідали інтактним м'язовим волокнам (рис. 3.64).

Між клітинами пухлини, особливо в її периферичній частині, реєстрували розростання пухкої волокнистої сполучної тканини (рис. 3.65). Зазвичай воно було незначним, але на поодиноких ділянках досягало досить великих розмірів (рис. 3.66).

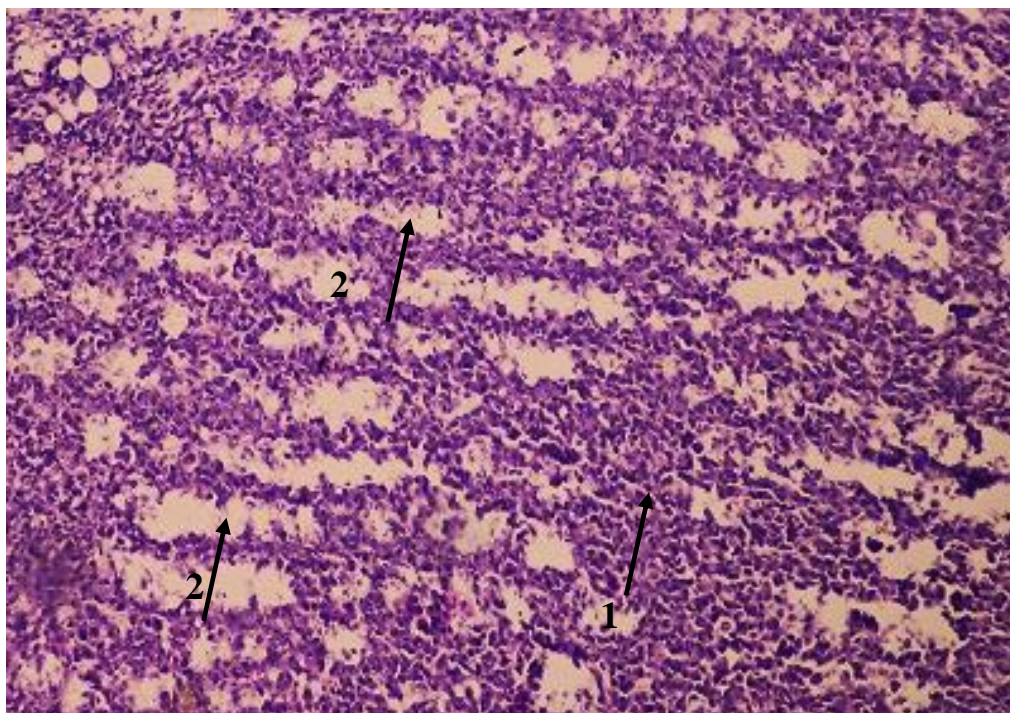


Рис. 3.64. Периферична частина пухлини на 24 добу. Гістопрепарат: 1 – клітини пухлини; 2 – незарощена клітинами пухлини ділянка лізованого м'язового волокна. Фарбування гематоксиліном Караці та еозином, $\times 100$.

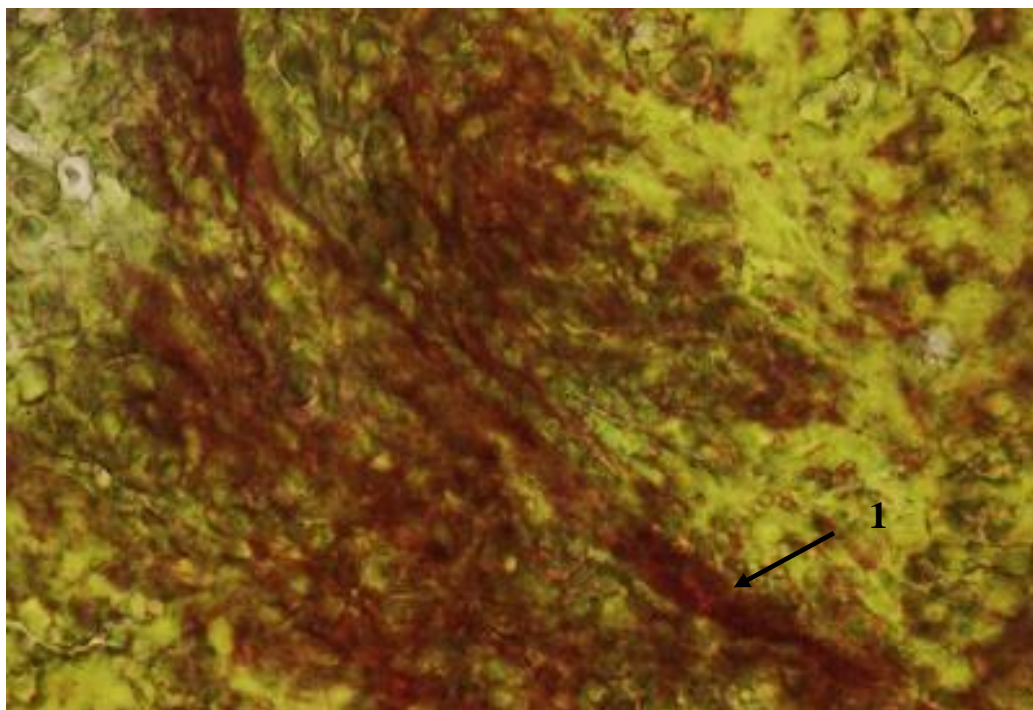


Рис. 3.65 Периферична частина пухлини на 24 добу. Гістопрепарат: 1 – пучки колагенових волокон між клітинами пухлини. Фарбування за Ван Гізон, $\times 400$.

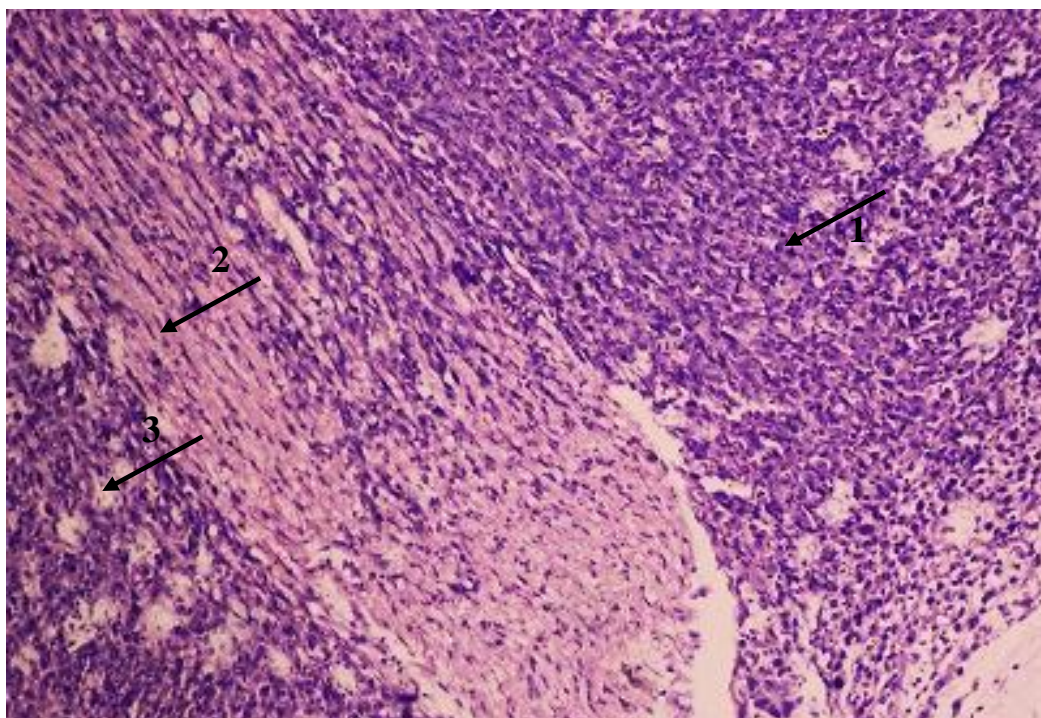


Рис. 3.66. Периферична частина пухлини на 24 добу. Гістопрепарат: 1 – клітини пухлини; 2 – пухка волокниста сполучна тканина; 3 – незарощені клітинами пухлини ділянки лізованих м'язових волокон. Фарбування гематоксиліном Караці та еозином, $\times 50$.

При проведенні гістологічних досліджень, на багатьох периферичних ділянках пухлини, нами також було встановлено відсутність її чітких границь (меж). Безпосередньо навколо вогнища пухлинного росту виявлялися чіткі морфологічні ознаки активного росту – поширення клітин пухлини між оточуючими м'язовими волокнами (рис. 3.67).

Колонії пухлинних клітин набували значного розміру. Це свідчить про те, що на 24 добу відбувалось не тільки гематогенне метастазування пухлини, але й її метастазування по продовженню – в тканини, що оточують пухлинний вузол.

Слід відзначити, що на окремих ділянках пухлини в цей строк спостережень реєструвалась проліферація фібробластів (рис. 3.68).

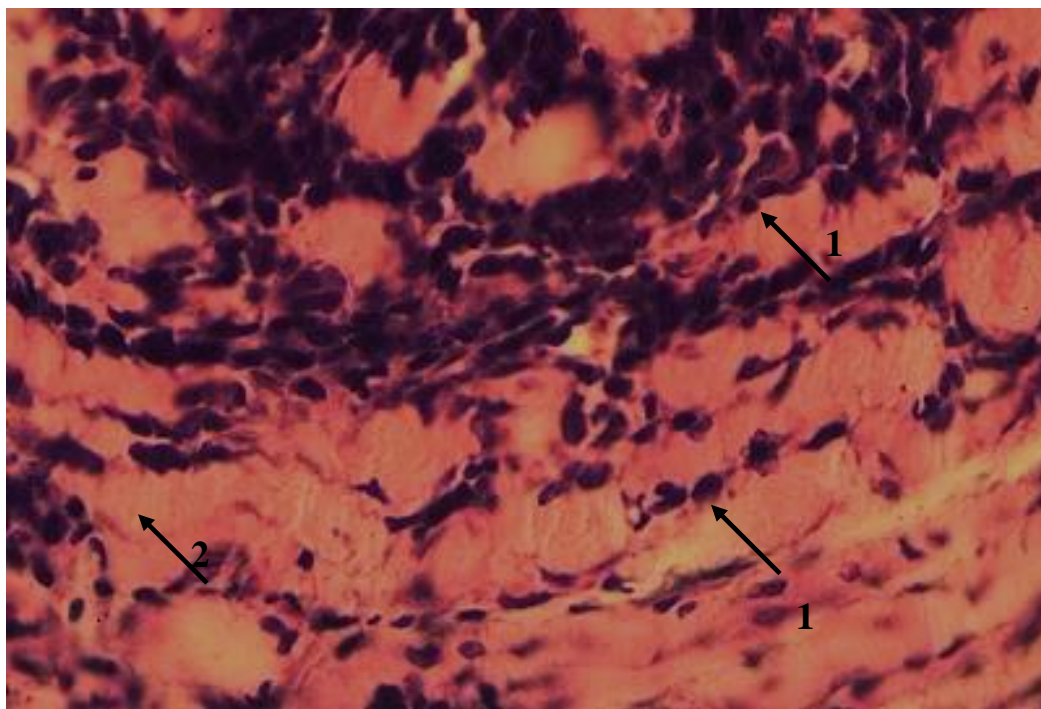


Рис. 3.67. Периферична частина пухлини на 24 добу. Гістопрепарат: 1 – клітини пухлини; 2 – м'язові волокна. Фарбування гематоксиліном Караці та еозином, $\times 400$.

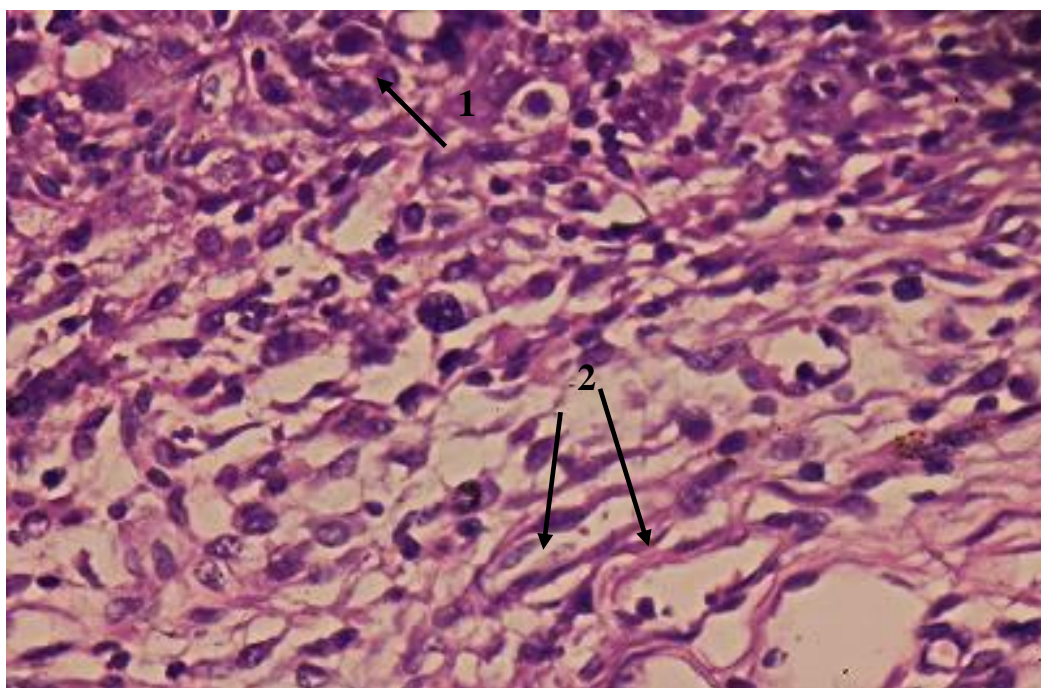


Рис. 3.68. Межа пухлини на 24 добу. Гістопрепарат: 1 – клітини пухлини; 2 – фібробласти. Фарбування гематоксиліном Караці та еозином, $\times 400$.

Відомо, що проліферація фібробластів по периферії патологічних вогнищ різного генезу (гематоми, абсцеси, туберкульозні вогнища тощо) призводить до формування навколо них сполучнотканинної капсули.

Для визначення точного вмісту пухкої волокнистої сполучної тканини ми використали не тільки стандартне фарбування гістозрізів гематоксиліном та еозином, але й фарбування їх за Ван Гізон, де барвником слугує суміш кислого фуксину та пікринової кислоти. Фуксин забарвлює колагенові волокна у червоний колір, а пікринова кислота забезпечує жовтий колір саркоплазми м'язових волокон.

Відомо, що розростання пухкої волокнистої сполучної тканини, тобто склероз, є компенсаторно-приспосувальною реакцією на різноманітні патогенні впливи на органи й тканини організму. З цих позицій розростання пухкої волокнистої сполучної тканини в пухлині ми розглядаємо як активацію захисних механізмів організму саме на пухлину, оскільки в неуражених пухлинним ростом ділянках м'язової тканини склеротичні зміни в жодному з випадків нами зареєстровані не були.

Цей процес називають інкапсуляцією. Шляхом інкапсуляції організм у частині випадків відмежовує від оточуючих здорових тканин такі патологічні вогнища, що є одним із проявів його захисних реакцій. Проте повноцінна сполучнотканинна капсула навколо пухлини в цей строк спостережень не утворювалась.

Проведення гістоморфометрії дало змогу об'єктивізувати виявлені морфологічні зміни (табл. 3.42).

Як бачимо з даних таблиці, на 18-му добу розвитку інокульованої пухлини у зразках переважає паренхіматозний компонент, доля якого достовірно зменшується на 24-ту добу росту пухлини. Це відбувається за рахунок збільшення площі як ділянок сполучної тканини, так і ділянок некрозу.

Водночас спостерігається збільшення щільності судинного русла. Це збігається з відомими даними щодо тісної асоціації між васкуляризацією пухлини і швидкістю її росту та метастазування.

Таблиця 3.42

**Морфометричні показники первинної карциноми легені Льюїс,
M±m, %**

Показник	Термін спостереження	
	18-та доба	24-та доба
Питома вага паренхіми	76,7 ± 5,9	63,5 ± 6,4*
Питома вага сполучної тканини	9,9 ± 3,8	17,9 ± 3,3*
Питома вага ділянок некрозу	13,4 ± 3,7	18,6 ± 3,1*
Щільність судин	13,7 ± 3,1	18,1 ± 2,2*

Примітки: * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$, *** – $p < 0,001$ відносно показників тварин контрольної групи.

У той же час, розвиток судин (можливо, за рахунок нерівномірності) не забезпечує необхідну кількість поживних речовин та кисню для повноцінного функціонування всіх клітин пухлини, тому її ріст супроводжується і одночасним збільшенням некротичних ділянок.

3.3.3. Мікроскопічні зміни в скелетних м'язах мишей з трансплантованою карциномою легені Льюїс при застосуванні мезенхімних стовбурових клітин. За введення МСК тваринам–пухлиноносіям, мікроскопічні зміни в пухлинній тканині в усі строки спостережень помітно відрізнялись від таких при розвитку трансплантованої карциноми легень Льюїс у тварин контрольної групи.

На 18-ту добу встановлено більш активне прогресування пухлини в скелетних м'язах порівняно з її природним розвитком. (рис. 3.69).

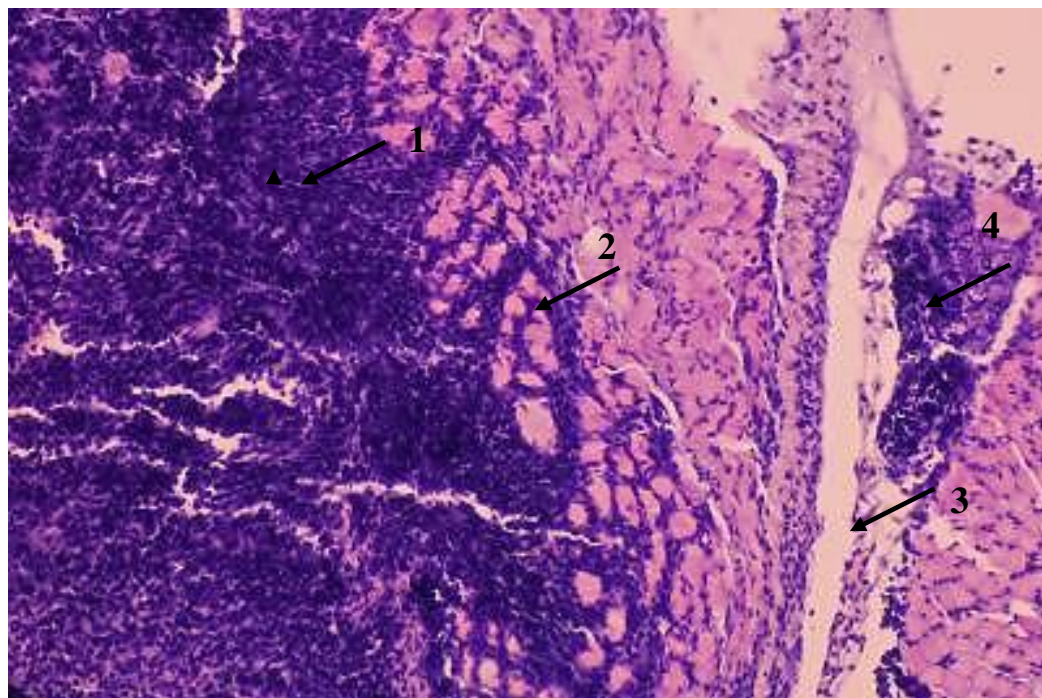


Рис. 3.69. Селетний м'яз миші з трансплантованою карциномою легені Льюїс на 18-ту добу при застосуванні МСК. Гістопрепарат: 1 – первинне вогнище пухлинного росту; 2 – проникнення пухлинних клітин між м'язовими волокнами; 3 – міжм'язова пухка волокниста сполучна тканина; 4 – дочірній осередок пухлинного росту. Фарбування гематоксиліном Караці та еозином, $\times 50$.

Між оточуючими пухлину м'язовими волокнами вже в цей строк спостережень виявлялась велика кількість пухлинних клітин, у тому числі не тільки безпосередньо поблизу пухлини, але й на віддаленій відстані. Злоякісно трансформовані клітини утворювали великі скупчення, що морфологічно нагадували осередки первинної пухлини.

Вже на 18-ту добу реєструвалось проникнення пухлинних клітин між оточуючих пухлинне вогнище м'язовими волокнами, що відображало метастазування по продовженню. Навколо первинної пухлини в м'язовій тканині виявлялись невеликі за розмірами дочірні метастази.

У цей термін у пухлині виявлялись відносно великі осередки некрозу, які переважно локалізувались у її центральній частині, проте подекуди виявлялись і в її периферичних ділянках (рис. 3.70).

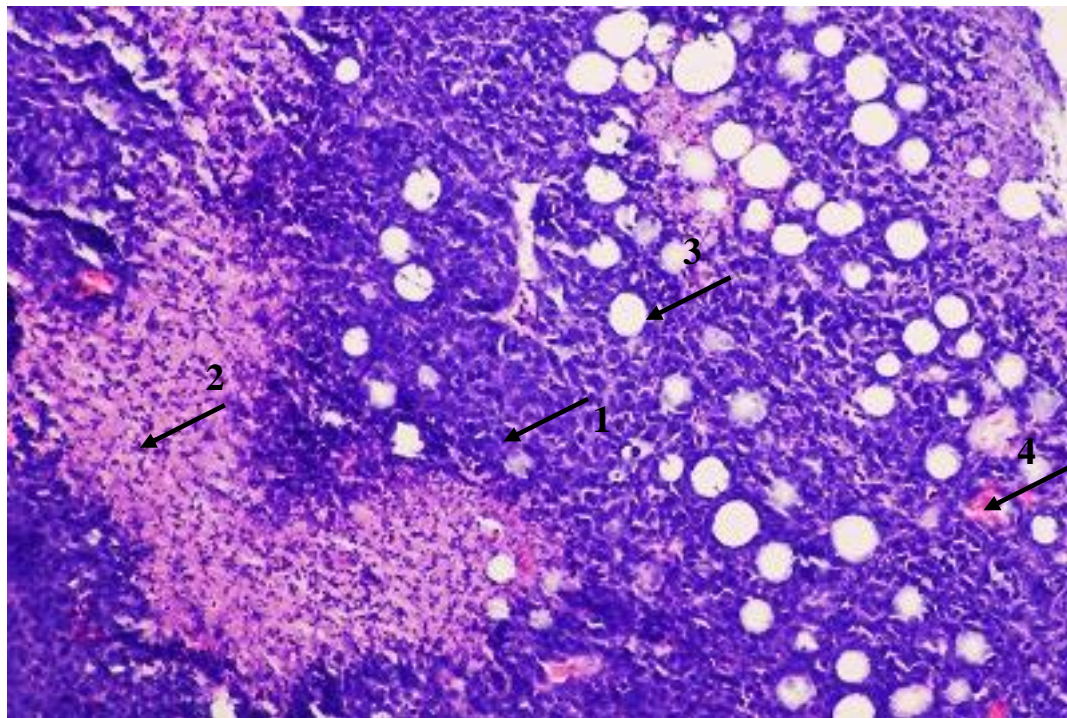


Рис. 3.70. Скелетний м'яз миші з трансплантованою карциномою легені Льюїс на 18 добу при застосуванні МСК. Гістопрепарат: 1 – клітини пухлини; 2 – вогнище некрозу клітин пухлини; 3 – лізовані м'язи; 4 – кровоносна судина. Фарбування гематоксиліном Караці та еозином, $\times 50$.

Новоутворена пухлина при застосуванні МСК була побудована з виразно атипових клітин і не мала будь-якої виразної строми, що є свідченням високого ступеня її анаплазії, і, відповідно, злоякісності (рис. 3.71).

Клітини мали переважно округлу форму, наявність одного ядра. Ядра пухлинних клітин були переважно округлої чи овальної форми та досить інтенсивно й однорідно зафарбовувались гематоксиліном. Ядра клітин були крупними, в переважній більшості з них контурувалось виразне ядерце.

Цитоплазма всіх клітин пухлини була інтенсивно базofilьна, що свідчило про активні процеси синтезу клітинами РНК і, відповідно, білків. Такий характер фарбування цитоплазми характерний для найбільш злоякісних пухлин і свідчить про зростання агресивності трансплантованої карциноми легені Льюїс у м'язовій тканині порівняно з її розвитком за відсутності впливу МСК. Виявлялись поодинокі гігантські багатоядерні пухлинні клітини.

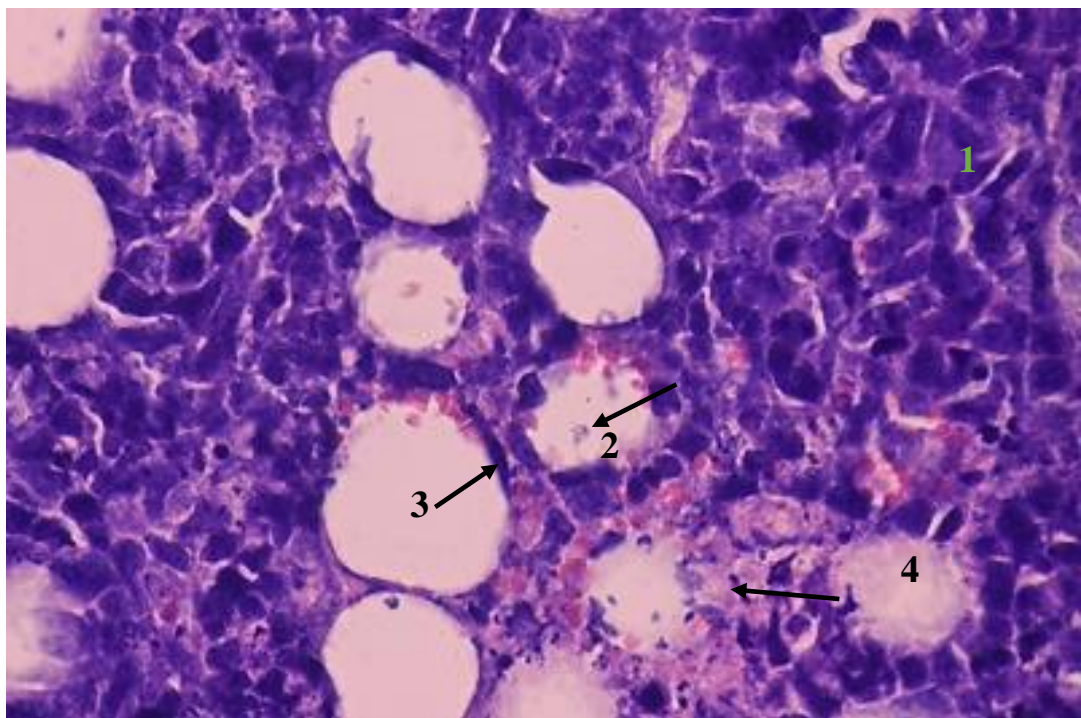


Рис. 3.71. Периферична частина пухлини на 18 добу при застосуванні МСК. Гістопрепарат: 1 – клітини пухлини; 2 – кровоносна судина капілярного типу; 3 – ендотеліоцит; 4 – осередок некрозу. Фарбування гематоксиліном Караці та еозином, $\times 400$.

У периферичних частинах пухлини виявлялась велика кількість кровоносних судин, які ми віднесли до судин капілярного типу, оскільки їх стінка була представлена лише ендотеліальними клітинами, але їх просвіт був набагато більшим за просвіт капілярів у незмінених сусідніх частинах

м'яза. Слід також підкреслити, що в цих кровоносних судинах виявлялась невелика кількість еритроцитів, а частина таких судин капілярного типу була порожня.

У частині кровоносних судин пухлини реєструвалось склеювання еритроцитів (садж - феномен) та виразне зменшення вмісту в частині еритроцитів гемоглобіну, внаслідок чого ці клітини нерівномірно зафарбовувались еозином (рис. 3.72).

У просвіті поодиноких кровоносних судин, що локалізувались у периферичних ділянках пухлини, виявляли окремі клітини пухлини. Це свідчило, що дуже швидко, вже в цей строк спостережень, клітини пухлини проникали в кровоносне русло (тобто мало місце гематогенне метастазування).

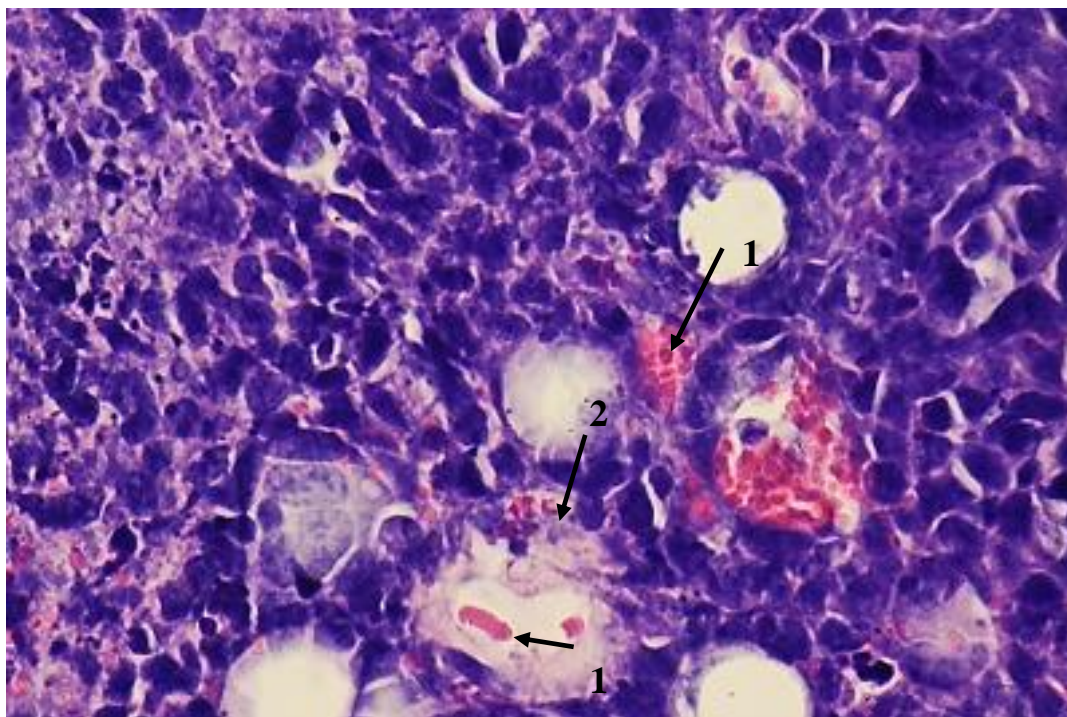


Рис. 3.72. Периферична частина пухлини на 18 добу при застосуванні МСК. Гістопрепарат: 1 – склеювання еритроцитів у просвіті кровоносної судини; 2 – часткова втрата гемоглобіну еритроцитами. Фарбування гематоксиліном Караці та еозином, $\times 400$.

Наявність гематогенного метастазування та метастазування по продовженню свідчить про те, що вже в цей строк спостережень пухлина перебувала на заключній стадії свого морфогенезу – стадії метастазування. Це також свідчить на користь швидкої прогресії трансплантованої карциноми легень Льюїс в скелетних м'язах при застосуванні МСК.

Цікаво зазначити, що вже в цей термін спостережень у пухлині реєструвались невеликого розміру осередки некрозу пухлинних клітин, у тому числі й поблизу кровоносних судин, тобто, некроз клітин пухлини не був зумовлений їх кисневим голодуванням (рис. 3.73).

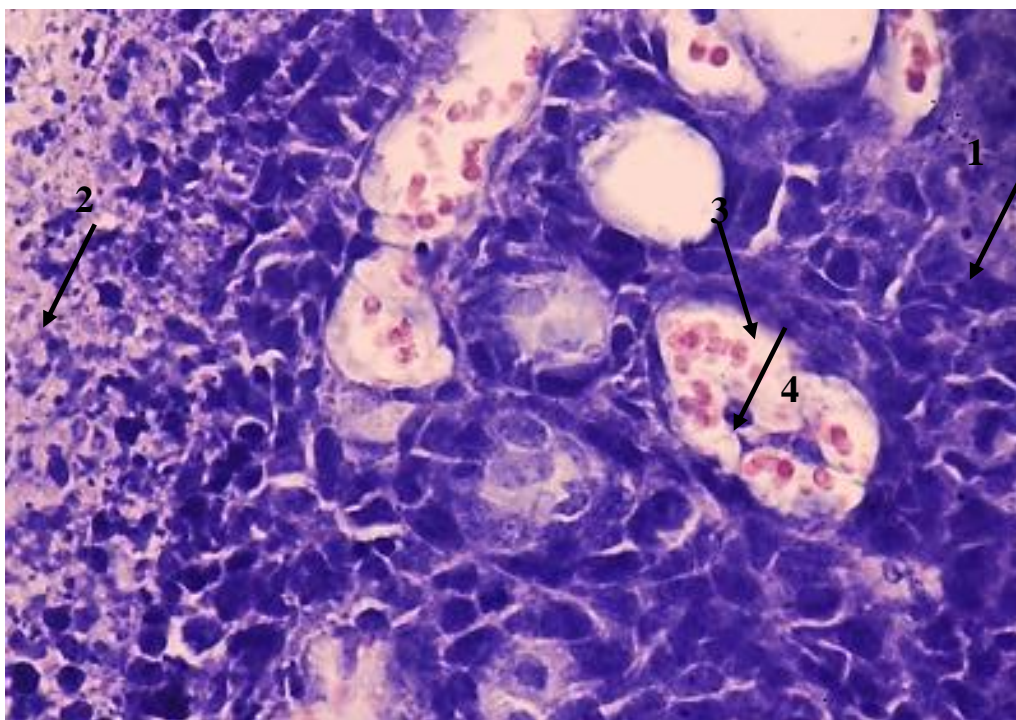


Рис. 3.73. Периферична частина пухлини на 18 добу при застосуванні МСК. Гістопрепарат: 1 – клітини пухлини; 2 – некроз клітин пухлини; 3 – кровоносна судина; 4 – клітина пухлини в просвіті кровоносної судини. Фарбування гематоксиліном Караці та еозином, $\times 400$.

Також у периферичних ділянках пухлини виявляли проникнення в слабо зафарбовані м'язові волокна, які ще тут залишались, досить великої кількості клітин пухлини, порівняно з природним розвитком пухлини у цей строк спостережень (рис. 3.74). На нашу думку це свідчить про зростання ступеню злоякісності пухлини і її агресивності.

У подальшому м'язові волокна в периферичних частинах пухлини лізувались з утворенням порожніх просторів, які досить інтенсивно (на відміну від природного розвитку пухлини в цей строк) заростали клітинами пухлини (рис. 3.75).

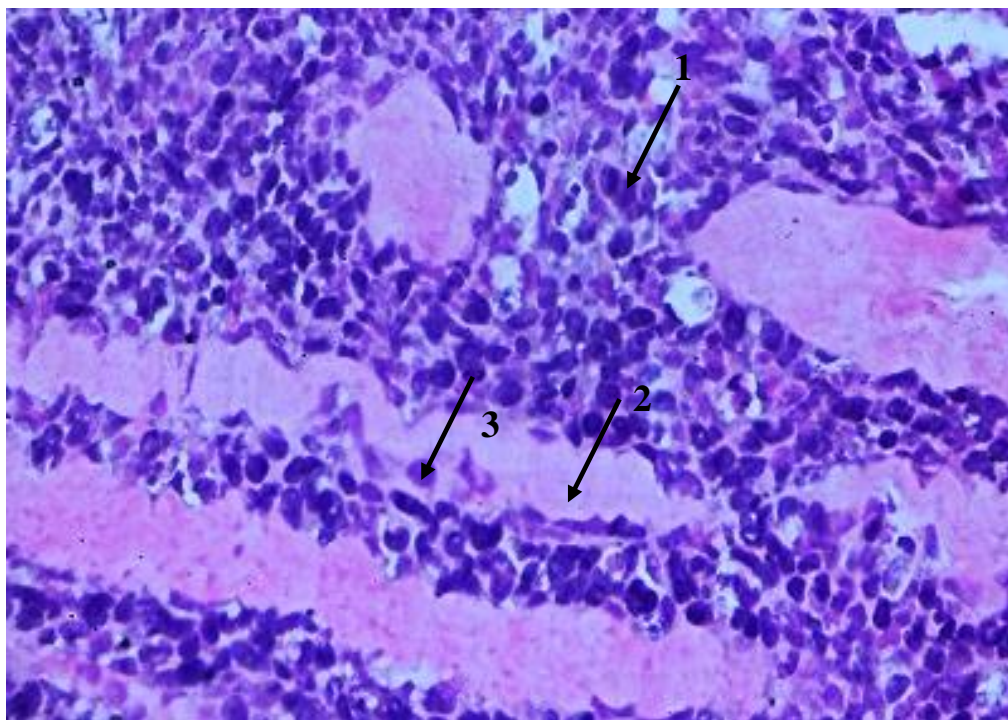


Рис. 3.74 Периферична частина пухлини на 18 добу при застосуванні МСК. Гістопрепарат: 1 – клітини пухлини; 2 – гіпохромне м'язове волокно; 3 – проникнення клітин пухлини в м'язове волокно. Фарбування гематоксиліном Караці та еозином, $\times 400$.

Між клітинами пухлини в різних її ділянках виявлялись скупчення еритроцитів, які в усіх випадках були склеєними в досить великі агрегати (див. рис. 3.75).

Таким чином, на 18-ту добу спостереження в зразках пухлинної тканини за впливу МСК спостерігались:

- більш інтенсивна її васкуляризація, які відбувалась одночасно зі збільшенням ділянок некротичних змін;
- більш виразні ознаки гематогенного метастазування і метастазування по продовженню.

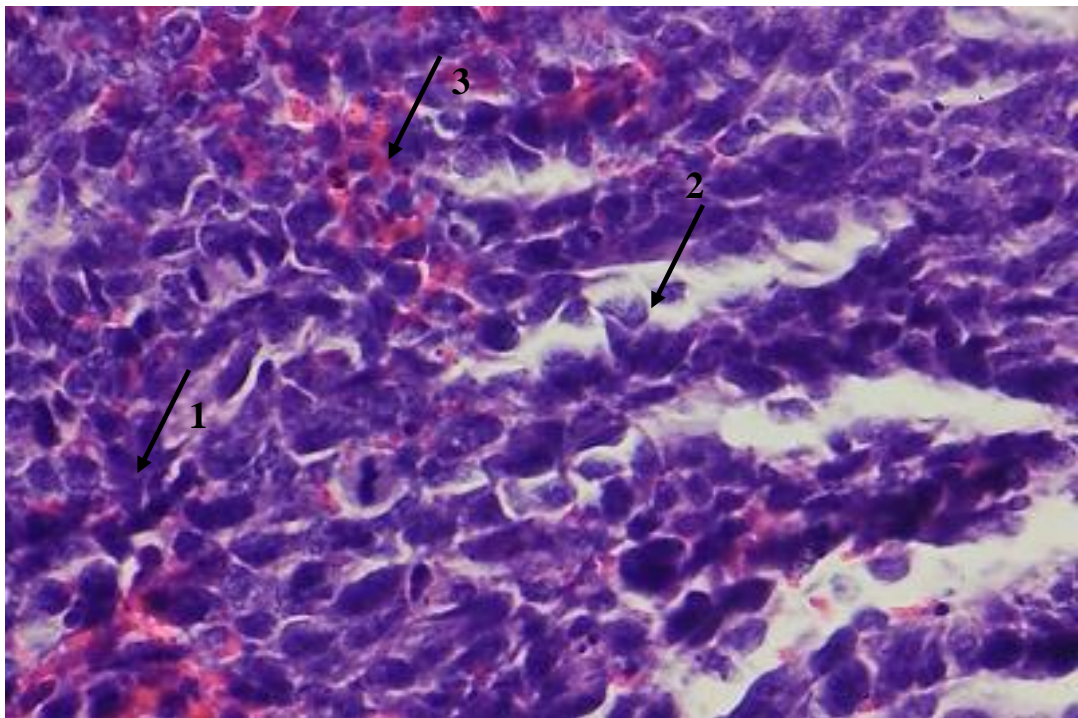


Рис. 3.75. Периферична частина пухлини на 18-ту добу при застосуванні МСК. Гістопрепарат: 1 – клітини пухлини; 2 – розростання клітин пухлини на місці м'язового волокна; 3 – склеєні еритроцити. Фарбування гематоксиліном Караці та еозином, $\times 400$.

На 24-ту добу пухлина в ході своєї прогресії ще збільшувала свою злоякісність. При гістологічному дослідженні вона вже не мала більш-менш

чітких границь (які спостерігались в пухлинах тварин контрольної групи). Крім виразних ознак гематогенного метастазування (наявність клітин пухлини в просвіті кровоносних судин поза межами вогнища пухлинного росту), також ми реєстрували виразне метастазування по продовженню. Останнє проявлялось поширенням великої кількості клітин пухлини через оточуючу пучок м'язової тканини клітковину на сусідні фрагменти м'яза (рис. 3.76).

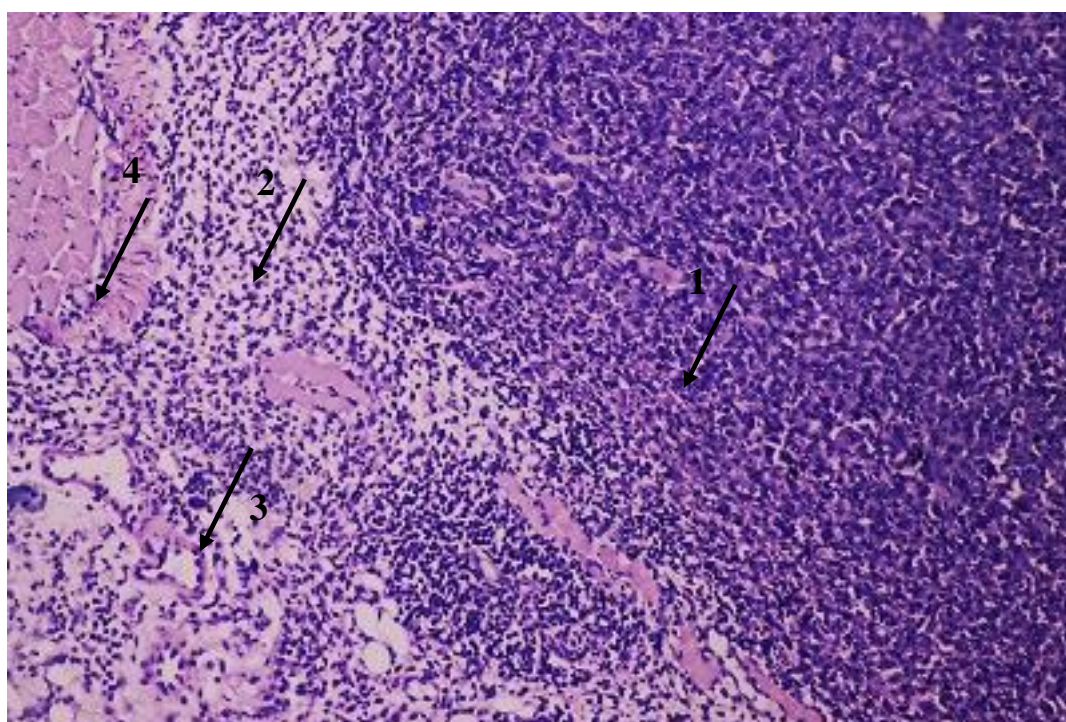


Рис. 3.76. Периферична частина пухлини на 24-ту добу при застосуванні МСК. Гістопрепарат: 1 – клітини пухлини; 2 – інфільтрація міжм'язової клітковини клітинами пухлини; 3 – клітини пухлини в просвіті вени; 4 – інфільтрація клітинами пухлини сусідньої частини м'яза. Фарбування гематоксиліном Караці та еозином, $\times 50$.

У центральній частині пухлини виявлялись вогнища некрозу великих розмірів, які займали більше ніж поле зору при збільшенні мікроскопу $\times 100$ (рис. 3.77, рис. 3.78).

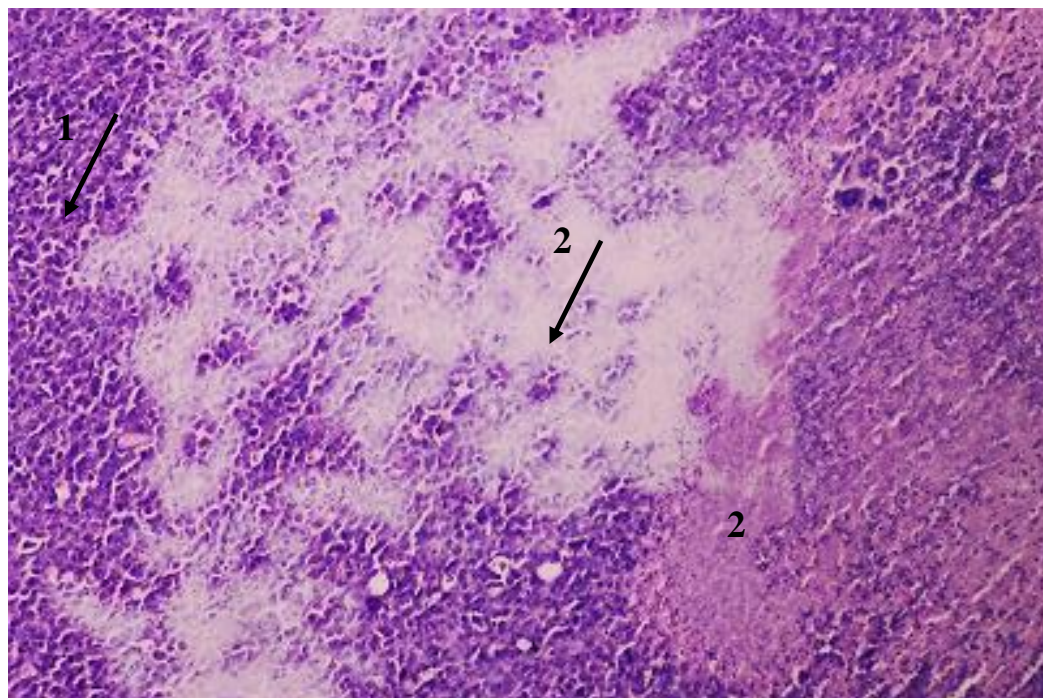


Рис. 3.77. Центральна частина пухлини на 24 добу при застосуванні МСК. Гістопрепарат: 1 – клітини пухлини; 2 – вогнище некрозу клітин пухлини. Фарбування гематоксиліном Караці та еозином, $\times 100$.

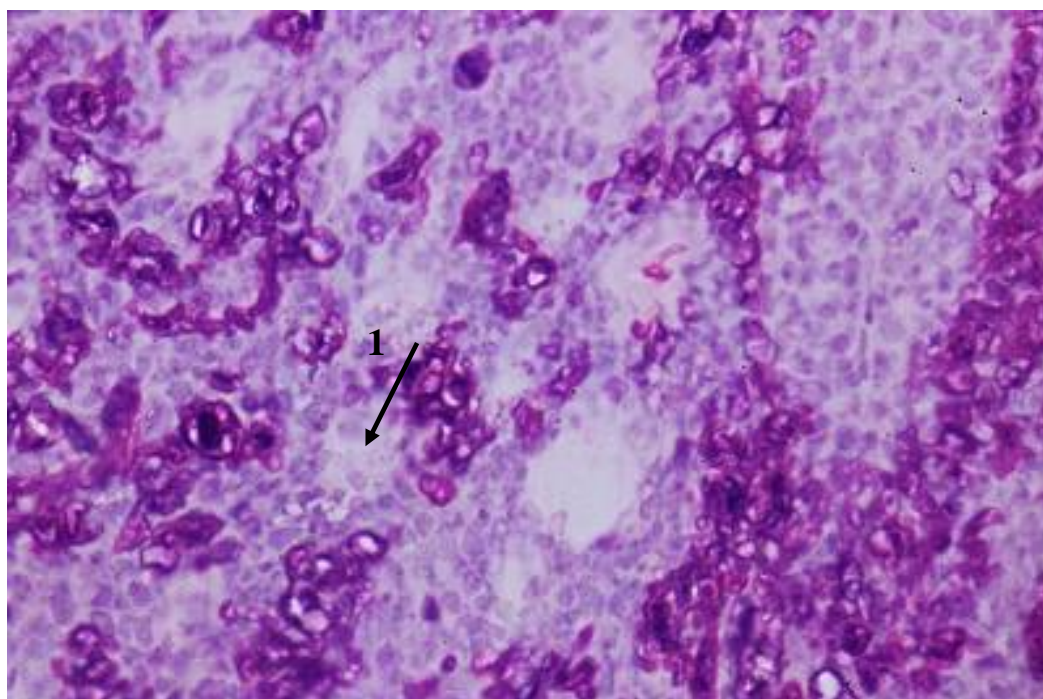


Рис. 3.78. Центральна частина пухлини на 24 добу при застосуванні МСК. Гістопрепарат: 1 - некротизовані клітини пухлини. Фарбування гематоксиліном Караці та еозином, $\times 400$.

Спостерігали більшу кількість ознак некрозу клітин: каріопікноз (зморщування ядра у зв'язку з конденсацією хроматину), каріорексис (розпад на окремі фрагменти), каріолізис (розчинення ядра). Некротизовані клітини пухлини набували виразно оксифільних властивостей, що обумовлено денатурацією і коагуляцією внутрішньоклітинних білків. На багатьох ділянках пухлини її клітини розташовувались розріджено внаслідок некрозу невеликих скупчень клітин. В таких ділянках також виявлялась досить значна кількість двох- та багатоядерних клітин, що свідчить про порушення їх поділу (рис. 3.79).

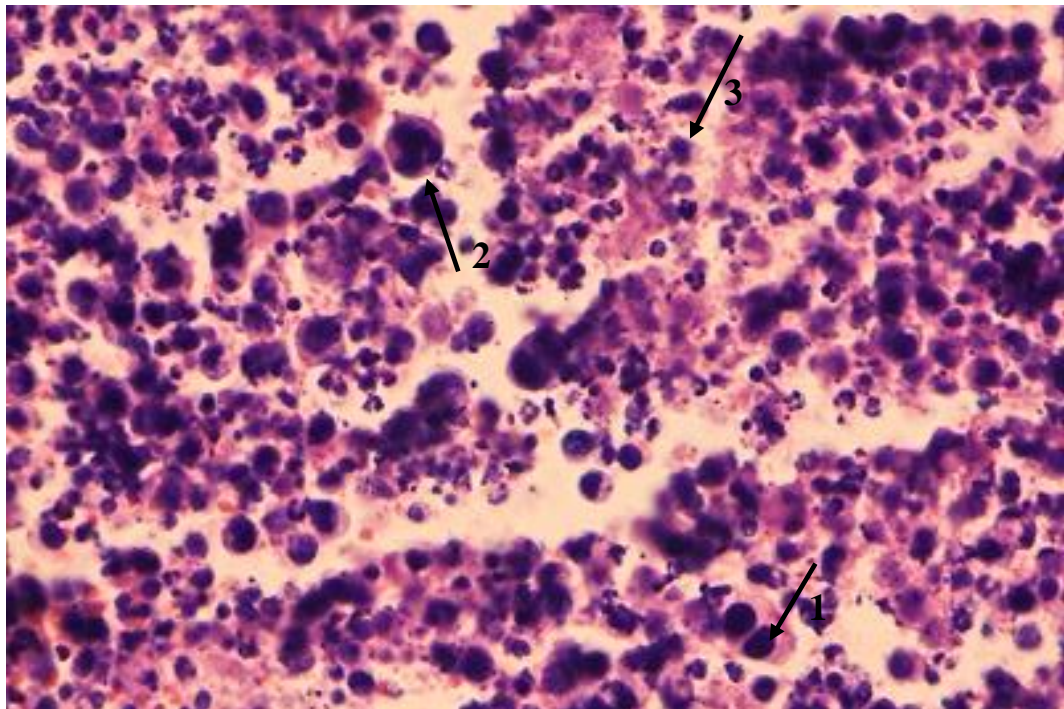


Рис. 3.79. Центральна частина пухлини на 24 добу при застосуванні МСК. Гістопрепарат: 1 – двоядерна клітина пухлини; 2 – багатоядерна клітина пухлини; 3 – некроз клітин пухлини з каріорексисом. Фарбування гематоксиліном Караці та еозином, $\times 400$.

Місцями виявлялися скупчення еритроцитів, частина з яких була лізована (рис. 3.80, 3.81). Ділянки некрозу пухлинних клітин

розташовувались поблизу судин з наявністю еритроцитівп. З цього можна зробити висновок, що некроз пухлинних клітин не пов'язаний безпосередньо з кисневим голодуванням.

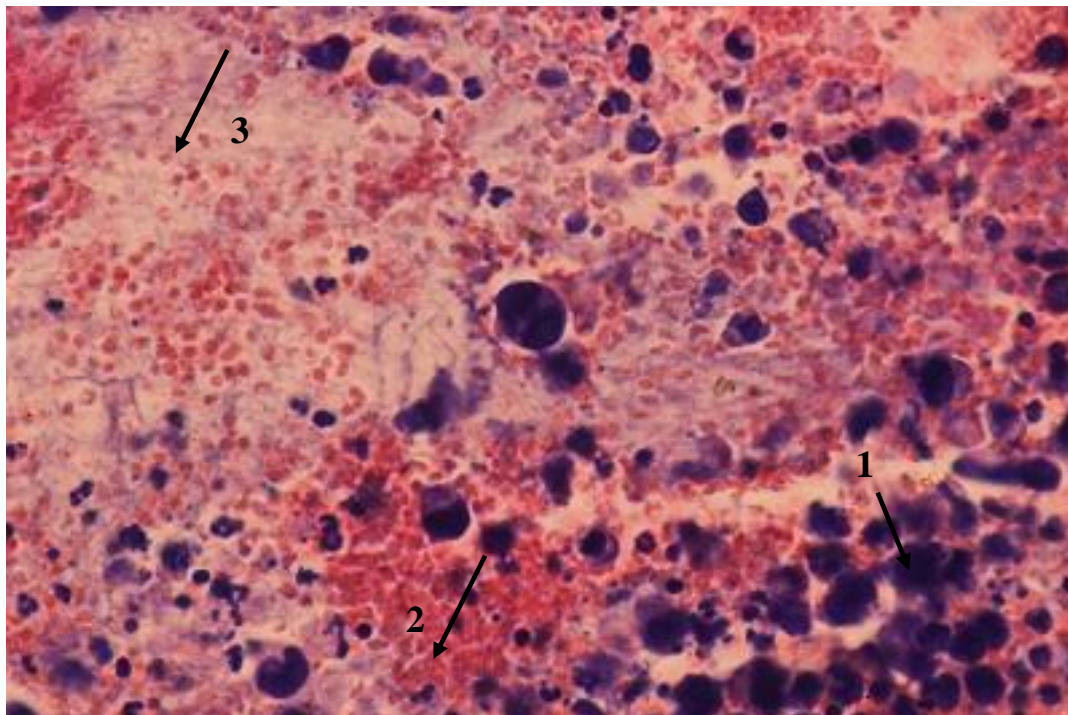


Рис. 3.80. Центральна частина пухлини на 24 день при застосуванні МСК. Гістопрепарат: 1 – клітини пухлини; 2 – еритроцити; 3 – вогнище некрозу. Фарбування гематоксиліном Караці та еозином, $\times 400$.

Більш того, кількість кровоносних судин у периферичних ділянках пухлини порівняно з відповідним показником пухлин на 18-ту добу росту була достовірно більшою.

На 24-ту добу спостереження кількість судин в тканини пухлин тварин, яким вводили також МСК, перевищувала відповідний показник у тварин контрольної групи.

Також реєструвалась інфільтрація периферичних ділянок пухлини еритроцитами, які в цей строк спостереження, як і в попередній, були склеєними.

Місцями виявлялись осередки суцільної еритроцитарної маси, в якій еритроцити перебували на різних стадіях лізису (див. рис. 3.80).

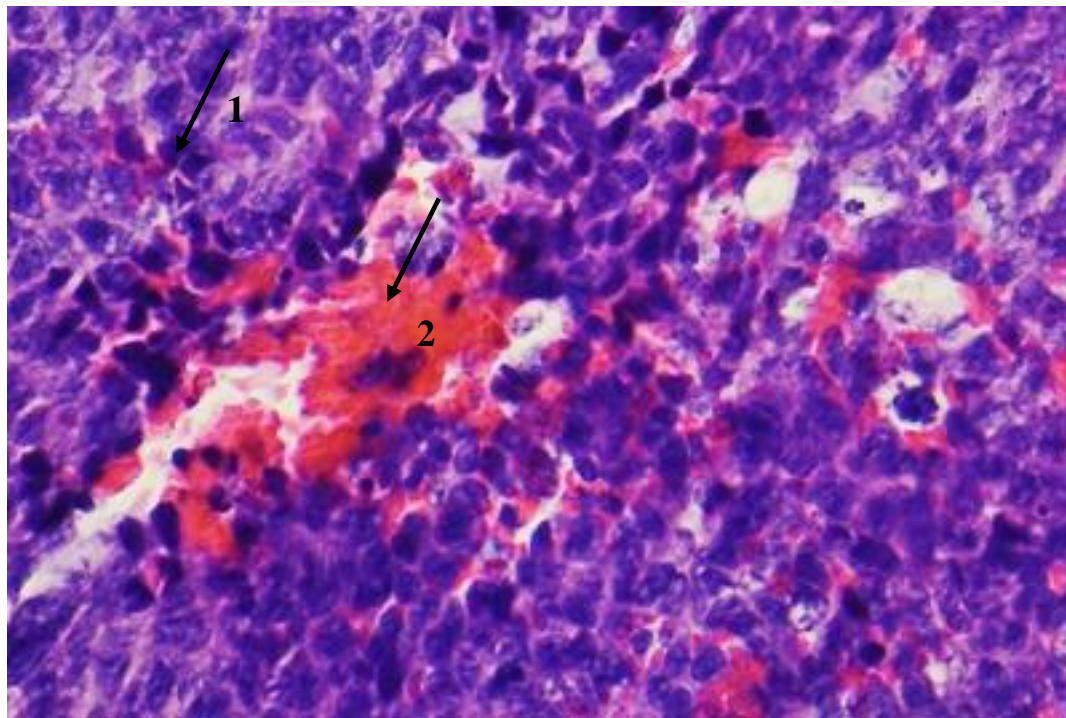


Рис. 3.81. Периферична частина пухлини на 24 добу при застосуванні МСК. Гістопрепарат: 1 – клітини пухлини; 2 – еритроцити. Фарбування гематоксиліном Караці та еозином, $\times 400$.

Віддалено від вогнища первинного росту пухлини в скелетних м'язах на поодиноких їх ділянках поблизу кровоносних капілярів, які проходили в товщі м'язів між м'язовими волокнами, виявлялися скупчення пухлинних клітин та їх проникнення між поряд розташованими м'язовими волокнами (рис. 3.82).

Крім того, в цей термін спостережень у міжм'язовій клітковині утворювались невеликі за розмірами дочірні вогнища пухлинного росту – метастази (рис. 3.83). Це засвідчує, що пухлина в процесі своєї прогресії набувала властивості метастазувати в пухку волокнисту сполучну тканину.

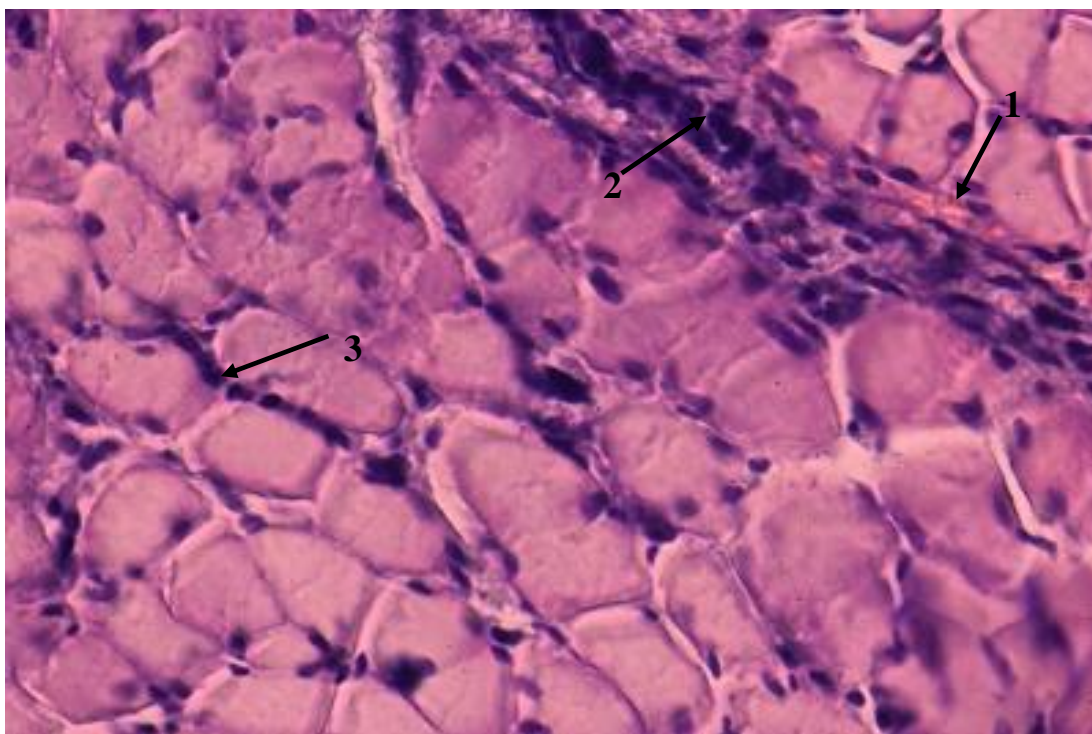


Рис. 3.82. М'яз миші з трансплантованою карциномою легені Льюїс на 24 добу при застосуванні МСК. Гістопрепарат: 1 – кровоносний капіляр; 2 – пухлинні клітини по ходу кровоносного капіляру; 3 – пухлинні клітини між м'язовими волокнами. Фарбування гематоксиліном Караці та еозином, $\times 400$.

У таблиці 3.43 підсумовані результати гістоморфометричної оцінки первинної карциноми легені Льюїс при введенні тваринами мезенхімних стовбурових клітин.

Протягом спостереження істотно зменшувалась питома вага паренхіми. Натомість, збільшувалася площа ділянок некрозу, ступінь васкуляризації пухлинної тканини, відмічався більш активний розвиток пухкої волокнистої сполучної тканини. Виявлено позитивну кореляцію між ступенем розвиненості судинної сітки і ступенем некротичних змін. Це свідчить, що васкуляризація пухлини достатня і вона не є первинною причиною появи вогнищ некрозу.

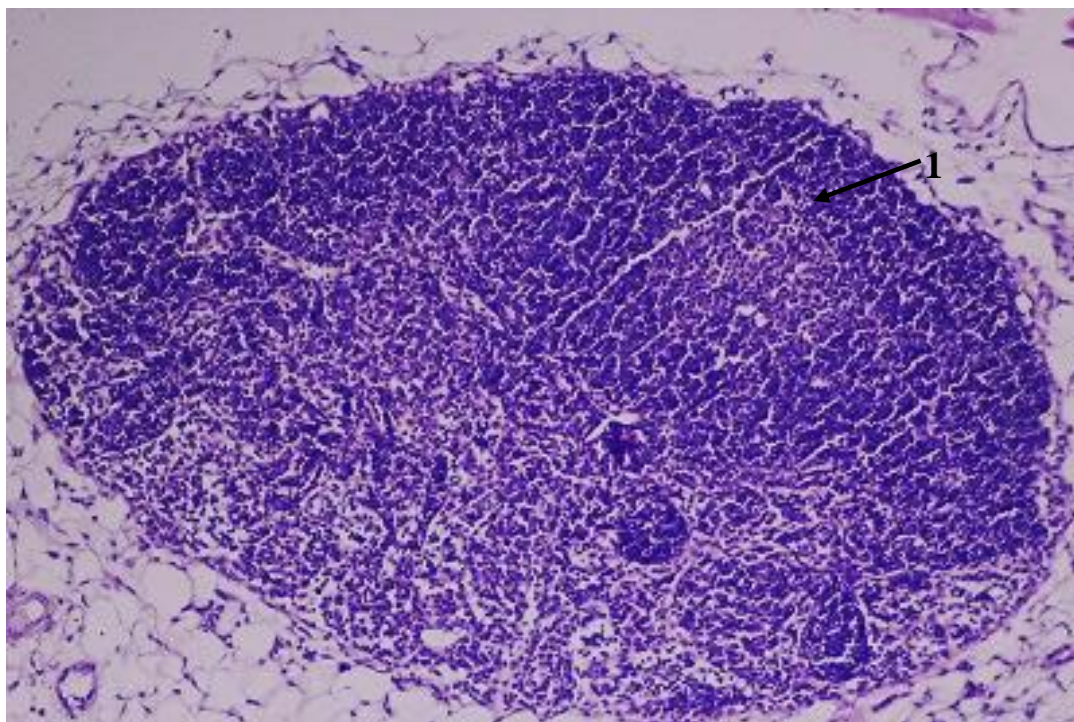


Рис. 3.83. М'яз миші з трансплантованою карциномою легені Льюїс на 24 добу при застосуванні МСК. Гістопрепарат: дочірнє вогнище пухлинного росту в міжм'язовій клітковині. Фарбування гематоксиліном Караці та еозином, $\times 50$.

При порівнянні гістоморфометричних параметрів первинної пухлини у контролі та за введення МСК видно, що найбільші розбіжності стосуються ступеню васкуляризації пухлини і розвитку некротичних змін (табл. 3.44). Щільність судин в пухлинах за впливу МСК у 1,4 рази перевищувала показник у тварин групи контролю на 18-ту добу спостереження та на 50 % на 24-ту добу спостереження. Розбіжності були статистично достовірними.

Площа ділянок некрозу у пухлинній тканині за впливу МСК зростала у два та більше разів порівняно з контролем .(первинна карцинома легені Льюїс у тварин, яким не вводили МСК).

У таблиці 3.45 підсумовані основні відмінності морфологічних особливостей клітин пухлини карциноми легені Льюїс залежно від впливу алогенних МСК на організм реципієнтів-пухлиноносіїв.

Таблиця 3.43

Морфометричні показники первинної карциноми легені Льюїс за введення МСК, $M \pm m$, %

Показник	Термін спостереження	
	18-та доба	24-та доба
Питома вага паренхіми	65,5±6,3	41,5±5,6*
Питома вага сполучної тканини	6,8±2,1	10,3±2,7
Питома вага ділянок некрозу	25,7±4,2	48,2±7,5*
Щільність судин	19,4±2,5	27,2±3,7*

Примітки: * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$, *** – $p < 0,001$ відносно показників тварин контрольної групи.

Отже, за впливу МСК на 18-ту добу досліджень у первинній пухлині було зареєстровано високу щільність судин на одиницю площі, яка була у 1,4 рази більшою, ніж у групах тварин без впливу МСК. У судинах частіше реєстрували гемостаз за типом складжу еритроцитів.

Спостерігались ознаки гематогенного метастазування та метастазування за продовженням. Була збільшена кількість некротичних ділянок пухлини. Морфологія пухлинних клітин була більш атиповою.

На 24-ту добу в зразках за впливу МСК реєстрували значно більшу кількість клітин пухлини в стані дистрофії, а поміж них лімфоцити, які створювали осередки девіталізації пухлинної тканини. Зареєстровано багато ділянок некрозу, оточених дегенеративно зміненими пухлинними клітинами.

За впливу алогенних МСК на 24-ту добу дослідження реєстрували вищі показники площі девіталізації та некротизації пухлинної тканини з редукцією судинного русла, хоча в цілому ступінь васкуляризації був вищим.

Таблиця 3.44

**Морфометричні показники первинної карциноми
легені Льюїс за введення МСК на 18-ту та 24-ту добу дослідження,
М±m, %**

Параметри	Первинна карцинома легені Льюїс	
	контрольна	Дослідна (введення МСК)
18-та доба		
Питома вага паренхіми	76,7±5,9	65,5±6,3**
Питома вага сполучної тканини	9,9±3,8	6,8 ± 2,1
Питома вага ділянок некрозу	13,4±3,7	25,7 ± 4,2**
Щільність судин	13,7±3,1	19,4 ± 2,5*
24-та доба		
Питома вага паренхіми	63,5 ± 6,4	41,5 ± 5,6**
Питома вага сполучної тканини	17,9 ± 3,3	10,3 ± 2,7**
Питома вага ділянок некрозу	18,6 ± 3,1	48,2 ± 7,5***
Щільність судин	18,1 ± 2,2	27,2 ± 3,7**

Примітки: * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$, *** – $p < 0,001$ відносно показників тварин контрольної групи.

У цілому за впливу МСК отримано ознаки більш інтенсивного метастазування по продовженню та гематогенного метастазування. Новоутворена пухлина при застосуванні МСК була побудована з виразно атипівих клітин з інтенсивно базофільною цитоплазмою і не мала будь-якої виразної строми, що є свідченням високого ступеня її анаплазії, і, відповідно, злоякісності, тоді як спонтанна карцинома легені Льюїс складалась з поліморфних клітин, ознаки атипії яких були менш виразними.

Таблиця 3.45

**Порівняльна характеристика морфологічних особливостей карциноми
легені Льюїс залежно від впливу МСК**

Ознаки	Контрольна (без впливу МСК)	Дослідна (за впливу МСК)
18-та доба		
Межі пухлини	чіткі	переважно чіткі
Оточуюча м'язова тканина	переважно незмінена	присутність пухлинних клітин
Цитоплазма клітин	велика, оксифільна	базофільна
Розмір клітин і форма	поліморфні	переважно округлі, виразно атипові
Кількість судин	незначна	велика
Ділянки некрозу	поодинокі	відносно великі
Гематогенне метастазування	практично відсутнє	є ознаки
24-та доба		
Межі пухлини	переважно чіткі	чітких границь немає
Гематогенне метастазування	незначне	інтенсивне
Вогнища некрозу	поодинокі в центрі	великих розмірів у центрі та на периферії
Кількість судин	помірна	у 1,3 рази більша
Сполучна тканина	присутня	відсутня

Визначені нами морфологічні особливості пухлинних клітин повністю співпадають з отриманими даними щодо кінетики росту як первинного

вогнища пухлини, так і швидкості і інтенсивності процесу метастазування у легені за впливу МСК.

Ці дані однозначно свідчать про негативний вплив МСК на процеси перебігу онтогенезу в експериментальній моделі перевивної карциноми легені Льюїс.

3.3.4 Вплив алогенних мезенхімних стовбурових клітин на чутливість до індукції апоптозу та рівень генетичної стабільності клітин первинної пухлини мишей C57Bl/6 з перещепленою карциномою легені Льюїс. Аналіз показників, отриманих за методу проточної цитометрії, дав можливість оцінити рівень генетичної стабільності клітин первинної пухлини мишей з трансплантованою карциномою легені Льюїс за впливу алогенних МСК. Встановлено, що за умов дії алогенних МСК відбувалися достовірні зміни у розподілі популяції клітин первинної пухлинної тканини на диплоїдні, анеуплоїдні та за окремими фазами клітинного циклу.

Як видно з даних таблиці 3.42, карцинома легені Льюїс характеризується високим вмістом анеуплоїдних клітин. У тварин контрольної групи рівень анеуплоїдії досягає 60 % пухлинних клітин. Такий показник притаманний тільки пухлинам високого ступеня злоякісності.

Однак, за впливу МСК, у тварин дослідної групи відсоток анеуплоїдних клітин в популяції ще додатково збільшувався, досягав майже 80 % та у 1,3 рази перевищував такий у тварин контрольної групи (табл. 3.46).

Така зміна кількості анеуплоїдних клітин є показником нестабільності геному клітин первинної пухлини за впливу МСК. Дисперсійний аналіз щодо визначення сили впливу застосування МСК на рівень анеуплоїдії підтверджує ці результати. За нашими розрахунками сила впливу МСК на рівень анеуплоїдії клітин первинної пухлини становить $\eta^2_x = 86 \%$ при $p < 0,001$.

Таблиця 3.46

Рівень анеуплоїдії та розподіл клітин тканини первинної пухлини мишей C57Bl/6 за впливу МСК за фазами клітинного циклу, $M \pm m$, %

Клітини	Вміст клітин, %	Фази клітинного циклу			
		G ₀ /G ₁	G ₂ /M	S	G ₂ /M + S
контрольна група (LLC)					
Диплоїдні	40,80±0,80	76,65±3,45	16,13±1,28	7,22±2,23	23,35±3,45
Анеуплоїдні	59,20±0,80	43,82±2,89	10,58±0,05	45,59±2,90	56,17±2,90
дослідна група (LLC з наступним введенням тваринам МСК)					
Диплоїдні	23,32±1,99***	93,18±2,01**	6,70±1,95*	0,12±0,09**	6,86±2,02**
Анеуплоїдні	76,68±1,99***	31,98±3,42*	13,42±0,37**	54,59±3,31	68,02±3,42*

Примітки: * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$, *** – $p < 0,001$ відносно показників тварин контрольної групи.

При розподілі анеуплоїдних клітин за фазами клітинного циклу встановлена достовірна різниця у кількості клітин проліферативного пулу $G_2/M + S$ між тваринами дослідної і контрольної груп. За впливу МСК кількість клітин проліферативного пулу $G_2/M + S$ становить $68,02 \pm 3,42$ % проти $56,17 \pm 2,90$ % у тварин контрольної групи ($p < 0,05$). Збільшення відбувається як за рахунок клітин у премітотичній і мітотичних фазах клітинного циклу, так і фази синтезу ДНК. Відповідно, кількість анеуплоїдних клітин у фазах спокою значно зменшена у тварин контрольної групи.

Описаний ефект засвідчує підвищення активності поділу анеуплоїдних клітин первинної пухлини у тварин дослідної групи за впливу алогенних

МСК. На нашу думку це можна пояснити наступним. Відомо, що строма пухлини складається з позаклітинного матриксу і різних типів мезенхімних клітин, включаючи макрофаги, ендотеліальні клітини, лімфоцити, перицити, фібробласти і міофібробласти. Ці клітини строми взаємодіють з пухлинними клітинами при безпосередньому контакті і через паракринні сигнальні механізми, що опосередковані секрецією розчинних факторів, у тому числі цитокінів, хемокінів і факторів росту. Взаємодія між пухлинними і стромальними клітинами впливає на ріст пухлини, метастази, ангиогенез. МСК також мігрують у пухлинну тканину, де вони включаються до пухлинної строми і через вище вказані механізми стимулюють проліферацію клітин пухлини, що підтверджується нашими даними.

Що стосується диплоїдних клітин, то тут ми бачимо зворотну картину. За впливу МСК чисельність популяції диплоїдних клітин у стадії проліферації набагато менша, тоді як більша їх частина перебуває у стані спокою (дормантному стані) – фазі G_0/G_1 .

Тобто, пул проліферуючих клітин, завдяки яким здійснюється ріст первинної пухлини та метастазування, за впливу МСК в більшій мірі складається з більш злоякісних анеуплоїдних клітин, тоді як в контрольній групі до нього відносяться і диплоїдні клітини зі значно меншим рівнем генетичної нестабільності. Цей фактор є додатковим чинником, який обумовлює більш злоякісний перебіг пухлинного процесу за впливу МСК.

Крім того, встановлено зміну чутливості клітин первинної пухлини до апоптозу за впливу МСК.

Так, відсоток апоптотичних клітин первинної пухлини за впливу МСК знизився в 1,4 рази і становив $41,82 \pm 1,37$ % проти $56,59 \pm 0,92$ % у тварин контрольної групи ($p < 0,001$). При дослідженні сили впливу анеуплоїдії на рівень апоптозу $\eta^2_x = 95$ % ($p < 0,001$). Це засвідчує, що зі збільшенням рівня генетичної нестабільності пухлинні клітини стають більш резистентними до розвитку процесу апоптозу.

Отже, в результаті проведених досліджень встановлено, що МСК впливають на рівень генетичної стабільності клітин первинної пухлини мишей C57BL/6 з перещепленою метастатичною карциномою легені Льюїс. Застосування алогенних МСК призводить до достовірного підвищення показника рівня анеуплоїдії клітин первинної пухлини та збільшення проліферативного пулу анеуплоїдних клітин. За впливу алогенних МСК достовірно знижується чутливість пухлинних клітин до індукції апоптозу. Все це свідчить на користь більш злоякісного фенотипу клітин LLC за дії МСК.

Висновки до підрозділу 3.3

Підсумовуючи результати виконання даного фрагменту досліджень, можна зробити наступні висновки:

1. За впливу стовбурових 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 $\eta^2x=0,74$, $p < 0,05$; 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 перебігу захворювання.

2. Трансплантація алогенних мезенхімних стовбурових 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 злоякісний фенотип клітин первинної пухлини.

3. Застосування алогенних мезенхімних стовбурових клітин культури кісткового мозку мишей 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 перебігу пухлинного процесу; збільшення щільності судин на одиницю площі в первинній пухлинній тканині у 1,3 ($p < 0,05$) рази, в яких виявлено гемостаз за типом складжу еритроцитів, осередки девіталізації пухлинної тканини, клітини у стані дистрофії з каріорексисом та каріолізисом, ділянки некрозу, оточені дегенеративно зміненими пухлинними клітинами. Вказані морфологічні зміни засвідчують активізацію онкопроцесу.

Матеріали підрозділу 3.3 опубліковано в працях [6, 11, 12, 13, 14, 16, 17, 52, 166, 236, 238, 239, 240, 354, 443].

РОЗДІЛ 4

АНАЛІЗ І УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕНЬ

Дисертаційна робота присвячена вивченню властивостей (морфологічних, клоногенних, функціональних, вікових, імунологічних, каріотипової стабільності) стовбурових клітин тваринного походження залежно від культури первинного матеріалу (кістковий мозок, жирова та нервова тканина), видової їх приналежності, способу отримання, культивування *in vitro* та їх системного впливу на пухлинний процес тварин-реципієнтів з трансплантованою карциномою легені Льюїс.

Функціональна активність стовбурових клітин (життєздатність, адгезивні властивості, здатність продукувати фактори росту і цитокіни, проліферативна активність, чутливість до індукції апоптозу) значною мірою залежить від способу обробки первинного матеріалу, середовища культивування та застосування ростових факторів. У сучасній літературі щодо роботи з біологічним матеріалом описані різноманітні методи механічної та ферментативної дезагрегації первинного матеріалу, які забезпечують виділення МСК зі складу сполучної тканини. Оскільки кожний вид тварин має свої біологічні особливості ми дослідили вказані методи для обробки первинного матеріалу з метою отримання культур стовбурових клітин жирової тканини собаки, миші, коня.

У собак стовбурові клітини культури жирової тканини отримували з двох різних зон розташування – підшкірної та більшого сальника. Відомо, що жирова тканина є місцем екстрагонадного синтезу статевих гормонів із попередників, що циркулюють у периферичній крові. Крім того, є дані, що спрямованість цього синтезу та його інтенсивність суттєво відрізняється у жировій тканині різної локалізації. Так, у жінок, особливо за менопаузи, в жировій тканині підвищується експресія сульфатази стероїдів, яка метаболізує основний попередник стероїдних гормонів

дегідроепіандростерон сульфат. Активність сульфатази стероїдів майже вдвічі вища в клітинах абдомінальної жирової тканини порівняно з підшкірною: 545 пмоль/кг на годину та 379 пмоль/кг на годину ($p < 0,001$) відповідно [422].

Та ж група авторів показала, що в абдомінальній жировій тканині вища концентрація естрону, а у підшкірній, навпаки, естрадіолу [208]. Silva et al. встановили, що вміст таких цитокінів, як ІЛ-6, колонієстимулюючий фактор гранулоцитів та білок-1, хемоаттрактант моноцитів, достовірно вищий в абдомінальній жировій тканині, ніж у підшкірних депозитах [127]. Усі зазначені фактори можуть впливати на ефективність отримання МСК з різних зон розташування жирової тканини. Тому ми окремо охарактеризували способи отримання МСК собак з жирової тканини різної локалізації та їх функціональні властивості. Дослідження були проведені тільки в собак жіночої статі.

При виконанні першого завдання нами був розроблений «Спосіб отримання мезенхімальних стовбурових клітин культури жирової тканини собаки» (патент України на корисну модель № 109148) і «Спосіб отримання нейральних стовбурових клітин кота» (патент України на корисну модель № 112379). Вони відрізняються від існуючих аналогів культивуванням клітин у присутності фрагментів експланту, вкритих накривними скельцями. Це дозволяє уникнути пошкоджуючого впливу дезагрегуючого фактора (колагенази) на клітини стромально-васкулярної фракції, зберегти тканинні цитокіни і фактори росту та забезпечити їх надходження з фрагментів тканини у середовище і тим створити необхідну концентрацію, що має вирішальне значення для проліферації, особливо в первинній культурі, та здешевити процедуру отримання стовбурових клітин.

Нами вперше в Україні відпрацьовано методику відбору жирової тканини коня. Особливостями методики є: вибір оптимального місця для виконання оперативного втручання, а саме у зоні між коренем хвоста та

сідничою ділянкою; застосування найменш травматичного для тварини методу її фіксації, використання найменшої кількості седативного препарату. Це дозволяє значно скоротити період адаптації тварини у післяопераційний період. Застосований нами метод відбору первинного матеріалу є досить легким у виконанні та передбачає фіксацію, яка не завдає болю тварині та виключає травматизацію у порівнянні з іншими способами фіксації (повал, накладання закрутки на верхню губу). Використання незначної дози седативного препарату не спричинює негативної дії на фізіологічний стан систем і органів та водночас запобігає виникненню стресу в тварини.

Нами також розроблений метод отримання стовбурових клітин культури нервової тканини головного мозку. На відміну від відомих сучасних методик отримання культури фетальних нейральних прогеніторних клітин з гіпокампа миші [64, 124], зубчастої звивини [334, 388], при застосуванні запропонованого нами методу вдається уникнути пошкоджуючого механічного та хімічного впливу на клітини, зберегти тканинні цитокіни і фактори росту та забезпечити їх надходження з фрагментів нервової тканини у середовище і тим створити необхідну концентрацію, що має вирішальне значення для проліферації, особливо у первинній культурі, та здешевити процедуру їх отримання [35].

На наступному етапі досліджень, перш за все, було проведено визначення ефективності запропонованого нами модифікованого методу експланту на функціональні властивості МСК культури жирової тканини різних видів тварин: собаки, коня. Оцінювали ефективність колонієутворення, коефіцієнт проліферації, життєздатність клітин. Встановлено, що незалежно від видової належності цей метод був найбільш ефективним порівняно зі стандартним методом експланту та ферментативною обробкою тканини.

Найкращі функціональні показники були отримані стосовно клітин культури жирової тканини більшого сальника, які були отримані

модифікованим методом експланту: кількість колонієутворюючих одиниць на 4-ту добу культивування становила $8,67 \pm 0,02$ шт. ($p < 0,001$), життєздатність клітин – $98,17 \pm 0,31$ % ($p < 0,05$) та кількість клітин у культурі на 14-ту добу культивування – $735,83 \pm 15,41$ тисяч ($p < 0,001$).

Миша є найбільш широко використовуваним видом у лабораторних дослідженнях, оскільки ними легко маніпулювати, а їх генетична інформація легко доступна. Однак миша є найскладнішим видом для отримання МСК з кісткового мозку. Кістковий мозок складається з неоднорідних популяцій клітин, які містять мало МСК 10^5 – 10^6 клітин. Крім того, МСК кісткового мозку розташовані поблизу внутрішньої поверхні кістки, що ускладнює їх вимивання. Був запропонований метод культивування епіфізів без ферментативної обробки для отримання мезенхімних стовбурових клітин. Автори вважають що саме там є ніша стовбурових клітин [249].

Нами було проведено визначення оптимальних умов отримання МСК культури кісткового мозку миші. Встановлено, що проведення центрифугування первинної суспензії клітин у градієнті щільності фіколу $1,074$ – $1,076$ з подальшим використанням поживного середовища DMEM або RPMI суттєво підвищує кількість МСК у первинній культурі, коефіцієнт проліферації та їх життєздатність. Зі збільшенням щільності фіколу до $1,078$ базові показники культур МСК не відрізняються від таких, що отримані від нецентрифугованої первинної суспензії клітин кісткового мозку, а за концентрації градієнта щільності $1,080$ – є достовірно гіршими. Встановлено обернені кореляційні зв'язки між градієнтом щільності фіколу та кількістю клітин у первинній культурі $r=0,84$ ($p < 0,001$), коефіцієнтом проліферації $r=0,75$ ($p < 0,001$) та життєздатністю $r=0,56$ ($p < 0,05$).

Значна увага в роботі приділялась морфології МСК. Відомо, що на сьогоднішній день розрізняють дві основні морфологічні форми МСК: невеликого розміру, округлі або веретеноподібні, швидко проліферуючі клітини та крупні розпластані клітини (зрілі, повільно проліферуючі

клітини). Тобто, розбіжності спостерігались залежно від швидкості проліферації МСК [141, 249]. Водночас, такі закономірності були притаманні МСК різного походження, і суттєвих розбіжностей залежно від видового та тканинного походження МСК не виявлено [248, 473].

При культивуванні МСК різного походження вже на другому пасажі клітини адаптувались до умов *in vitro*, формували моношар на дні культурального посуду, загиблі клітини та клітини, що не відносились до мезенхімних стовбурових, були еліміновані. Форма переважної більшості клітин була веретеноподібною з невеликим об'ємом цитоплазми, яка формувала довгі тонкі вирости. При подальшому культивуванні морфологія клітин змінювалась в напрямку збільшення розміру клітин і розміру цитоплазми, появи розпластаних клітин з великою кількістю цитоплазматичних виростів. Це збігається з даними переважної більшості дослідників. Так, Maciel et al. при культивуванні МСК кісткового мозку котів при порівнянні клітин 1-го та 3-го пасажів спостерігали збільшення довжини з $106,97 \pm 38,16 \mu\text{m}$ до $177,91 \pm 71,61 \mu\text{m}$ та ширини з $30,79 \pm 16,7 \mu\text{m}$ до $40,18 \pm 20,48 \mu\text{m}$ [279].

Морфофункціональні властивості МСК культур кісткового мозку та жирової тканини на різних пасажах культивування в комплексі з іншими отриманими даними свідчили на користь їх поступового реплікаційного старіння. Воно проявлялось збільшенням об'єму цитоплазми $r=0,73$ ($p=0,01$); зниженням ядерно-цитоплазматичного співвідношення $r=-0,87$; ($p=0,001$); збільшенням кількості виростів цитоплазми; зниженням коефіцієнту проліферації ($p<0,01$) та життєздатності клітин ($r=-0,70$; $p<0,05$); поступовим зменшенням кількості клітин у фазах G_2/M і S клітинного циклу ($p<0,001$); підвищенням чутливості до апоптозу, індукованому відсутністю факторів росту $r=0,81$; ($p=0,001$); збільшенням рівня секреції ІЛ-6 ($p<0,01$). Кількість диплоїдних клітин знижувалась, хоча в усіх випадках не було нижчим за 95 %. Відомо, що значна анеуплоїдія МСК асоційована зі

збільшенням ризику злоякісної трансформації [400, 407]. У комплексі отримані дані свідчать на користь реплікаційного старіння культур та обумовлюють доцільність використання у подальших експериментах МСК культури жирової тканини та кісткового мозку на ранніх етапах культивування. Близькі результати були отримані Yang et al. при дослідженні морфологічних особливостей та проліферативної активності МСК кісткового мозку на 4-му та 8-му пасажах культивування [125]. Проблема реплікаційного старіння є важливою перешкодою щодо застосування МСК пізніх пасажів культивування. Тому є спроби затримати розвиток цього процесу [482]. Наприклад, Нео et al. вказують за значне запізнення старіння культур МСК при культивуванні на плашках, вкритих полі-L-лізином [374], інші автори – при нейтралізації ІЛ-6 [237].

Експресія антигенів поверхневих мембран імуноцитохімічним методом була визначена МСК в культурах жирової та нервової тканин. Отримані дані були близькими, хоча в цілому спостерігався нижчий рівень експресії в СК з нервової тканини. В більшості клітин виявлена висока експресія віментину, що підтверджує мезенхімне походження МСК та є основною характеристикою МСК різного походження [61, 335], та актину. Актин є необхідним для прикріплення клітин до дна культурального посуду, розпластування та рухової активності клітин. Швидкість формування моношару у культурі залежить від швидкості полімеризації актину, формування актоміозинових комплексів та їх скорочення [60]. Крім того, щільність актинових філаментів та їх переважна локалізація асоційовані з напрямком диференціювання клітин: розгалужена внутрішньоядерна актинова мережа сприяє диференціюванню МСК у остецити, а цитоплазматична – у адипоцити [245]. Інтерес викликають спроби впливати на полімеризацію та розташування актинових філаментів у МСК: механічний вплив на клітини призводить до втрати полярності, фосфорилування β -катеніну, активізації Wnt–сигнального шляху та активізації синтезу

проангіогенних факторів [81]. До аналогічних наслідків (індукції остеогенного диференціювання) призводить культивування МСК на плашках, вкритих сумішшю полімерів, що створюють неоднорідну поверхню (з виступами та заглибленнями). Ефект також опосередковано змінами у полімеризації актину та переміщенню актинових філаментів у клітині [466].

Імуноферментні дослідження експресії антигенів МСК виявили високий вміст кадгерину та помірний вміст β -катеніну з переважною локалізацією у ядрі на ранніх стадіях культивування. Це засвідчує про активний стан Wnt/ β -катенін сигнального шляху трансдукції внутрішньоклітинного сигналу у МСК культури жирової тканини на ранніх стадіях культивування. Wnt/ β -катенін сигнальний шлях – висококонсервативний і практично не розрізняється за складом задіяних молекул в клітинах різного типу, від нематоди *Caenorhabditis elegans* до людини [69, 165, 169, 413] (рис. 4.1). Він бере участь у регуляції багатьох процесів, що відбуваються у стовбурових клітинах – проліферації, спрямованості диференціювання, взаємодії з мікрооточенням. Кінцевим результатом активації Wnt/ β -катенін сигнального шляху є стабілізація β -катеніну, який переміщується у ядро, утворює транскрипційний комплекс з білками родини Т-клітинних факторів транскрипції (T-cell factor; TCF) та активує гени, що сприяють проліферації, міграції, диференціюванню. Розпочинається Wnt/ β -катенін сигнальний шлях зі зв'язування Frizzled рецепторів поверхневих мембран зовнішніми лігандами родини Wnt. За відсутності зв'язку між Frizzled і Wnt-лігандом β -катенін зв'язаний з так званим комплексом «деструкції», до складу якого входить і серін/треонін протеїн кіназа GSK-3 (glycogen syntase kinase 3; глікоген синтаза кіназа 3), що фосфорилує β -катенін і сприяє його деградації у протеосомах. Коли відбувається взаємодія рецепторів Frizzled і Wnt-лігандів, комплекс

«деструкції» руйнується, фосфорилювання β -катеніна не відбувається і він може виконувати свою функцію як коактиватора транскрипції.

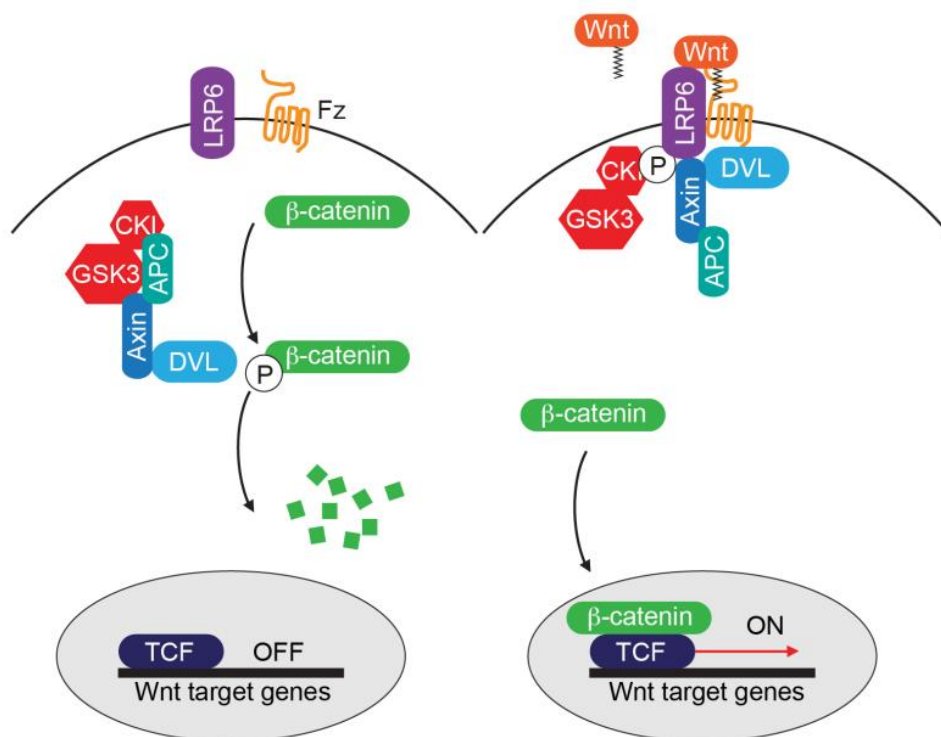


Рис. 4.1 Схема Wnt/ β -катенін сигнального шляху у нематоди *Caenorhabditis elegans* (за даними он-лайн підручника Wormbook.org; wntsignaling.html 10.1895/wormbook.1.7.1)

Висока активність Wnt/ β -катенін сигнального шляху виявлена більшістю дослідників функціональних властивостей МСК. Завдяки їй клітини знаходяться в проліферуючому стані, здатні підтримувати стабільність генетичного матеріалу, відповідати на дію факторів росту та диференціації [161, 476]. Однак, водночас саме через цей шлях реалізується і поступове старіння культур стовбурових клітин [485].

Характерною особливістю МСК у нашому дослідженні була експресія антигену CD44. Це співпадає з даними інших авторів [344]. Антиген CD44 приймає участь у міжклітинній взаємодії як рецептор гіалуронової кислоти, а

також, можливо, колагену і металопротеїназ. Він важливий для функції МСК. Зв'язування CD44 з лігандом (гіалуроновою кислотою) індукує активацію кінази ERK (extracellular signal-regulated kinase) та сприяє проліферації клітин [226, 396], спрямовує хомінг та міграцію [146, 225]. В дослідженнях на стовбурових клітинах пухлин встановлено, що CD44 пригнічує апоптоз, знижуючи експресію Fas антигену, проапоптотичних молекул Bcl-xl і Bak та ефекторних каспаз [359].

Білок Bcl-2 – основний регулятор стабільності мітохондріальних мембран, попереджає порушення їх цілісності за дії проапоптотичних факторів, виходу цитохрому C у цитоплазму, формування апоптосом і власно розвиток апоптозу [112, 207, 295]. Тобто, білок Bcl-2 виконує анти-апоптотичну функцію в клітинах різних типів. Рівень експресії Bcl-2 був високим на четвертому пасажі ($103,67 \pm 6,78$ балів) і знижувався в клітинах на 10-му пасажі ($66,67 \pm 5,03$ балів; $p < 0,05$). Ці дані показують чітку кореляцію з підвищенням чутливості до індукції апоптозу в умовах безсироваткового культивування в культурах МСК на пізніх етапах культивування. Відомо, що за таких умов клітини не отримують достатню кількість ростових факторів, що пригнічує експресію анти-апоптотичної молекули Bcl-2 на мембрані мітохондрій. В свою чергу знижена експресія Bcl-2 сприяє «розкриттю» мітохондріальних пор, виходу у цитоплазму каспаз, з їх наступною активацією, що викликає фрагментацію ДНК та власне розвиток апоптотичного процесу [408].

Однією з особливостей складу жирних кислот у МСК різного походження були високий вміст насичених пальмітинової (C16:0) і стеаринової (C18:0) жирних кислот та моноенової олеїнової кислоти (C18:1n9c). На другому місці серед мононенасичених жирних кислот у складі МСК знаходилась пальмітолеїнова кислота. Присутність олеїнової та пальмітолеїнової кислот обумовлена як надходженням із культурального середовища, так і синтезом *de novo*. Останній пов'язаний з активністю

стеарол-CoA десатурази (Stearoyl-CoA desaturase) (SCD) [173].

SCD у комплексі з нікотинамідаденіндинуклеотидом (NADH), цитохромом b_5 та флавопротеїном цитохром b_5 редуктазою індукує появу подвійного зв'язку у насичених жирних кислотах [356, 393]. Утворені олеїнова і пальмітолеїнова кислота – найбільш представлені моноеніві кислоти і є субстратами для синтезу різноманітних ліпідів, включаючи фосфоліпіди, тригліцериди, ефіри холестерину, гліцероли. Крім того, вони є медіаторами при передачі внутрішньоклітинних сигналів при зв'язуванні рецепторів поверхневих мембран.

У нашому дослідженні співвідношення C18:1/C18:0 значно перевищувало показник, типовий для сироватки крові тварин і людей, в середньому 0,8 за даними Attie et al. [393] і наближувалось до показників, характерних для МСК культури кісткового мозку людини – 1,6 [383]. Тому ми зробили висновок щодо підвищення активності SCD в МСК, отриманих нами з різних джерел. Це узгоджується з результатами інших дослідників. Висока активність SCD була виявлена в МСК культури кісткового мозку людини [383], плаценти [424]. Ben-David et al. показали, що ембріональні стовбурові клітини людини мають високу активність SCD, а її пригнічення викликає різке зменшення концентрації олеїнової кислоти, порушення складу ліпідів клітинних мембран та ініціює розвиток апоптозу [407]. Висока активність SCD – невід'ємна характеристика стовбурових клітин пухлин злоякісного походження і асоційована з їх здатністю до проліферації, резистентності до дії хіміотерапевтичних засобів, тощо [332, 360, 484].

Тісний зв'язок існує між активністю SCD та Wnt/ β -катенін сигнальним шляхом. SCD необхідна для приєднання пальмолеїнової кислоти до амінокінцевого домену Wnt, що важливо для взаємодії останнього з транспортними білками і мембранними рецепторами [452]. На моделі гепатоцелюлярної карциноми гризунів показано, що β -катенін, як фактор транскрипції, підсилює експресію гена SCD, а продукти фермента SCD –

мононенасичені жирні кислоти, в свою чергу, стабілізують β -катенін [419]. Ці дані також узгоджуються з отриманими нами результатами імуногістохімічного визначення експресії окремих антигенів, які засвідчують на користь активного стану Wnt/ β -катенін сигнального шляху в МСК різного походження.

Виявлена висока концентрація олеїнової кислоти в МСК ранніх пасажів культивування може бути однією з причин високої резистентності до апоптозу, індукованого безсироватковим культивуванням. Відомо, що апоптоз МСК культури кісткового мозку людини індукується підвищеним вмістом у культуральному середовищі пальмітинової кислоти (C16:0), однак він пригнічується при наявності, крім пальмітинової, також і олеїнової кислоти (C18:1). Якщо пальмітинова кислота здатна підвищувати концентрацію в мітохондріях клітин реактивних форм кисню, пошкоджувати мітохондріальну ДНК та активувати каспазно-залежний апоптоз, то олеїнова кислота нівелює всі зазначені шляхи негативного впливу пальмітинової кислоти [484].

Ще одним наслідком високої концентрації олеїнової кислоти в МСК може бути здатність клітин до синтезу факторів росту судин при подальшому диференціюванні. В експериментах з культурою гладком'язевих клітин судин щурів встановлено, що олеїнова кислота в залежності від дози підвищує експресію мРНК фактору росту ендотелію судин шляхом активації декількох сигнальних шляхів (Akt, mTOR, ERK-1/2, PKC-beta) [360].

Ми не виявили у спектрі жирних кислот МСК різного походження присутності насичених жирних кислот з довгим вуглеводним ланцюгом (C20:0, C22:0, C24:0). Аналогічні дані отримали Tigistu-Sahle et al. при дослідженні МСК культури кісткового мозку людини і зробили висновок про нездатність стовбурових клітин до подовження ланцюга насичених жирних кислот [332]. На наш погляд, така характерна риса ліпідного обміну відображає саме особливості стовбурової клітини.

Наявність незамінних поліненасичених жирних кислот в екстрактах МСК в основному відображує їх присутність у поживному середовищі. Відомо, що в багатьох клітинах може відбуватись синтез поліненасичених жирних кислот із коротколанцюгового попередника. Так, при активному метаболізмі лінолевої кислоти ($C_{18:2n6c}$) відбувається утворення спочатку гама-лінолевої кислоти ($C_{18:3n6c}$), потім дігомогама-лінолевої кислоти ($C_{20:3n6c}$), арахідонової ($C_{20:4n6c}$) і докозатетраєнової ($C_{22:4n6c}$) омега-6 кислот. Хоча в досліджених зразках МСК в достатній кількості була присутня лінолева кислота, ми не виявили жодного метаболіту зазначеного шляху перетворення. Тому ми вважаємо, що даний шлях не є активним у мезенхімних стовбурових клітинах.

При утворенні Омега-3 жирних кислот первинний метаболіт альфа-ліноленова кислота ($C_{18:3n3c}$) перетворюється в докозапентаєнову ($C_{22:5n3}$) і докозагексаєнову ($C_{22:6n3}$) кислоти. Ми виявили ці кислоти в більшій кількості в МСК культури жирової та нервової тканини порівняно з МСК культури кісткового мозку. Розбіжності в концентрації були достовірні ($p < 0,05$). Крім того, за результатами наших досліджень вміст омега-3 жирних кислот у ліпідах СК жирової та нервової тканини був достовірно вищим, а співвідношення омега-3 і омега-6 – достовірно нижчим порівняно з МСК культури кісткового мозку ($p < 0,05$). Ми пов'язуємо це з особливостями отримання МСК культури жирової і нервової тканин. Як зазначалось у розділі «Матеріали і методи», клітини цих тканин культивували модифікованим методом експланту. Це дозволяло уникнути ушкоджуючого механічного та хімічного впливу на клітини, зберегти тканинні цитокіни і фактори росту та забезпечити їх надходження з фрагментів тканини у середовище. Такий метод культивування призводить і до підвищення концентрації омега-3 жирних кислот у поживному середовищі, оскільки саме в клітинах нервової і жирової тканини в нормі концентрується переважна кількість омега-3 кислот в організмі.

Ці результати не виключають також і можливості синтезу *de novo* докозапентаєнової (C22:5n3) і докозагексаєнової (C22:6n3) кислот мезенхімними стовбуровими клітинами культури жирової та нервової тканини. Так, в дослідженні Tigistu-Sahle et al. було показано, що МСК культури кісткового мозку людини за культивування у звичайному поживному середовищі практично не синтезують омега-3 жирні кислоти, але в умовах високої концентрації альфа-ліноленової кислоти такий синтез активується [332].

Таким чином, проведене дослідження складу жирних кислот ліпідів дало можливість виявити певні особливості ліпідного обміну МСК, а саме: високий вміст олеїнової кислоти, характерний для клітин, резистентних до апоптозу та з високим проліферативним потенціалом; високе співвідношення ненасиченої лінолевої до насиченої стеаринової кислоти (C18:1/C18.0), яке відображає високу активність фермента SCD та опосередковано – активний стан Wnt/ β -катенін сигнального шляху; нездатність до подовження ланцюга насичених жирних кислот; відсутність або низьку активність синтезу *de novo* омега-6 поліненасичених жирних кислот.

Наступний підрозділ «Власних досліджень» присвячений визначенню впливу алогенних мезенхімних клітин кісткового мозку та жирової тканини на розвиток спонтанних пухлин, функціональний стан моноцитів/макрофагів і імунних органів мишей лінії C57BL/6. Дослідженнями, проведеними на кафедрі фізіології, патофізіології та імунології тварин було визначено окремі показники реакції імунної системи тварин-реципієнтів за впливу стовбурових клітин [24, 39, 46, 47, 49]. Даний фрагмент дослідження спрямований на поглиблення отриманих даних та визначення достовірного впливу стану імунної системи на пухлинний процес в подальших експериментах. З цією метою здоровим 2-3-х місячним мишам лінії C57BL/6 масою 20-24 г трасплантували 10^4 МСК культури кісткового мозку або жирової тканини 4-го пасажу. Порівняння проводили з групами тварин, яким вводили 0,89 % NaCl

або не проводили жодних маніпуляцій.

Лінія мишей C57BL/6 вперше була виведена у 1921 р. славетним генетиком К. К. Літтлом при схрещуванні самиці за номером 57 і самця за номером 52, отриманих у приватному розпліднику відомої жінки-селекціонера Ебі Лантроп. Букви «BL» у назві штаму відображають чорний колір тварин. Буква «C» є скороченням слова «case», випадок. Номер 6 зазначає номер одної з багатьох ліній нащадків мишей, яка була використана для подальшого формування інбредної лінії. Миші лінії C57BL/6 відносяться до таких, що найбільш часто використовуються у наукових дослідженнях. Це перша лінія мишей, геном яких був повністю секвенований у 2002 р. [242].

Миші лінії C57BL/6 в цілому мають високий показник загального здоров'я, добре відчують себе в умовах утримання у віварії, не чутливі до більшості інфекційних захворювань. Однак, вони мають знижену щільність кісткової тканини, чутливі до розвитку ожиріння, індукованого жирною їжею, цукрового діабету II типу, атеросклерозу, втрати шерсті з віком. Макрофаги цих мишей резистентні до дії токсину сибірської виразки.

Відомо, що лінія мишей C57BL/6 відноситься до низькораккових. За даними міжнародної бази даних геному мишей первинні пухлини легень розвиваються у середньому у 1 % самців та 3 % самиць; аденокарцинома молочної залози – менш, ніж в 1 % у самиць; частота пухлин гемопоетичної системи становить 2 – 7 %.

У дослідженні Schile et al. частота розвитку спонтанних пухлин у мишей C57BL/6 становила менш, ніж 0,1 % [420]. Середній вік тварин на момент розвитку пухлин становив 239 діб для самиць та 427 діб для самців. Більшість пухлин була зафіксована у віці 6–18 міс., що відповідає 30–56 рокам віку людини. Із виявлених авторами 51 пухлини найчастіше зустрічались саркоми – 20 випадків: 6 випадків гемангіосаркоми, 6 випадків мультицентричної гістіоцитарної саркоми, 4 випадки рабдоміосаркоми, по одному випадку остео- і хондросаркоми, два випадки не були класифіковані.

На другому місті за частотою були злоякісні гематологічні захворювання – 7 випадків мультицентричної лімфоми, по одному випадку множинної мієломи і локальної лімфоми уретри. Рідше зустрічались рак молочної залози – 3 випадки, меланома шкіри – 2 випадки, плоскоклітинний рак шкіри – 2 випадки.

За нашими даними не зафіксовано появи пухлинного росту в групах дослідних мишей протягом трьох місяців спостереження як за введення МСК, так і в групах контролю. Це підтверджує дані інших авторів щодо вкрай низької достовірності трансформації МСК ранніх пасажів у злоякісні клітини при введенні в організм реципієнтів [458], яка, однак, зростає при використанні старіючих МСК [400].

У літературі також є поодинокі роботи, в яких стверджується можливість трансформації власних МСК культури кісткового мозку у пухлинні клітини за певних умов: наявності активного запального процесу, впливу канцерогенів, коканцерогенів [195, 417]. Тому, незважаючи на отримані позитивні результати, ми вважаємо доцільним проводити ретельне обстеження потенційних реципієнтів МСК на онкологічні захворювання з метою зменшення ризику розвитку онкологічного процесу.

Крім ризику розвитку пухлин, в інтактних мишей за системного введення МСК оцінювали ваговий індекс і клітинність лімфоїдних органів (селезінки та тимусу), а також метаболічну активність перитонеальних макрофагів за спонтанним та стимульованим НСТ-тестом. Встановлено, що введення МСК на 7-му та 18-ту добу спостереження призводить до підвищення індекса маси тимусу і селезінки, а також збільшення їх клітинності за рахунок лімфоїдних клітин.

На 25-ту добу спостереження показники індексу маси і клітинності тимусу поступово зменшуються, але залишаються вищими за показники в контрольних групах тварин, а показники селезінки стають навіть меншими за контрольні. Це засвідчує поступове зниження процесів диференціювання,

міграції та проліферації клітин.

Встановлено, що МСК культури жирової тканини і кісткового мозку мають однаковий за спрямованістю вплив на імунну систему реципієнтів, однак дещо розрізняються за інтенсивністю впливу на окремі ланки імунної системи: МКС культури кісткового мозку більш активні по відношенню до тимусу (Т-клітинний імунітет), МСК культури жирової тканини мали більш виразний вплив на селезінку як центральний орган В-ланки імунітету.

Відомо, що антигенний стимул індукує зміни імунної системи організму. Однак, у даному випадку МСК мали однаковий спектр антигенних детермінант з клітинами тварин-реципієнтів, оскільки всі тварини, і донори, і реципієнти МСК, належали до однієї лінії C57BL/6. Тому відповідь адаптивного імунітету за цих умов не розвивається. Навіть якщо б тварини відносились до різних штамів і були антигенно неідентичними, відсутність експресії антигенів гістосумісності II класу і коstimуляторних молекул CD80 і CD86 на мембранах МСК унеможлиблює розвиток повноцінної імунної відповіді [233].

Однак, незважаючи на це, ми, як і багато інших дослідників, реєструємо вплив МСК на органи імунної системи. Перший етап стимулюючої дії МСК, за нашим припущенням, пов'язаний з їх здатністю стимулювати ангиогенез та сприяти хомінгу лімфоцитів в органи лімфопоезу. Внаслідок міграції МСК в тимус та селезінку (перший період після трансплантації) збільшуються загальна вага і клітинність органів. В подальшому відбувається прояв імуносупресивних властивостей МСК.

Мезенхімні клітини експресують на поверхні чисельні молекули адгезії, завдяки яким можуть спрямовувати свій рух в різні органи та тканини [123, 137, 146, 362]. Ключовою є взаємодія антигена CD44 з гіалуроновою кислотою. Встановлено, що вже через годину після внутрішньовенного введення МСК можна виявити в селезінці та інших лімфоїдних органах тварин-реципієнтів. Осідаючи в тканині лімфоїдних органів, МСК виконують

роль мікрооточення для лімфоцитів. Так, відомо, що в тимусі розвиток Т-лімфоцитів відбувається за тісної взаємодії з епітеліальними клітинами і стромальними елементами [329, 355].

Встановлено, що мезенхімні стовбурові клітини культури кісткового мозку здатні через прямий контакт викликати активацію тимоцитів [358]. Аналогічні процеси відбуваються і в тканині селезінки – стромальні клітини спрямовують хомінг та подальший розвиток лімфоїдної популяції [201]. Крім того, перший етап стимулюючої дії МСК, за нашим припущенням, може бути пов'язаний з їх здатністю стимулювати ангіогенез, а саме ендотелій венул тимусу і селезінки, що також сприяє міграції лімфоїдних клітин в органи лімфопоезу. Саме тому на перших етапах після трансплантації в нашому дослідженні відбувається збільшення відносної маси тимусу і селезінки, підвищується їх клітинність.

В подальшому, як ми вважаємо, МСК починають проявляти імуносупресивні властивості, тому показники індексу маси і клітинності повертаються до норми, а в деяких випадках становляться більш низькими за показники контрольних тварин. Чинниками дії МСК, які виступають як стромальні клітини тимусу і селезінки, є експресія антигенів, що пригнічують внутрішньоклітинну передачу сигналів в лімфоцитах при безпосередньому контакті, та секреція цитокінів інгібуючого типу. Одним з чинників імуносупресивної дії МСК, який ми дослідили в нашій роботі, може бути секреція інтерлейкіну 6. На перших пасажах МСК його концентрація незначна, а клітини містять відносно значну кількість жирних кислот омега-3 групи, які мають активуючий вплив на лімфоцити [231, 441]. На пізніх етапах розвитку імунної відповіді (що відповідає 25-тій добі експерименту) секреція ІЛ-6 клітинами МСК зростає і вони здійснюють пригнічуючий вплив на функції лімфоцитів. Баланс активуючих та імуносупресорних факторів пояснює динаміку змін імунних органів тварин-реципієнтів МСК, а також деякі розбіжності впливу МСК різного походження – з кісткового мозку та

жирової тканини.

Макрофаги – центральні клітини вродженої ланки імунітету. Вони відіграють важливу роль у відповіді на бактеріальні антигени, при загоєнні ран, задіяні в патогенезі пухлинних і аутоімунних захворювань [232, 347, 353]. Є дані, що свідчать на користь активації макрофагів під впливом МСК. Так, Stojanović, Najman виявили активацію макрофагів за дії культурального середовища МСК культури жирової тканини та стовбурових клітин ліпоми [421]. Goncalves et al. показали, що речовини, які містяться у екзосомах МСК, здатні активувати макрофаги з протизапальними властивостями [293]. Секретуючи велику кількість лактату, МСК індукують активацію і наступне диференціювання клітин моноцитарного ряду в М2 моноцити/макрофаги, які мають антизапальну дію та водночас сприяють проліферації пухлинних клітин [219]. Встановлено, що для поляризації клітин в М2 моноцити/макрофаги необхідним етапом є активація ферменту НАДФ-Н2-оксидази, яка призводить не тільки до появи реактивних молекул оксигену, але і до підвищення рівня транскрипції, асоційованої з кіназами ERK і JNK [348]. У нашій роботі ми за даними НСТ-тесту виявили значне підвищення активності НАДФ-Н2-оксидази в перитонеальних макрофагах мишей, яким системно вводили МСК. Це може бути передумовою для утворення М2 макрофагів за дії МСК [276].

За визначення активності СДГ ми показали достовірне підвищення активності сукцинатдегідрогенази в мітохондріях гепатоцитів тварин за впливу МСК культури жирової тканини та кісткового мозку порівняно з групою інтактних тварин. Показник активності СДГ мітохондрій печінки тварин-реципієнтів за впливу МСК культури жирової тканини був достовірно вищий від такого за впливу МСК культури кісткового мозку ($p < 0,05$). На нашу думку, такі результати можуть пояснюватись неоднаковим вмістом жирних кислот у ліпідах МСК культури жирової тканини та культури кісткового мозку. За даними Wei et al., $\omega 3$ жирні кислоти гальмують

проліферацію клітин, затримуючи їх у G_1 фазі клітинного циклу [320]. СДГ - один з основних маркерних ферментів мітохондрій, що задіяні в окисному фосфорилуванні.

Мітохондрії являються цитоплазматичними органелами клітин і функціонують у якості енергетичних станцій для виробництва аденозинтрифосфату (АТФ). Однак, вони додатково беруть участь в різних внутрішньоклітинних процесах, таких як індукція апоптозу, регуляція клітинного циклу, проліферативна активність, диференціювання, перепрограмування, старіння [204]. Зміна морфології мітохондрій тісно пов'язана з їх функціональністю. Мітохондріальна дисфункція асоційована з старінням організму, втратою синаптичних нервових клітин і загибеллю клітин за багатьох неврологічних захворювань [271].

Нині є багато повідомлень, що передача мітохондрій від здорових до пошкоджених клітин є важливим механізмом ендогенної регенерації [338]. Наприклад, показано, що астроцити передають мітохондрії до нейронів після ішемічного інсульту в мишей [99, 337, 454]. У останні роки накопичуються дані відносно трансферу мітохондрій з МСК до інших клітин. МСК також здатні до трансферу мітохондрій, наприклад, до кардіоміоцитів у моделі антрациклінової кардіоміопатії, до альвеолярних клітин при гострому ураженні легенів та дихальних шляхів у мишей, до кортикальних нейронів у моделі церебрального інсульту та макрофагів, отриманих з моноцитів людини, а також мишачих альвеолярних макрофагів у моделях гострого респіраторного дистрес-синдрому [254, 309, 318, 352].

За експериментально змодульованої черепно-мозкової травми в дослідних тварин було визначено, що внутрішньовенна трансплантація МСК викликала позитивні зміни у нервовій тканині: зменшення кількості макрофагів і периферичних інфільтраційних лейкоцитів у мікроглії на місці пошкодження, зниження рівня прозапальних цитокінів і посиленням протизапальних цитокінів, можливо, опосередкованих посиленою експресією

TSG-6, що може пригнічувати активацію NF-κB сигнального шляху [444, 479, 486]. Продемонстровано також, що введення МСК сприяє зменшенню пошкоджень головного мозку, що спричинене опроміненням черепа. В значній мірі ці ефекти пов'язують із здатністю МСК до трансферу мітохондрій.

У третьому підрозділі «Власних досліджень» викладено результати визначення впливу МСК на пухлинний процес тварин-реципієнтів. У якості експериментальної моделі обрана епідерміоїдна карцинома легені Льюїс. Пухлина виникла спонтанно як карцинома легені мишей лінії C57BL/6 у 1951 році [287]. Перевивається на 12–14 добу росту, середня тривалість розвитку в тварин-пухлиноносіїв становить 24 доби [4]. За морфологічними показниками відноситься до низько диференційованих анапластичних карцином. Субстрат первинних пухлинних вогнищ представлений поліморфними клітинами з переважанням клітин з крупними ядрами та ядерцями. Зустрічаються також гігантські багатоядерні клітини, чисельні фігури мітозів. У стромі пухлини виявляються некротичні вогнища з перифокальними запальними інфільтратами.

Оскільки за чутливістю до дії хіміотерапевтичних препаратів карцинома легені Льюїс співпадає з більшістю пухлин людини, ця модельна система широко використовується в експериментальній онкології для пошуку і тестування нових протипухлинних препаратів. Однак, у доступній літературі ми виявили лише одне посилання на використання моделі карциноми легені Льюїс з метою оцінки впливу МСК на процеси канцерогенезу *in vivo*. Gazdic et al. вводили мишам лінії C57BL/6 внутрішньовенно суспензію клітин карциноми легені Льюїс і через тиждень також внутрішньовенно вводили МСК кісткового мозку [315]. Оцінювали вплив МСК на процеси метастазування: швидкість, інтенсивність, інфільтрацію клітинами імунної системи.

У нашій модельній системі пухлинні клітини LLC вводили

внутрішньом'язово у ділянку стегна і оцінювали не тільки швидкість і об'єм спонтанного метастазування у легені із вогнища первинної пухлини, але і ріст самої пухлини, а також морфологічні та генетичні характеристики пухлинних клітин. Тобто, акцент був зроблений на визначення впливу МСК саме на пухлинні клітини, а не на опосередкований вплив на канцерогенез через дію на клітини імунної системи.

Стосовно первинної пухлини отримані наступні результати, які свідчать про збільшення маси пухлини, підвищення ступеня анаплазії клітин, підвищення рівня анеуплоїдії і здатності до метастазування, зниження чутливості до індукції апоптозу, більш виразну васкуляризацію пухлини за дії МСК.

Одним з достовірних пояснень підвищення ступеня анаплазії пухлин може бути активація стовбурових клітин пухлини. Відомо, що однією з домінуючих концепцій в онкології є теорія стовбурових клітин пухлини (СКП). СКП мають властивості самопідтримання, диференціації у більш зрілі клітини, що зумовлює гетерогенність пухлини, здатність до метастазування і розвитку хіміорезистентних рецидивів [111, 190, 469].

Встановлено, що МСК активно взаємодіють з СКП за допомогою різноманітних механізмів. Одним з них був ретельно досліджений Liu et al. [111]. Автори встановили, що СКП здатні до секреції ІЛ-6, який діє як аутокринний фактор росту багатьох пухлин, а також активує МСК. Під впливом ІЛ-6 посилюється секреція мезенхімними клітинами хемокіна CXCL7. Рецептори до цього хемокіна є на багатьох клітинах, включаючи і СКП (а саме, рецептор CXCR2). Зв'язування CXCL7 з CXCR2 на поверхні пухлинних стовбурових клітин викликає підвищення синтезу ІЛ-6 та активацію синтезу ІЛ-8. Останній взаємодіє з іншим рецептором на поверхні СКП (CXCR1) та активує процеси самопідтримання, що призводить до появи більш злоякісного фенотипу пухлинних клітин.

Інший механізм активації СКП опосередкований простагландином E₂, який секретують МСК. Ця біологічно активна речовина сприяє появі осередків мікрооточенням (так званих ніш), необхідних для розвитку СКП [76]. Крім того, описано злиття МСК та пухлинних клітин з появою гібридних клітин, які здатні до епітеліо-мезенхімного переходу, дедиференціювання і перетворення до стовбурових пухлинних клітин з високою потенцією до проліферації і метастазування [205].

У групі тварин-пухлиноносіїв, яким вводили МСК, ми виявили достовірне перевищення показника маси первинної пухлини порівняно з контролем на 39 % ($p < 0,05$). Це може бути пов'язано як з підвищенням інтенсивності проліферації пухлинних клітин, так і резистентності до індукції апоптозу. Обидва процеси можуть відбуватись одночасно.

При дослідженні клітинного циклу методом протокової цитофлуориметрії, за впливу МСК, ми встановили збільшення кількості анеуплоїдних клітин проліферативного пулу на 20 % ($p < 0,01$) порівняно з контролем [11]. Водночас, встановлено зміну чутливості клітин первинної пухлини до апоптозу за впливу МСК: відсоток апоптотичних клітин знизився в 1,4 рази і становив $41,82 \pm 1,37$ % ($p < 0,001$) проти $56,59 \pm 0,92$ % у тварин контрольної групи. Тому ми вважаємо, що резистентність пухлинних клітин до розвитку апоптозу є основною причиною збільшення маси пухлини за дії МСК.

Подібні результати були отримані в експерименті *in vitro* Bergfeld et al. [98]. Вони поводити культивування двох пухлинних ліній (карциноми легені Льюїс і аденокарциноми молочної залози мишей 4T1) у присутності середовища від МСК-КМ мишей. У обох випадках не виявлено збільшення проліферативного пулу пухлинних клітин, але чутливість до індукції апоптозу значно знижувалась. Це призводило до значного збільшення кількості життєздатних клітин у культурах (у два рази у випадку карциноми Льюїс і в 1,5 рази у випадку клітинної лінії 4T1). Крім цього висновку,

важливим є той факт, що дія МСК була опосередкована розчинними факторами.

На нашу думку причиною зниження чутливості клітин пухлини карциноми легені Льюїс до розвитку апоптозу може бути секреція мезенхімними стовбуровими клітинами ІЛ-6, яку ми визначили при характеристиці зразків МСК до трансплантації. Уміст ІЛ-6 у середовищі культивування МСК 4-го пасажу становив $87,13 \pm 4,08$ нг/мл, а 12-го пасажу – $158,73 \pm 2,53$ нг/мл ($p < 0,001$). Lu et al. показали, що здатність МСК-ЖК підвищувати життєздатність клітин карциноми легені Льюїс при спільному культивування залежить від секреції мезенхімними клітинами ІЛ-6, який викликає активацію JAK2/STAT3 сигнального шляху [76]. Цей шлях внутрішньоклітинної передачі сигналу ретельно розглянуто у багатьох роботах [223, 255, 425, 444]. ІЛ-6, після зв'язування з рецептором, активує цитоплазматичну кіназу JAK2, яка фосфорилує фактор транскрипції STAT3. Фосфорильований STAT3 утворює гомодимери, переміщується до ядра, де активує транскрипцію антиапоптотичних молекул родини Bcl-2 (Bcl-2, Bcl-x-l) та пригнічує транскрипцію проапоптотичних молекул зазначеної родини (Bcl-x-s, Bax, Bag) [295]. Зсув співвідношення про- і антиапоптотичних молекул у бік останніх призводить до стабілізації наружної мембрани мітохондрій та підвищує резистентність клітин до апоптозу. Іншим геном-мішенню дії STAT3 є ген цикліну D1 [207]. Тому крім впливу на процеси апоптозу, ІЛ-6 підвищує і проліферативну активність різних типів клітин. Як ми бачимо, у випадку карциноми легені Льюїс за дії МСК, здійснюється вплив ІЛ-6 на резистентність пухлинних клітин до апоптозу та їх проліферацію.

ІЛ-6 задіяний також в інший, нещодавно відкритий сигнальний шлях, який асоційований з набуттям пухлинними клітинами більш злоякісних властивостей. Це STAT3-NRF2 сигнальний шлях [193, 229, 265]. В умовах гіпоксії (а ознаки гіпоксії були виявлені нами при гістологічному дослідженні

первинних пухлин карциноми Льюїс) фактор транскрипції STAT3 зв'язується з промотором гена *Nrf2* (nuclear factor erythroid 2 - related factor 2; фактор 2, асоційований з еритроїдним ядерним фактором 2) та підвищує його транскрипцію. Білок NRF2 є також фактором транскрипції, мішенню якого є велика кількість генів. Перш за все, вони опосередковують відповідь клітини на оксидативний стрес та беруть участь у захисті органел та ДНК від реактивних форм кисню і нітрогену. У зв'язку з цим, тривалий час NRF2 розглядали як ген канцеропротектор та спрямовували зусилля на підвищення його активності. Однак, в подальшому було встановлено, що тривала активація гена NRF2 призводить до перепрограмування метаболізму клітини на «пухлинно-асоційований» (з високим внеском гліколізу та використання жирних кислот в якості метаболітів циклу Кребса), підвищує експресію генів, асоційованих з проліферацією та резистентністю до індукції апоптозу (зокрема, Bcl-2), сприяє самопідтриманню клітин та пригнічує їх диференціювання, збільшує швидкість епітеліо-мезенхімного переходу та метастазування.

У англомовній літературі для визначення подібних змін широко застосовують термін «stemness», який умовно можна перевести як збільшення у пухлинній клітині кількості рис, характерних для стовбурових безсмертних клітин [260, 325, 459, 478]. Ми спостерігали прояви «stemness» при оцінці морфологічних і функціональних змін пухлинних клітин карциноми легені Льюїс за впливу МСК. Новоутворена пухлина при застосуванні МСК була побудована з виразно атипичних клітин з інтенсивно базофільною цитоплазмою і не мала будь-якої виразної строми, що є свідченням високого ступеня її анаплазії, і, відповідно, злоякісності, тоді як спонтанна карцинома легені Льюїс складалась з поліморфних клітин, ознаки атипії яких були менш виразними.

Виявлено також ознаки підвищення здатності до метастазування: присутність метастатичних клітин у оточуючих пухлину тканинах, ознаки гематогенного метастазування, підвищення кількості виявлених метастазів у

легенях тварин-пухлиноносіїв. На користь більш злоякісного фенотипу свідчить підвищення рівня анеуплоїдії пухлинних клітин за дії МСК.

Ще одна важлива характеристика впливу МСК на канцерогенез, виявлена нами, – більша інфільтрація тканини первинної пухлини судинами. При введенні тваринам МСК на 18-ту добу досліджень у первинній пухлині щільність судин на одиницю площі у 1,3 рази ($p < 0,05$) була більшою, ніж у контрольних групах тварин. Крім того, у тварин дослідної групи виявлено збільшення показнику загального об'єму метастазів у легені і кількості метастазів більш, ніж 1 мм у діаметрі. Сумарна кількість метастазів розміром 1,0 - 3,0 мм у тварин за впливу МСК становила 52,5 %, тоді як у тварин-пухлиноносіїв контрольних груп цей показник був нижчим і становив дорівнював 31,4 % ($p < 0,01$) у I-й групі і 28,6 % ($p < 0,001$) у III-й групі. Ці дані свідчать на користь більш швидкого переходу пухлинного процесу у васкулярну стадію, активації неоангіогенезу за дії МСК. Розвиток метастазів є однією з найбільш важливих ознак злоякісного пухлинного росту [79].

Причини виявленого феномену можуть бути різними. Насамперед, це синтез і секреція МСК проангіогенних факторів. Як вказано вище, виявлена нами висока концентрація олеїнової кислоти в МСК може обумовлювати здатність клітин до синтезу факторів росту судин при подальшому диференціюванні. Така ж властивість притаманна і омега-3 жирним кислотам, які стимулюють продукцію проангіогенних факторів мезенхімними стовбуровими клітинами [284]. Підвищений вміст омега-3 жирних кислот був виявлений нами в МСК культури нервової та жирової тканини.

Як зазначається в огляді Yeo et al., МСК здатні до секреції більш ніж 50 різних речовин, які стимулюють ріст судин, серед яких - фактор росту ендотелію судин, ангіопоетини 1 і 2, фактори росту фібробластів 2 і 7, ангіотенін, ангіостатин, ендостатин, артемін та інші [300].

Нині значна увага приділяється здатності МСК секретувати екзосоми. Це фрагменти цитоплазми клітин, вкриті типовою двошаровою мембраною,

діаметром 30-100 нм. Уперше були ідентифіковані на початку 1980-х років [97]. Станом на 2012 рік у складі екзосом виявлено 4563 білка, 194 ліпіди, 764 видів мікроРНК, 1639 мРНК [175, 285].

Екзосоми присутні у більшості рідин організму (крові, амніотичній рідині, цереброспінальній рідині, молоці, слині, лімфі, жовчі), тобто, продукуються різними типами клітин [149, 150]. Однак МСК – єдиний тип клітин, для якого характерна масова продукція екзосом [300]. Завдяки секреції екзосом, МСК впливають на різні типи клітин. У складі екзосом, похідних МСК, виявлені і речовини, які стимулюють ангіогенез. Наприклад, Gonzalez-King et al. виявили у екзосомах від МСК відомий ліганд Jagged-1, який активує в ендотеліоцитів NOTCH1 – опосередкований сигнальний шлях та активує їх проліферацію [228]. Gong et al. встановили присутність в екзосомах МСК різних типів мікроРНК, які активували транскрипцію про-ангіогенних факторів при додаванні в культуральне середовище до ендотеліоцитів пупкового канатика [317].

Підсумовуючи, в процесі виконання дисертаційної роботи нами було розроблено та адаптовано технології отримання стабільних культур МСК різного походження (миші, kota, собаки, коня). Подальші експерименти доказали високу життєздатність, функціональну активність отриманих СК (здатність до колонієутворення, експресія антигенів поверхневих мембран і цитоплазми, а також спектр жирних кислот, характерних для популяції СК). Доведено безпечність уведення культур МСК здоровим тваринам – реципієнтам.

Водночас, за наявності в організмі тварин пухлинного процесу, ми виявили активуючий вплив МСК на розвиток перевивної карциноми легені Льюїс та швидкість її метастазування, який реалізується за декількома механізмами: резистентності до апоптозу, збільшення швидкості проліферації, ступеня анаплазії пухлинних клітин (підвищення стовбурових властивостей, рівня анеуплоїдії), стимуляція процесів ангіогенезу. І тому

можна стверджувати, що МСК впливають на більшу частину відомих механізмів стимуляції пухлинного росту.

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 $2304,40 \pm 280,12 \mu m^2$ ($p < 0,001$), 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 $0,0608\pm0,0066$ ($p<0,001$) через збільшення площі цитоплазми клітини; збільшується вміст апоптичних клітин, що проявляли чутливість до безсироваткового культивування, на 7 та 12 пасажах культивування та становить $20,67\pm1,55$ ($p<0,01$) та $22,67\pm1,55$ % ($p<0,01$) 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 $161,11\pm5,65$, площею клітини $759,56\pm28,42\ \mu\text{m}^2$, що на пізніх пасажах змінюється на зірчасту з утворенням значної кількості виростів цитоплазми (подіїв), зменшенням площі ядра на 12 пасажі до $135,78\pm11,21$ ($p<0,001$) та збільшенням площі клітин на 12 пасажі до $1416,90\pm151,97\ \mu\text{m}^2$ ($p<0,001$) за рахунок цитоплазми; біля ядра візуалізується комплекс Гольджі, що засвідчує активний стан проліферуючих клітин; знижується життєздатність клітин на 12 пасажі – до $84,67\pm1,36$ % ($p<0,01$) та їх стійкість до апоптозу, індукованого культивуванням у середовищі без додавання сироватки; з 7 пасажу достовірно зменшується показник ядерно-цитоплазматичного співвідношення і становить $0,2189\pm0,0122$ ($p<0,01$), а на 12 пасажі – $0,1111\pm0,0086$ ($p<0,001$) через достовірне збільшення площі цитоплазми клітини; збільшення вмісту апоптичних клітин, що проявляють чутливість до безсироваткового культивування, на 7 та 12 пасажах культивування та становить $21,33\pm1,36$ ($p<0,05$) та $23,67\pm0,97$ % ($p<0,05$) відповідно.

7. Зміни, що відбуваються у клітинному циклі культури жирової тканини характеризуються великою кількістю диплоїдних клітин – $98,45\pm0,39$ %, з яких клітин проліферативного пулу $G_2/M+S$ – $29,51\pm3,56$ %, 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. Стівбурові 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 $K_3[Fe(CN)_6]/mg \cdot xh$, 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-Н₂-оксидази моноцитів, макрофагів.

14. За впливу стовбурових 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 стовбурових 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 злоякісний фенотип клітин первинної пухлини.

16. Застосування алогенних мезенхімних стовбурових 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 дотримані, 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 ангіогенезу.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Автандилов Г. Г. Медицинская морфометрия. М.: Медицина, 1990. 248 с.
2. Активність сукцинатдегідрогенази мітохондрій печінки тварин-реципієнтів за впливу алогенних мезенхімальних стовбурових клітин / Л. В. Кладницька, А. Й. Мазуркевич, В. А. Томчук і співавт. Ветеринарний часопис. Серія "Ветеринарна медицина". 2019. Вип. 7 (38). С. 48–53.
3. Анохина Е. Б., Буравкова Л. Б. Гетерогенность стромальных клеток-предшественников, выделенных из костного мозга крыс. Цитология. 2007. т. 49, № 1. С. 40-47.
4. Атгаси Г., Бажанов В. С., Баркер А. Экспериментальная оценка противоопухолевых препаратов в СССР и США / Под ред. З. П. Софьиной (СССР), А. Голдина (США). – М.: Медицина, 1980. – 295 с.
5. Беликов В. Г. Коррекция тимогеном нарушений физиологических механизмов регуляции иммуногенеза при остром отравлении токсичными химическими веществами. Дисс. канд. мед. наук. Саратов, СГМУ, 2001. 149 с.
6. Біологічні властивості клітин первинної пухлини мишей C57Bl/6 з перещепленою карциномою легень Льюїс за впливу алогенних мезенхімальних стовбурових клітин / Л. В. Кладницька, А. Й. Мазуркевич, Л. В. Гарманчук і співавт. Біологія тварин. 2015. Т. 17, N 2. С. 82–88.
7. Вживаність 3D-культури клітин MCF-7 у безсироватковому середовищі / Х. Д. Непийвода, Л. В. Гарманчук, О. М. Перепелиціна та співавт. Доп. НАН України. 2011. N 8. С. 160–164.
8. Використання мезенхімальних стовбурових клітин для корекції репаративних процесів в організмі тварин-реципієнтів / А. Й. Мазуркевич, М. О. Малюк, В. В. Ковпак та співавт. Методичні рекомендації. Київ: видавничий центр НУБіП України, 2012. 41 с.

9. Вміст жирних кислот в ліпідах фетальних стовбурових клітин kota / Л. В. Кладницька, А. Й. Мазуркевич, В. В. Данчук і співавт. Науковий вісник Львівського національного університету ветеринарної медицини імені С. З. Гжицького. 2016. Т. 18. N 3 (70). С. 136–140.

10. Вплив алогенних мезенхімальних стовбурових клітин з кісткового мозку на функціональний стан тимусу / Л. В. Кладницька, А. Й. Мазуркевич, С. В. Величко і співавт. Матеріали міжнародної науково-практичної конференції «Актуальні проблеми фізіології тварин» 3-5 травня 2018, м. Чернігів. Чернігів, 2018. С. 51.

11. Вплив алогенних мезенхімальних стовбурових клітин кісткового мозку на пухлинний ріст і процеси метастазування у мишей з трансплантованою карциномою легені Льюїс / Л. В. Кладницька, А. Й. Мазуркевич, М. О. Малюк і співавт. Онкологія. 2019. т. 21, N 1. С. 66–67.

12. Вплив алогенних мезенхімальних стовбурових клітин кісткового мозку на клітинний цикл первинної пухлини мишей C57Bl/63 трансплантованою карциномою легені Льюїс / Л. В. Кладницька, А. Й. Мазуркевич, М. О. Малюк і співавт. Онкологія. 2019. т. 21, N 1. С. 65–66.

13. Вплив алогенних мезенхімальних стовбурових клітин на експериментальний пухлинний ріст і процеси метастазування у мишей C57Bl/6 з трансплантованою метастатичною карциномою легень Льюїс / Л. В. Кладницька, А. Й. Мазуркевич, Л. В. Гарманчук і співавт. Науковий вісник Львівського національного університету ветеринарної медицини та біотехнологій ім. С. З. Гжицького. Серія «Ветеринарні науки». 2014. Т. 16, N 3 (60). Ч. 1. С. 138–145.

14. Вплив алогенних мезенхімальних стовбурових клітин на морфологічні показники первинної пухлини мишей C57Bl/6 з трансплантованою метастатичною карциномою легень Льюїс /

Л. В. Кладницька, А. Й. Мазуркевич, Л. В. Гарманчук і співавт. Вісник Білоцерківського національного аграрного університету. Серія «Ветеринарна медицина». 2016. N 7 (38). С. 48–53.

15. Вплив алогенних мезенхімальних стовбурових клітин на оксигензалежний метаболізм перитонеальних макрофагів мишей C57BL/6 / Л. В. Кладницька, А. Й. Мазуркевич, С. В. Величко і співавт. Науковий вісник Львівського національного університету ветеринарної медицини та біотехнологій імені С. З. Гжицького. 2015. т. 17, N 3 (63). С. 49–57.

16. Вплив алогенних мезенхімальних стовбурових клітин на процес метастазування у мишей з трансплантованою карциномою легень Льюїс / Л. В. Кладницька, А. Й. Мазуркевич, С. В. Величко і співавт. Український часопис ветеринарних наук. 2015. N 227. С. 124–131.

17. Вплив алогенних мезенхімальних стовбурових клітин на рівень генетичної стабільності клітин первинної пухлини мишей C57Bl/6 з перещепленою карциномою легень Льюїс / Л. В. Кладницька, А. Й. Мазуркевич, Л. В. Гарманчук і співавт. Фізіологічний журнал. 2015. т. 61, N 3. С.134.

18. Вплив хімічного складу поживних середовищ на адгезію, формування колоній та проліферацію мезенхімальних стовбурових клітин з жирової тканини / Л. В. Кладницька, А. Й. Мазуркевич, В. В. Кротенко, В. С. Величко. Матеріали Міжнародної науково-практичної конференції «Цілі сталого розвитку третього тисячоліття: виклики для університетів наук про життя», присвяченій 120-річчю Національного університету біоресурсів і природокористування України, 23–25 травня 2018 року, Київ, Україна. Київ, 2018. С. 165.

19. Германчук В. Г. Нарушения регуляции физиологических механизмов иммуногенеза при остром отравлении нитритами. Дисс. канд. мед. наук. Саратов, СВРХБЗ, 2000. 121 с.

20. Горальський Л. П., Хомич В. Т., Кононський О. І. Основи гістологічної техніки і морфофункціональні методи досліджень у нормі та при патології. Навчальний посібник. Житомир: Полісся, 2005. 288 с.

21. Експресія цитоплазматичних білків стовбуровими клітинами із жирової тканини собаки на різних пасажах культивування *in vitro* / Л. В. Кладницька, А. Й. Мазуркевич, Н. О. Безденежних і співавт. Науково-технічний бюлетень державного науково-дослідного контрольного інституту ветеринарних препаратів та кормових добавок Інституту біології тварин. 2017. N 18 (1). С. 48–55.

22. Експресія ядерних білків стовбуровими клітинами з жирової тканини собаки на різних пасажах культивування *in vitro* / Л. В. Кладницька, А. Й. Мазуркевич, Н. О. Безденежних і співавт. Вісник Сумського національного аграрного університету. Серія «Ветеринарна медицина». 2017. N 1 (40). С. 3–7.

23. Ещенко Н. Д., Вольский Г. Г. Определение количества янтарной кислоты и активности сукцинатдегидрогеназы. В кн.: Методы биохимических исследований (липидный и энергетический обмен). – Л: Изд-во Ленингр. ун та, 1982. С. 207–212.

24. Жирнокислотний склад ліпідів мезенхімальних стовбурових клітин кісткового мозку кота / Л. В. Кладницька, А. Й. Мазуркевич, В. В. Данчук і співавт. Наукові доповіді НУБіП України. 2016. N 61.

25. Журба В. І. Науково-експериментальне обґрунтування ефективності застосування стовбурових клітин для відновлення патологічно зміненого суглобового хряща у тварин: Дис. ... канд. вет. наук: 16.00.02 / Нац. ун-т біоресурсів і природокористування України. Київ, 2013. 130 с.

26. Забродский П. Ф., Мандыч В. Г. Иммунотоксикология ксенобиотиков: монография. М: СВИБХБ, 2007. 420 с.

27. Иммунофенотипическая характеристика мезенхимальных стволовых клеток жировой ткани собаки на ранних пассажах

культивування *in vitro* / Л. В. Кладницька, А. Й. Мазуркевич, С. В. Величко и соавт. Современные технологии сельскохозяйственного производства: сборник научных статей по материалам XX Международной научно-практической конференции 11 мая 2017 года. Гродно: ГГАУ, 2017. С. 45–46.

28. Камышников В. С. Справочник по клинико-химической лабораторной диагностике. Минск, 2000. 237 с.

29. Кладницька Л. В. Взаємозв'язок пасажування та розподілу мезенхімальних стовбурових клітин за фазами клітинного циклу. Вісник Сумського національного аграрного університету. Серія: Ветеринарна медицина. 2017. N 11 (41). С. 46–51.

30. 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. N 273. С. 82–90.

31. 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. N 78. С. 36–40.

32. Кладницька Л. В. Рівень експресії ядерного білка Ki-67 мезенхімальними стовбуровими клітинами з жирової тканини собаки за різних пасажів культивування *in vitro*. Збірник наукових праць Харківської зооветеринарної академії. Серія «Ветеринарні науки». 2017. N 35 (2). С. 147–151.

33. 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. N 237(38). С. 216–222.

34. 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.

35. 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) А61 К35/30 (2015.01) А61 Р25/00. Спосіб отримання нейральних стовбурових клітин кота: заявник і патентовласник Національний університет біоресурсів і природокористування України; № u2016 07080; заявлено 30.06.2016; опубліковано 12.12.2016; Бюл. № 23. 4 с.

36. Кладницька Л. В., Мазуркевич А. Й., Ковпак В. В. Проліферативна активність мезенхімальних стовбурових клітин миші залежно від умов виділення первинного матеріалу. Фізіологічний журнал. 2014. Т. 60. N 3 (додаток). С. 14–15.

37. Кладницька Л. В., Жигунова О. В. Вплив застосування алогенних мезенхімальних стовбурових клітин на показники загального білка сироватки крові мишей С57В1/6 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 НУБіП України, м. Київ, 15–16 травня 2014 року: тези доповіді. Київ, 2014. С. 38

38. Кладницька Л. В., Мазуркевич А. Й., Абраменко І. В. Вміст інтерлейкіну-6 у культуральному середовищі при культивуванні стовбурових клітин кісткового мозку мишей лінії С57В1/6 за різних пасажів культивування. Досягнення та перспективи застосування гумінових речовин у сільському господарстві: Міжнародна науково-практична конференція,

м. Дніпро, 19–20 жовтня 2017 року: матеріали конференції. м. Дніпро, 2017. С. 51.

39. Ковпак В. В., Харкевич Ю. О. Імунний статус щурів за цукрового діабету при застосуванні заміщуючої клітинної терапії. Вісник аграрної науки Причорномор'я. 2016. N 2 (89). Ч. 1. С. 164–172.

40. Лабораторні методи досліджень у біології, тваринництві та ветеринарній медицині / В. В. Влізло, Р. С. Федорук, І. Б. Ратич та інші. Львів «Сполом». 2012. 764 с.

41. Мазуркевич А. Й., Кладницька Л. В., 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. 2013. N 188. Ч. 3. С. 100–105.

42. Мазуркевич А. Й., Кладницька Л. В., Ковпак В. В. Отримання адгезивної фракції моноклеарних клітин кісткового мозку лінійних мишей C57BL/6 за різних умов виділення первинного матеріалу та культивування у середовищі RPMI. Вісник Сумського національного аграрного університету. Серія «Ветеринарна медицина». 2014. Вип. 1. С. 19–21.

43. 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. 142–145.

44. Мазуркевич А. Й., Ковпак В. В., Данілов В. Б. Клітинні технології у ветеринарній медицині: навч. посібник для студ. вищ. навч. закладів. К.: ЦП «Компринт», 2014. 132 с.

45. Мазуркевич А. Й., Ковпак В. В., Ковпак О. С. Фенотипові та морфологічні зміни культури клітин кісткового мозку щурів в процесі їх культивування. Науковий вісник ЛНУВМБТ імені С. З. Гжицького. 2016. Т. 18, N 2 (66). С. 126–131.

46. Малюк М. О. Властивості стовбурових клітин та науково-експериментальне обґрунтування їх застосування у ветеринарній медицині: дис. док. вет. наук: 16.00.02 / Нац. ун-т біоресурсів і природокористування України. Київ, 2016. 373 с.

47. Меркулов Г. А. Курс патологогистологической техники. Ленинград: Медицина, 1969. 243 с.

48. Метод отримання первинного матеріалу та адгезивної фракції моноклеарних клітин з високою проліферативною активністю з жирової тканини коня / Л. В. Кладницька, А. Й. Мазуркевич, С. В. Величко і співавт. Вісник Сумського національного аграрного університету. Серія «Ветеринарна медицина». 2016. N 11 (39). С. 48–53.

49. Методи видоспецифічної оцінки стовбурових клітин та їх застосування у ветеринарній клітинній регенеративній терапії / А. Й. Мазуркевич, М. О. Малюк, Л. Ф. Стародуб та співавт. Методичні рекомендації. Київ, 2017. 64 с.

50. Морфологические особенности популяций мезенхимальных стромальных клеток человека в зависимости от свойств культурального пластика / Н. В. Костюк, М. Б. Белякова, М. В. Черноруцкий и др. Совр. пробл. науки и образования. 2016. № 2.

51. Морфология, кинетика роста и фенотип мезенхимальных стволовых клеток костного мозга и жировой ткани человека / М. М. Зафранская, Н. В. Ламовская, Д. Б. Нижегородова и др. Иммунопатология, аллергология, инфектология. 2010. N 4. С. 86-93.

52. Морфологічні показники первинної пухлини мишей C57Bl/6 з трансплантованою метастатичною карциномою легень Льюїс за впливу алогенних мезенхімальних стовбурових клітин / Л. В. Кладницька, А. Й. Мазуркевич, Л. В. Гарманчук, та співавт. Вісник Білоцерківського національного аграрного університету. Серія: Ветеринарна медицина. 2016. № 1. С. 125–131.

53. Оксигензалежний метаболізм перитонеальних макрофагів мишей C57Bl/6 за дії алогенних мезенхімальних стовбурових клітин / Л. В. Кладницька, А. Й. Мазуркевич, С. В. Величко, Л. В. Гарманчук. XV Міжнародна науково-практична конференція професорсько-викладацького складу та аспірантів «Проблеми ветеринарної медицини та якості і безпеки продукції тваринництва», НУБіП України, ФВМ, 19-20 травня 2016 року. Київ, 2016. С. 50.

54. Отримання культури стовбурових клітин із жирової тканини собаки / Л. В. Кладницька, А. Й. Мазуркевич, С. В. Величко, О. В. Жигунова. Вісник Сумського національного аграрного університету. Серія «Ветеринарна медицина». 2016. Вип. 6 (38). С. 19–24.

55. Плохинский Н. А. Биометрия. Новосибирск. 1970. 390 с.

56. Содержание жирных кислот в липидах стволовых клеток жировой ткани собаки. Сельское хозяйство – проблемы и перспективы / Л. В. Кладницкая, А. Й. Мазуркевич, В. В. Данчук и соавт. Сборник научных трудов. Т.33. Серия: Сетеринария. Гродно, 2016. С. 60-67

57. Стовбурові клітини у ветеринарній медицині, том перший: Експериментальні дослідження з отримання, зберігання і застосування мезенхімальних стовбурових клітин: монографія / А. Й. Мазуркевич, М. О. Малюк, В. В. Ковпак та співавт. Київ: ЦП «Компринт», 2013. 265 с.

58. Стовбурові клітини у ветеринарній медицині. Експериментальні дослідження з отримання, зберігання і застосування стовбурових клітин: в 2 т. / А. Й. Мазуркевич, М. О. Малюк, В. В. Ковпак, Ю. О. Харкевич. Київ: ЦП «Компринт», 2017. Т. 2. 279 с.

59. Тихонов В. Н. К оценке изменений массы внутренних органов животных в токсикологических исследованиях. Гигиена и санит. 1981. N 7. С. 58–59.

60. Фрешни Р. Я. Культура животных клеток: практическое руководство. М: БИНОМ, Лаб-я знаний. 2012. 691 с.

61. Характеристика мезенхимальных стволовых клеток человека, выделенных из костного мозга и жировой ткани / А. С. Тепляшин, С. В. Коржикова, С. З. Шарифуллина и соавт. Цитология. 2005. т. 47, N 2. С. 130–135.

62. Характеристика мезенхимальных стволовых клеток, выделенных из костного мозга и жировой ткани крупного рогатого скота / И. М. Волкова, Е. В. Викторова, И. П. Савченко, М. И. Гулюкин. Сельскохозяйственная биология. 2012. № 2. С. 32–38.

63. Цитоплазматичні та мембранні білки нейтральних стовбурових клітин кота за різних пасажів культивування *in vitro* / Л. В. Кладницька, А. Й. Мазуркевич, Н. О. Безденежних і співавт.. Збірник наукових праць Харківської зооветеринарної академії. Серія «Ветеринарні науки». 2017. N 34 (2). С. 64–70.

64. Цупиков О. М. Метод отримання культури фетальних нейтральних прогеніторних клітин з гіпокампа мишей. Клітинна та органна трансплантологія. 2014. Том 2, N 2. С. 152–154.

65. Экспрессия апоптоз-ассоциированного белка bcl-2 мезенхимальными стволовыми клетками из жировой ткани собаки при культивировании *in vitro* / В. А. Патафеев, Л. В. Кладницкая, А. Й. Мазуркевич и соавт. Ветеринарный журнал Беларуси. 2018. N 1 (8). С. 65–68.

66. "Humanized" stem cell culture techniques: the animal serum controversy / C. Tekkatte, G. P. Gunasingh, K. M. Cherian, K. Sankaranarayanan. Stem Cells. 2011. Vol. 2011. e504723.

67. A comparative study of biological characteristics and transcriptome profiles of mesenchymal stem cells from different canine tissues / X. S. Zhan, S. El-Ashram, D. Z. Luo, et al. Int. J. Mol. Sci. 2019. Vol. 20, N 6. pii: E1485.

68. A novel chemically directed route for the generation of definitive endoderm from human embryonic stem cells based on inhibition of GSK-3 / H. K.

Bone, A. S. Nelson, C. E. Goldring, et al. *J. Cell Science*. 2011. Vol. 124. P. 1992–2000.

69. A review of the role of Wnt in cancer immunomodulation / W. N. Goldsberry, A. Londoño, T.D. Randall, et al. *Cancers (Basel)*. 2019. Vol. 11, N 6. pii: E771.

70. Additional benefit of combined therapy with melatonin and apoptotic adipose-derived mesenchymal stem cell against sepsis-induced kidney injury / H. Chen, K. C. Lin, C. G. Wallace, et al. *J. Pineal. Res.* 2014. Vol. 57, N 1. P. 16–32.

71. Adhesion, proliferation and osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells in 3D printed poly- ϵ -caprolactone/hydroxyapatite scaffolds combined with bone marrow clots / P. Zheng, Q. Yao, F. Mao, et al. *Mol. Med. Rep.* 2017. Vol. 16, N 4. P. 5078–5084.

72. Adipose stromal cells mediated switching of the pro-inflammatory profile of M1-like macrophages is facilitated by PGE2: in vitro evaluation / C. Manferdini, F. Paoletta, E. Gabusi, et al. *Osteoarthritis cartilage*. 2017. Vol. 25, N 7. P. 1161–1171.

73. Adipose tissue: A natural resource for multipotent mesenchymal stem cells with potential translation to trigeminal layers / B. Vyas, A. Shah, A. Marathe, et al. *Indian J. Plast. Surg.* 2018. Vol. 51, N 2. P.177–181.

74. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells cultured at high density express IFN- β and suppress the growth of MCF-7 human breast cancer cells / Ryu H., J. E. Oh, K. J. Rhee, et al. *Cancer Lett.* 2014. Vol. 352, N 2. P. 220–227.

75. Adipose-derived mesenchymal stem cells from liposuction and resected fat are feasible sources for regenerative medicine / S. Schneider, M. Unger, M. van Griensven, E. R. Balmayor. *Eur. J. Med. Res.* 2017. Vol. 22, N 1. e.17.

76. Adipose-derived stem cells enhance cancer stem cell property and tumor formation capacity in Lewis lung carcinoma cells through an interleukin-6 paracrine circuit / J. H. Lu, H. J. Wei, B. Y. Peng, et al. *Stem Cell Dev.* 2016. Vol. 25, N 23. P. 1833–1842.
77. Adult mesenchymal stem cells and cell surface characterization - a systematic review of the literature / P. Mafi, S. Hindocha, R. Mafi, et al. *Open Orthop. J.* 2011. Vol. 5. P. 253–260.
78. Aggarwal S., Pittenger M. F. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood.* 2005. Vol. 105. P. 1815–1822.
79. Alečković M., McAllister S. S., Polyak K. Metastasis as a systemic disease: molecular insights and clinical implications. *Biochim. Biophys. Acta Rev. Cancer.* 2019. Vol. 1872, N 1. P. 89–102.
80. Allard B., Longhi M. S., Robson, S. C. The ectonucleotidases CD39 and CD73: Novel checkpoint inhibitor targets. *Immunol. Rev.* 2017. Vol. 276. P. 121–144.
81. Alteration of mesenchymal stem cells polarity by laminar shear stimulation promoting β -catenin nuclear localization / W. T. Chen, W. T. Hsu, M. H. Yen, et al. *Biomaterials.* 2019. Vol. 190–191. P. 1–10.
82. Amniotic mesenchymal stromal cells exhibit preferential osteogenic and chondrogenic differentiation and enhanced matrix production compared with adipose mesenchymal stromal cells / N. Topoluk, R. Hawkins, J. Tokish, J. Mercuri. *Am. J. Sports Med.* 2017. Vol. 45, N 11. P. 2637–2646.
83. An innovative, comprehensive mapping and multiscale analysis of registered trials for stem cell-based regenerative medicine / P. Monsarrat, J. N. Vergnes, V. Planat-Bénard, et al. *Stem Cells Transl. Med.* 2016. Vol. 5, N 6. P. 826–835.
84. Andrzejewska A., Lukomska B., Janowski M. Concise review: mesenchymal stem cells: from roots to boost. *Stem Cells.* 2019. Vol. 37 N 7. P. 855–864.

85. Angiogenic properties of endometrial mesenchymal stromal cells in endothelial co-culture: an in vitro model of endometriosis / S. Canosa, A. Moggio, A. Brossa, et al. *Mol. Hum. Reprod.* 2017. Vol. 23, N 3. P. 187–198.
86. Antitumor effect of genetically engineered mesenchymal stem cells in a rat glioma model / K. Nakamura, Y. Ito, Y. Kawano, et al. *Gene Ther.* 2004. Vol. 11, N 14. P. 1155–1164.
87. Antitumoral potential of microvesicles extracted from human adipose-derived mesenchymal stem cells on human breast cancer cells / Z. Rezaie, A. Ardeshirylajimi, M. D. Ashkezari, S. M. Seifafi. *J. Cancer Res. Ther.* 2019. Vol. 15, N 5. P. 1114–1118.
88. Apoptosis in mesenchymal stromal cells induces in vivo recipient-mediated immunomodulation / A. Galleu, Y. Rizzo-Vasquez, C. Trento, et al. *Sci. Transl. Med.* 2017. Vol. 15, N 9. P. 416.
89. Apoptotic adipose-derived mesenchymal stem cell therapy protects against lung and kidney injury in sepsis syndrome caused by cecal ligation puncture in rats / P. H. Sung, C. L. Chang, T. H. Tsai, et al. *Stem Cell Res. Ther.* 2013. Vol. 4, N 6. P. 155.
90. Arachidonic acid metabolites in cardiovascular and metabolic diseases / T. Sonnweber, A. Pizzini, M. Nairz, et al. *Int. J. Mol. Sci.* 2018. Vol. 19, N 11. pii: E3285.
91. Architecture of succinate dehydrogenase and reactive oxygen species generation / V. Yankovskaya, R. Horsefield, S. Törnroth, et al. *Science.* 2003. Vol. 299, N. 5607. P. 700–704.
92. Arioza A. R., Klionsky D. J. A novel role for a glycolytic pathway kinase in regulating autophagy has implications in cancer therapy. *Autophagy.* 2017. Vol. 13, N 7. P. 1091–1092.
93. Assessment of fatty acid beta oxidation in cells and isolated mitochondria / G. W. Rogers, S. Nadanaciva, R. Swiss, et al. *Curr. Protoc. Toxicol.* 2014. Vol. 25, N 3. P. 1–19.

94. Autologous bone marrow mesenchymal stem cell transplantation in liver failure patients caused by hepatitis B: short-term and long-term outcomes / D. D. Houlihan, L. J. Hopkins, S. X. Suresh, et al. *Hepatology*. 2011. Vol. 54, N 5. P. 1891–1892.
95. Autophagy and multidrug resistance in cancer / Y. J. Li, Y. Y. Lei, N. Yao, et al. *Chin. J. Cancer*. 2017. Vol. 36, N 1. P. 52.
96. BDNF and NT3 reprogram human ectomesenchymal dental pulp stem cells to neurogenic and gliogenic neural crest progenitors cultured in serum-free medium / J. Luzuriaga, J. R. Pineda, I. Irastorza, et al. *Cell Physiol. Biochem*. 2019. Vol. 52, N 6. P. 1361–1380.
97. Beach A., Zhang H. G., Ratajczak M. Z. Exosomes: an overview of biogenesis, composition and role in ovarian cancer. *J. Ovarian Res*. 2014. Vol. 7. P. 14.
98. Bergfeld S. A., Blavier L., DeCleck Y. A. Bone marrow-derived mesenchymal stromal cells promote survival and drug resistance in tumor cells. *Mol. Cancer Ther*. 2014. Vol. 13, N 4. P. 962–975.
99. Berridge M. V., Schneider R. T., McConnell M. J. Mitochondrial transfer from astrocytes to neurons following ischemic insult: guilt by association? *Cell Metab*. 2016. Vol. 24, N 3. P. 376–378.
100. Berry E., Liu Y., Chen L. Eicosanoids: emerging contributors in stem cell-mediated wound healing. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*. 2017. Vol. 132. P. 17–24.
101. Bianco P., Robey P. G., Simmons P. J. Mesenchymal stem cells: revisiting history, concepts, and assays. *Cell Stem Cell*. 2008. Vol. 2, N 4. P. 313–319.
102. Bligh E. G., Dyer W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Phys*. 1959. Vol. 37, N 8. P. 911–917.

103. BMP2 and TGF- β cooperate differently during synovial-derived stem-cell chondrogenesis in a dexamethasone-dependent manner / N. J. Kovermann, V. Basoli, E. Della Bella, et al. *Cell*. 2019. Vol. 8, N 6. e636.
104. Boateng A. A., Mullen C. A., Goldberg N. Production of bio-oil from alfalfa stems by fluidized-bed fast pyrolysis. *Ind. Eng. Chem. Res.* 2008. Vol. 47, N 12. P. 4115–4122.
105. Bogdan C. Nitric oxide and the immune response. *Nat. Immunol.* 2001. Vol. 2, N 10. P. 907–916.
106. Bone marrow- and subcutaneous adipose tissue-derived mesenchymal stem cells Differences and similarities / R. Dmitrieva, I. Minullina, A. Bilibina, O. Tarasova, S. Anisimov and A. Zaritskey // *Cell Cycle*. 2012. Vol.11, N 2. P. 377-383.
107. Bone marrow mesenchymal stem cells suppress metastatic tumor development in mouse by modulating immune system / L. Zhang, X. S. Su, J. S. Ye, et al. *Exp. Cell Res. Ther.* 2015. Vol. 6. e45. doi: 10.1186/s13287-015-0039-8.
108. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells promote colorectal cancer progression through paracrine neuregulin 1/HER3 signalling / A. De Boeck, P. Pauwels, K. Hensen, et al. *Gut*. 2013. Vol. 62, N 4. P. 550–560.
109. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells promote colorectal cancer progression via CCR5 / G. Nishikawa, K. Kawada, J. Nakagawa, et al. *Cell Death Dis.* 2019. Vol. 10, N 4. P. 264.
110. Boomsma R. A., Geenen D. L. Mesenchymal stem cells secrete multiple cytokines that promote angiogenesis and have contrasting effects on chemotaxis and apoptosis. *PLoS One*. 2012. Vol. 7, N 4. e35685.
111. Breast cancer stem cells are regulated by mesenchymal stem cells through cytokine networks / S. Liu, C. Ginestier, S. J. Ou, et al. *Cancer Res.* 2011. Vol. 71, N 2. P.614–624.
112. Brunelle J. K., Letai A. Control of mitochondrial apoptosis by the Bcl-2 family. *J. Cell Sci.* 2009. Vol. 122, N 4. P. 437–441.

113. Butyric acid induces spontaneous adipocytic differentiation of porcine bone marrow-derived mesenchymal stem cells / B. Tugnoli, C. Bernardini, M. Forni, et al. *In Vitro Cell Dev. Biol. Anim.* 2019. Vol. 55, N 1. P. 17–24.
114. Canine bone marrow-derived mesenchymal stromal cells suppress alloreactive lymphocyte proliferation in vitro but fail to enhance engraftment in canine bone marrow transplantation / W. S. Lee, Y. Suzuki, S. S. Graves, et al. *Biol. Blood Marrow Transplant.* 2011. Vol. 17, N 4. P. 465–475.
115. Canine mesenchymal stem cells are neurotrophic and angiogenic: An in vitro assessment of their paracrine activity / I. R. Al Delfi, J. J. Sheard, C. R. Wood, et al. *Vet. J.* 2016. Vol. 217. P. 10–17.
116. Canine mesenchymal stem cells from synovium have a higher chondrogenic potential than those from infrapatellar fat pad, adipose tissue, and bone marrow / A. Sasaki, M. Mizuno, N. Ozeki, et al. *PLoS One.* 2018. Vol. 23, N 8. e0202922.
117. Caplan A. I. Mesenchymal stem cells. *J. Orthop. Res.* 1991. Vol. 9, N 5. P. 641–650.
118. Caplan A. I. Mesenchymal stem cells: time to change the name! *Stem Cells Transl. Med.* 2017. Vol. 6, N 6. P. 1445–1451.
119. CD105 (endoglin)-negative murine mesenchymal stromal cells define a new multipotent subpopulation with distinct differentiation and immunomodulatory capacities / P. Anderson, A. Carrillo-Galvez, A. Garcia-Perez, et al. *PloS One.* 2013. Vol. 8, N 10. e76979.
120. CD105 protein depletion enhances human adipose-derived stromal cell osteogenesis through reduction of transforming growth factor β 1 (TGF- β 1) signaling / B. Levi, D. C. Wan, J. P. Glotzbach, et al. *J. Biol Chem.* 2011. Vol. 268, N 45. P. 39497–39509.
121. CD73 expression on mesenchymal stem cells dictates the reparative properties via its anti-inflammatory activity / K. Tan, H. Zhu, J. Zhang, et al. *Stem Cells Int.* 2019. Vol. 2019. e8717694.

122. CD90 identifies adventitial mesenchymal progenitor cells in adult human medium- and large-sized arteries / K. C. Michelis, A. Nomura-Kitabayashi, L. Lecce, et al. *Stem Cell Reports*. 2018. Vol. 11, N 1. P. 242–257.
123. Cell cycle and tissue of origin contribute to the migratory behaviour of human fetal and adult mesenchymal stromal cells / M. W. Maijenburg, W. A. Noort, M. Kleijer, et al. *Br. J. Haematol.* 2010. Vol. 148, N 3. P. 428–440.
124. Chan H. Ch., Gao M., Wu W. Are newborn rat-derived neural stem cells more sensitive to lead neurotoxicity. *Neural. Regen. Res.* 2013. Vol. 8, N 7. P. 581–592.
125. Changes in phenotype and differentiation potential of human mesenchymal stem cells aging in vitro / Y. K. Yang, C. R. Ogando, C. Wang See, et al. *Stem Cell Res. Ther.* 2018. Vol. 9, N 1. e131.
126. Characterization and immunomodulatory effects of canine adipose tissue- and bone marrow-derived mesenchymal stromal cells / K. A. Russell, N. H. Chow, D. Dukoff, et al. *PLoS One*. 2016. Vol. 11, N 12. e0167442
127. Characterization of stromal vascular fraction and adipose stem cells from subcutaneous, preperitoneal and visceral morbidly obese human adipose tissue depots / K. R. Silva, I. Cortes, S. Liechocki, et al. *PloS One*. 2017. Vol. 12, N 3. e0174115.
128. Cheng H. Y., Ghetu N., Wallace C. G. The impact of mesenchymal stem cell source on proliferation, differentiation, immunomodulation and therapeutic efficacy. *J. Stem Cell Res. Ther.* 2014. Vol. 4. P. 237. .
129. Choi K. A., Hong S. Induced neural stem cells as a means of treatment in Huntington's disease. *Expert Opin. Biol. Ther.* 2017. Vol. 17, N 11. P. 1333–1343.
130. Chondrogenesis, osteogenesis and adipogenesis of canine mesenchymal stem cells: a biochemical, morphological and ultrastructural study / C. Csaki, U. Matis, A. Mobasheri, et al. *Histochem. Cell Biol.* 2007. Vol. 128, N 6. P. 507–520.

131. Christodoulou I., Goulielmaki M., Devetzi M. Mesenchymal stem cells in preclinical cancer cytotherapy: a systematic review. *Stem Cell Res. Ther.* 2018. Vol. 9, N 1. P. 336.
132. Clinical follow-up of horses treated with bone marrow-derived mesenchymal stem cells for musculoskeletal lesions / D. J. Ferris, D. D. Frisbie, J. D. Kisiday, et al. Lexington: American Association of Equine Practitioners (AAEP), 2009. P. 59–60.
133. Clinical use of mesenchymal stromal cells in the treatment of acute graft-versus-host disease / S. Elgaz, Z. Kuçi, S. Kuçi, et al. *Transfus. Med. Hemother.* 2019. Vol. 46, N 1. P.27–34.
134. Coculturing of mesenchymal stem cells of different sources improved regenerative capability of osteochondral defect in the mature rabbit: an in vivo study / E. E. Mahmoud, N. Adachi, A. S. Mawas, et al. *J. Orthop. Surg. (Honh Kong)*. 2019. Vol. 27, N 2. e2309499019839850.
135. Codinach M., Blanco M., Ortega I. Design and validation of a consistent and reproducible manufacture process for the production of clinical-grade bone marrow-derived multipotent mesenchymal stromal cells. *Cytotherapy*. 2016. Vol. 18, N 9. P. 1197–1208.
136. Co-inhibition of CD73 and A2AR adenosine signaling improves anti-tumor immune responses / A. Young, S. F. Ngiow, D. S. Barkauskas, et al. *Cancer Cell*. 2016. Vol. 30. P. 391–403.
137. Comparative adhesive and migratory properties of mesenchymal stem cells from different tissue / A. Alanazi, H. Munir, M. Alassiri, et al. *Biorheology*. 2019. Vol. 56, N 1. P. 15–30.
138. Comparative analysis of in vitro proliferative, migratory and pro-angiogenic potentials of bovine fetal mesenchymal stem cells derived from bone marrow and adipose tissue / M. Jervis, O. Huaman, B. Cahuascano, et al. *Vet. Res. Commun.* 2019. Vol. 43, N 3. P. 165–178.

139. Comparative transcriptomic analysis of human mesenchymal stem cells derived from dental pulp and adipose tissues / A. Terunuma, K. Ashiba, T. Takane, et al. *J. Stem Cell Regen. Med.* 2019. Vol. 15, N 1. P. 8–11.
140. Comparing the osteogenic potentials and bone regeneration capacities of bone marrow and dental pulp mesenchymal stem cells in a rabbit calvarial bone defect model / Y. C. Lee, Y. H. Chan, S. C. Hsieh, et al. *Int. J. Mol. Sci.* 2019. Vol. 20, N 20. P. 5015. doi: 10.3390/ijms20205015.
141. Comparison of behavior, morphology and morphometry of equine and canine adipose derived mesenchymal stem cells in culture / Grzesiak J., Marycz K., Czogala J., Wrzeszcz K., Nicpon J. *Int. J. Morphol.* 2011. Vol. 29(3). P.1012-1017.
142. Comparison of different methods for the isolation and purification of rat nucleus pulposus-derived mesenchymal stem cells / Z. Li, S. Chen, K. Ma, et al. *Connect Tissue Res.* 2019. Vol. 17. P. 1–9.
143. Comparison of human mesenchymal stem cells derived from dental pulp, bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord tissue by gene expression / P. Stanko, K. Kaiserova, V. Altanerova, et al. *Biomed. Pap. Med. Fac. Univ. Palacky Olomouc. Czech Repub.* 2014. Vol. 158, N 3. P. 373–377.
144. Comparison of the chondrogenic differentiation potential of equine synovial membrane-derived and bone marrow-derived mesenchymal stem cells / A. L. Gale, R. L. Linardi, G. McClung, et al. *Front. Vet. Sci.* 2019. Vol. 6. e178.
145. Concentration-dependent inhibition of angiogenesis by mesenchymal stem cells / K. Otsu, S. Das, S. D. Houser, et al. *Blood.* 2009. Vol. 113, N 18. P. 4197–4205.
146. Concise Review: MSC adhesion cascade-insights into homing and transendothelial migration / F. Nitzche, C. Muller, B. Lkomska, et al. *Stem Cells.* 2017. Vol. 35, N 6. P. 1446–1460.

147. Correlation between proliferative activity and cellular thickness of human mesenchymal stem cells. / Y. Katsube, M. Hirose, C. Nakamura, H. Ohgushi. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2008. Vol. 4, N 368(2). P. 256-60.
148. Cortes-Medina L. V., Pasantes-Morales H., Aquilera-Castrejon A. Neuronal transdifferentiation potential of human mesenchymal stem cells from neonatal and adult sources by a small molecule cocktail. *Stem Cell Int.* 2019. Vol. 2019. e7627148.
149. Crucial role of extracellular vesicles in bronchial asthma / T. Nagano, M. Katsurada, R. Dokuni, et al. *Int. J. Mol. Sci.* 2019. Vol. 20, N 10. pii: e2589.
150. Cruz F. F., Borg Z. D., Goodwin M. Systemic administration of human bone marrow-derived mesenchymal stromal cell extracellular vesicles ameliorates aspergillus hyphal extract-induced allergic airway inflammation in immunocompetent mice. *Stem Cells Transl. Med.* 2015. Vol. 4, N 11. P. 1302–1306.
151. Crystal structure of a soluble form of human CD73 with ecto-5'-nucleotidase activity / D. P. Heuts, M. J. Weissenborn, R. V. Olkhov, et al. *Chembiochem.* 2012. Vol. 13. P. 2384–2391.
152. Cuascut F. X., Hutton G. J. Stem cell-based therapies for multiple sclerosis: current perspectives. *Biomedicines.* 2019. Vol. 7, N 2. pii: E26.
153. Current protocols in cytometry / J. P. Robinson, Z. Darzynkiewicz, W. Hyun, A. Orfao, P. Rabinovitch. New York: John Wiley & Sons. 2004.
154. Dai X., Luo Y., Zhang J. Key indexes and the emerging tool for tumor microenvironment editing. *Am. J. Cancer Res.* 2019. Vol. 9, N 5. P. 1027–1042.
155. de Araujo Farias V., Carrillo-Galvez A. B., Anderson P. TGF- β and mesenchymal stromal cells in regenerative medicine, autoimmunity and cancer. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2018. Vol. 43. P. 25–37.

156. de Bakker E., van Ryssen B., De Schauwer C. Canine mesenchymal stem cells: state of the art, perspectives as therapy for dogs and as a model for man. *Vet. Q.* 2013. Vol. 33, N 4. P. 225–233.
157. Deshpande P., Cavanagh M. M., Le Saux S. IL-7- and IL-15-mediated TCR sensitization enables T cell responses to self-antigens. *J. Immunol.* 2013. Vol. 190, N 4. P. 1416–1423.
158. Detre S. A., Sacconi J. G., Dowsett M. A "quickscore" method for immunohistochemical semiquantitation: validation for oestrogen receptor in breast carcinomas. *Clin. Pathol.* 1995. Vol. 48, N 9. P. 876–878.
159. Development of a surrogate angiogenic potency assay for clinical-grade stem cell production / N. Lehman, R. Cutrone, A. Raber, et al. *Cytotherapy.* 2012. Vol. 14, N 8. P. 994–1004.
160. Devireddy L. R., Boxer L., Myer M. J. Questions and challenges in the development of mesenchymal stromal/stem cell-based therapies in veterinary medicine. *Tissue Eng. Part B Rev.* 2017. Vol. 23, N 5. P. 462–470.
161. Differential requirement for the dual functions of beta-catenin in embryonic stem cell self-renewal and germ layer formation / N. Lyashenko, M. Winter, D. Migliorini, et al. *Nature cell biology.* 2011. Vol. 13, N 7. P. 753–761.
162. Differentiation of adipose-derived stromal vascular fraction culture cells into chondrocytes using the method of cell sorting with a mesenchymal stem cell marker / D. Ishimura, N. Yamamoto, K. Tajima, et al. *Tohoku J. Exp. Med.* 2008. Vol. 216, N 2. P. 149–156.
163. Dongre A., Weinberg R. A. New insights into the mechanisms of epithelial–mesenchymal transition and implications for cancer. *Nature Reviews Molecular Cell Biology.* 2019. Vol. 20. P. 69–84.
164. Du J., Zhou L., Chen X. IFN- γ -primed human bone marrow mesenchymal stem cells induce tumor cell apoptosis in vitro via tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2012. Vol. 44, N 8. P. 1305–1314.

165. Duchartre Y., Kim Y. M., Kahn M. The Wnt signaling pathway in cancer. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 2016. Vol. 99. P. 141–149.
166. Effect of bone marrow derived mesenchymal stem cells on cell cycle of tumor cells in murine model of Lewis lung carcinoma / L. V. Kladnytska, A.Y. Mazurkevich, L.B. Ostrovska, et al. 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.
167. Effect of fatty acids on human bone marrow mesenchymal stem cell energy metabolism and survival / N. Fillmore, A. Huqi, J. S. Jaswal, et al. *PLoS One.* 2015. Vol. 10, N 3. e0120257.
168. Effect of mesenchymal stem cells-derived exosomes on tumor microenvironment: Tumor progression versus tumor suppression / S. Shojaei, S. M. Hashemi, H. Ghanbarian, et al. *J. Cell Physiol.* 2019. Vol. 234, N 4. P. 3394–3409.
169. El-Sahli S., Xie Y., Wang L. Wnt Signaling in Cancer Metabolism and Immunity. *Cancers (Basel).* 2019. Vol. 11, N 7. pii: E904.
170. Endoglin regulates the activation and quiescence of endothelium by participating in canonical and non-canonical TGF- β signaling pathways / S. Park, T. A. Dimaio, W. Liu, et al. *J. Cell Sci.* 2013. Vol. 126, Pt 6. P.1392–1405.
171. Engineering microenvironments towards harnessing pro-angiogenic potential of mesenchymal stem cells / M. Nasser, Y. Wu, Y. Danaoui, G. Ghosh. *Mater Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.* 2019. Vol. 102. P. 75–84.
172. Enhanced hepatogenic differentiation of human Wharton's Jelly-derived mesenchymal stem cells by using three-step protocol / W. Panta, S. Imsoonthrnruksa, S. Yoisungnern, et al. *Int. J. Mol. Sci.* 2019. Vol. 20, N 12. e3016.
173. Enoch H. G., Catala A., Strittmatter P. Mechanism of rat liver microsomal stearyl-CoA desaturase. Studies of the substrate specificity, enzyme-

substrate interactions, and the function of lipid. *J. Biol. Chem.* 1976. Vol. 251. P. 5095–5103.

174. Equine adipose-derived mesenchymal stromal cells release extracellular vesicles enclosing different subsets of small RNAs / S. Capomaccio, K. Cappelli, C. Bazzucchi, et al. *Stem Cells Int.* 2019. Vol.2019. e4957806.

175. ExoCarta2012: database of exosomal proteins, RNA and lipids / S. Mathivanan, C. J. Fahner, G. E. Reid, R. J. Simpson. *Nucleic Acids Res.* 2012. Vol. 40 (Database issue). D1241–1244.

176. Exosomal miR-301 derived from mesenchymal stem cells protects myocardial infarction by inhibiting myocardial autophagy / Y. Li, R. Yang, B. Guo, et al. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2019. Vol. 514, N 1. P. 323–328.

177. Exosomes from mesenchymal stromal cells enhance imatinib-induced apoptosis in human leukemia cells via activation of caspase signaling pathway / Y. Liu, B. Song, Y. Wei, et al. *Cytotherapy.* 2018. Vol. 20, N 2. P. 181–188.

178. Exosomes secreted by mesenchymal stromal/stem cell-derived adipocytes promote breast cancer cell growth via activation of Hippo signaling pathway / S. Wang, X. Su, M. Xu, et al. *Stem Cell Res. Ther.* 2019. Vol. 10, N 1. P. 117.

179. Expression of CD105 on expanded mesenchymal stem cells does not predict their chondrogenic potential / M. A. Cleary, R. Narcisi, K. Focke, et al. *Osteoarthritis Cartilage.* 2016. Vol. 24, N 5. P. 868–872.

180. Expression of genes involved in immune response and in vitro immunosuppressive effect of equine MSCs / A. R. Remacha, L. Barrachina, S. Alvarez-Arguedas, et al. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2015. Vol. 165, N 3–4. P. 107–118.

181. Extracellular vesicles from mesenchymal stem cells activates VEGF receptors and accelerates recovery of hindlimb ischemia / P. Gangadaran, R. L. Rajendran, H. W. Lee, et al. *J. Control Release.* 2017. Vol. 264. P. 112–126.

182. Extracellular vesicles from Wharton's jelly mesenchymal stem cells suppress CD4 expressing T cells through transforming growth factor beta and adenosine signaling in a canine model / S. K. Crain, S. R. Robinson, K. E. Thane, et al. *Stem Cell Dev.* 2019. Vol. 28, N 3. P. 212–226.

183. Filling the gap: neural stem cells as a promising therapy for spinal cord injury / I. M. Pereira, A. Marote, A. J. Salgado, N. A. Silva. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2019. Vol.12, N 2. pii: E65.

184. Folch J., Lees M., Sloane Stanley G. H. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 1957. Vol. 226, N 1. P. 497–509.

185. Friedenstein A. J. Osteogenic stem cells in bone marrow. *Bone and Mineral Research*. J. N. M. Heersche, J. A. Kanis, Eds. Amsterdam: Elsevier, 1990. P. 243–272.

186. Friedenstein A. J., Chailakhjan R. K., Lalykina K. S. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell Tissue Kinet.* 1970. Vol. 3, N 4. P. 393–403.

187. Functional activity and morphological peculiarities of mesenchimal stem cells during in vitro cultivation conditions / L. V. Kladnytska, A. I. Mazurkevych, V. T. Khomych, et al. *Науковий вісник Національного університету біоресурсів і природокористування України. Серія: Ветеринарна медицина*. 2018. N 293. С. 73–83.

188. Functional activity of cells with high adhesive properties, originated from stromal-vascular fraction of adipose tissue, after different methods of processing / L. Kladnytska, A. Mazurkevych, M. Maluk, et al. *Аграрний вісник Причорномор'я. Серія: Ветеринарні науки*. 2019. N 93. С. 48–53.

189. Functional state of thymus in mice C57BL/6 and the influence allogeneic bone marrow derived mesenchymal stem cells / L. V. Kladnytska, A. I. Mazurkevych, S. V. Velychko, et al. *Матеріали міжнародної науково-практичної конференції «Актуальні проблеми фізіології тварин» 3-5 травня*

2018, м. Чернівці. 2018. С. 50.

190. G protein-coupled receptors in stem cell maintenance and somatic reprogramming to pluripotent or cancer stem cells / H. Y. Choi, S. K. Saha, K. Kim, et al. *BMB Rep.* 2015. Vol. 48, N 2. P. 68–80.

191. Galland S, Stamenkovic I. Mesenchymal stromal cells in cancer: A review of their immunomodulatory functions and dual effects on tumor progression. *J. Pathol.* 2019. doi: 10.1002/path.5357.

192. Gao T., Yu Y., Cong Q. Human mesenchymal stem cells in the tumour microenvironment promote ovarian cancer progression: the role of platelet-activating factor. *BMC Cancer.* 2018. Vol. 18, N 1. P. 999.

193. Garcinone D, a natural xanthone promotes C17.2 neural stem cell proliferation: possible involvement of STAT3/Cyclin D1 pathway and Nrf2/HO-1 pathway / X. Yang, S. Wang, Y. Ouyang, et al. *Neurosci. Lett.* 2016. Vol. 626. P. 6–12.

194. Gargett C. E., Schwab K. E., Deane J. A. Endometrial stem/progenitor cells: the first 10 years. *Hum. Reprod. Update.* 2016. Vol. 22, N 2. P. 137–163.

195. Gastric cancer originating from bone marrow-derived cells / J. Houghton, C. Stoicov, S. Nomura, et al. *Science.* 2004. Vol. 306, N 5701. P. 1568–1571.

196. Gentile P., Garcovich S. Concise Review: adipose-derived stem cells (ASCs) and adipocyte-secreted exosomal microRNA (A-SE-miR) modulate cancer growth and promote wound repair. *J. Clin Med.* 2019. Vol. 8, N 6. pii: E855.

197. Ghavami S., Hashemi M., Ande S. R. Apoptosis and cancer: mutations within caspase genes. *J. Med. Genet.* 2009. Vol. 46, N 8. P. 497–510.

198. Gilroy D. W., Bishop-Bailey D. Lipid mediators in immune regulation and resolution. *Br. J. Pharmacol.* 2019. Vol. 176, N 8. P. 1009–1023.

199. Gluzman D. F., Abramenko I.V., Sklyarenko L.M. Diagnosis of leukemia, atlas and practical guide. Kiev: Morion, 2000. 224 c.

200. Goldsmith J., Levine B., Debnath J. Autophagy and cancer metabolism. *Methods Enzymol.* 2014. Vol. 542. P. 52–54.
201. Golub R., Watanabe T., Brendolan A. Origin and immunological functions of spleen stromal cells. *Trends Immunol.* 2018. Vol. 39, N 6. P. 503–514.
202. Groner B., von Manstein V. Jak Stat signaling and cancer: Opportunities, benefits and side effects of targeted inhibition. *Mol. Cell Endocrinol.* 2017. Vol. 451. P. 1–14.
203. Gupta V. K., Banerjee S. Isolation of lipid raft proteins from CD133+ cancer stem cells. *Methods Mol. Biol.* 2017. Vol. 1609. P. 25–31.
204. Haas R. H. Mitochondrial dysfunction in aging and diseases of aging. *Biology (Basel).* 2019. Vol. 8, N 2. pii: E48.
205. Haas R., von der Ohe J., Ungefroren H. Potential role of MSC/cancer cell fusion and EMT for breast cancer stem cell formation. *Cancer (Basel).* 2019. Vol. 11, N 10. e1432. doi: 10.3390/cancers11101432.
206. Haque M., Akbar M. Role of polyunsaturated fatty acids and their metabolites on stem cell proliferation and differentiation. *Adv. Neurobiol.* 2016. Vol. 12. P. 367 dynamics.
207. Hatok J., Racay P. Bcl-2 family proteins: master regulators of cell survival. *Biomol. Concepts.* 2016. Vol. 7, N 4. P. 259–270.
208. Hetemaki N., Savolainen-Peltonen H., Tikkanen M. J. Estrogen metabolism in abdominal subcutaneous and visceral adipose tissue in postmenopausal women. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2017. Vol. 102, N 12. P. 4588–4595.
209. Hoffman A. M., Dow S. W. Concise review: stem cell trials using companion animal disease models. *Stem Cells.* 2016. Vol. 34, N 7. P. 1709–1729.
210. Höpken U. E., Rehm A. Targeting the tumor microenvironment of leukemia and lymphoma. *Trends Cancer.* 2019. Vol. 5, N 6. P. 351–364.

211. Human bone marrow- and adipose-mesenchymal stem cells secrete exosomes enriched in distinctive miRNA and tRNA species / S. R. Baglio, K. Rooijers, D. Koppers-Lalic, et al. *Stem Cell Res. Ther.* 2015. Vol. 6. P. 127.
212. Human bone marrow mesenchymal stem cells display anti-cancer activity in SCID mice bearing disseminated non-Hodgkin's lymphoma xenografts / P. Secchiero, S. Zorset, C. Tripodo, et al. *PLoS One*. 2010. Vol. 5, N 6. e11140.
213. Human bone marrow mesenchymal stem cells promote gastric cancer growth via regulating *c-Myc* / B. Chen, J. Yu, Q. Wang, et al. *Stem Cells Int.* 2018. Vol. 2018. e9501747.
214. Human bone marrow stromal cells inhibit allogeneic T-cell responses by indoleamine 2,3-dioxygenase-mediated tryptophan degradation / R. Meisel, A. Zibert, M. Laryea, et al. *Blood*. 2004. Vol. 103. P. 4619–4621.
215. Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli / M. Di Nicola M, C. Carlo-Stella, M. Magni, et al. *Blood*. 2002. Vol. 99. P. 3838–3843.
216. Human mesenchymal stem cells (MSCs) for treatment towards immune- and inflammation-mediated diseases: review of current clinical trials / L. T. Wang, C. H. Ting, M. L. Yen, et al. *Biomed. Sci.* 2016. Vol. 23, N 1. P. 76.
217. Human mesenchymal stem cells exert potent antitumorigenic effects in a model of Kaposi's sarcoma / A. Y. Khakoo, S. Pati, S. A. Andderson, et al. *J. Exp. Med.* 2006. Vol. 203, N 5. P. 1235–1247.
218. Human mesenchymal stem cells program macrophage plasticity by altering their metabolic status via a PGE₂-dependent mechanism / A. B. Vasandan, S. Jahnavi, C. Shashank, et al. *Sci. Rep.* 2016. Vol. 6. e38308.
219. Human mesenchymal stromal cell-secreted lactate induces M2-macrophage differentiation by metabolic reprogramming / S. Selleri, P. Bifsha, S. Civini, et al. *Oncotarget*. 2016. Vol. 7, N 21. P. 30193–30210.
220. Human monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1). Full-length cloning, expression in mitogen-stimulated blood mononuclear leukocytes, and

sequence similarity to mouse competence gene / T. Yoshimura, N. Yuhki, S. K. Moore, et al. FEBS letters. 1989. Vol. 244, N 2. P. 487–493.

221. Human stromal (mesenchymal) stem cells from bone marrow, adipose tissue and skin exhibit differences in molecular phenotype and differentiation potential / M. Al-Nbaheen, R. Vishnubalaji, D. Ali, et al. Stem Cell Rev. 2013. Vol. 9, N 1. P. 32–43.

222. Human umbilical cord mesenchymal stem cells inhibit C6 glioma growth via secretion of dickkopf-1 (DKK1) / S. Ma, S. Liang, H. Jiao, et al. Mol. Cell Biochem. 2014. Vol. 385, N 1–2. P. 277–286.

223. Hunter C. A., Jones S. A. IL-6 as a keystone cytokine in health and disease. Nat. Immunol. 2015. Vol. 16, N 5. P. 448–457.

224. Hussain M., Adah D., Tariq M. CXCL13/CXCR5 signaling axis in cancer. Life Sci. 2019. Vol. 227. P. 175–186.

225. Hyaluronic acid coatings as a simple and efficient approach to improve MSC homing toward the site of inflammation / B. Corradetti, F. Taraballi, J. O. Martinez, et al. Sci. Rep. 2017. Vol.7, N 1. P. 7991.

226. Hyaluronic acid facilitates the recovery of hematopoiesis following 5-fluorouracil administration / V. Y. Matrosova, I. A. Orlovskaya, N. Serobyanyan, et al. Stem cells. 2004. Vol. 22, N 4. P. 544–555.

227. Hyperacute GVHD: risk factors, outcomes, and clinical implications / R. M. Saliba, M. de Lima, S. Giralt, et al. Blood. 2007. Vol. 109, N 7. P. 2751–2758.

228. Hypoxia Inducible Factor-1 α potentiates Jagged 1-mediated angiogenesis by mesenchymal stem cell-derived exosomes / H. Gonzalez-King, N. A. Garcia, I. Ontoria-Oviedo, et al. Stem Cells. 2017. Vol. 35, N 7. P. 1747–1759.

229. Identification of STAT3-NRF2-hypoxia as a novel reinforcing mechanism for promoting cancer stemness / L. E. Tavera, K. Simon, J. Li, et al. Proceedings of the American Association for Cancer Research Annual Meeting

2017; 2017 Apr 1-5; Washington, DC. Philadelphia (PA): AACR. Cancer Res. 2017. Vol. 77, N 13 suppl. Abstract NR LB-143.

230. IFN- γ and TNF- α pre-licensing protects mesenchymal stromal cells from the pro-inflammatory effects of palmitate / L. Boland, A. J. Burand, A. J. Brown, et al. Mol. Ther. 2018. Vol. 26, N 3. P. 860–873.

231. Immune dysfunction and increased oxidative stress state in diet-induced obese mice are reverted by nutritional supplementation with monounsaturated and n-3 polyunsaturated fatty acids / C. Hunsche, O. Hernandez, A. Gheotghe, et al. Eur. J. Nutr. 2018. Vol. 57, N 3. P. 1123–1135

232. Immune modulation of some autoimmune diseases: the critical role of macrophages and neutrophils in the innate and adaptive immunity / K. C. Navegantes, R. de Souza Gomes, P. A. T. Pereira, et al. J. Trans. Med. 2017. Vol. 15, N 1. P. 36.

233. Immune-related antigens, surface molecules and regulatory factors in human-derived mesenchymal stromal cells: the expression and impact of inflammatory priming / M. Najar, G. Raicevic, H. Fayyad-Kazan, et al. Stem Cell Res. 2012. Vol. 8, N 4. P. 1188–1198.

234. Immunological characterization of multipotent mesenchymal stromal cells – The International Society for Cellular Therapy (ISCT) working proposal / M. Krampera, J. Galipeau, Y. Shi, et al. Cytotherapy. 2013. Vol. 15, N 9. P. 1054–1061.

235. Immunomodulatory and immunogenic properties of mesenchymal stem cells derived from bovine fetal bone marrow and adipose tissue / O. Huaman, J. Bahamonde, B. Cahuascano, et al. Res. Vet. Sci. 2019. Vol. 124. P. 212–222.

236. Increase of aneuploid tumor cells as a result of the influence of allogeneic mesenchymal stem cells / O. I. Dzhus, L. Kladnytska, L. Garmanchuk, et al. Annals of Oncology. 2014. Vol. 25, N 4. P. 1660.

237. Increased IL-6 secretion by aged human mesenchymal stromal cells disrupts hematopoietic stem and progenitor cells' homeostasis / K. O'Hagan-

Wong, S. Nadeau, A. Carrier-Leclerc, et al. *Oncotarget*. 2016. Vol. 7, N 12. P. 13285–13296.

238. Influence allogeneic mesenchymal stem cells on the tumour cells parameters / T. V. Nikolaienko, L. V. Garmanchuk, L. V. Kladnytska, et al. *EMBO*. 2014. Vol. 281, suppl. P. 477–478.

239. Influence allogeneic mesenchymal stem cells on the tumour growth parameters and metastatic potential in the transplantable carcinoma lung Lewis / L. V. Kladnytska, V. V. Nikulina, L. V. Garmanchuk, et al. *J. Animal Vet. Sciences*. 2014. Vol. 1, N 1, P. 1–5.

240. Influence mesenchymal stem cells on aneuploidy of the tumor cells of Lewis lung carcinoma / T. Nikolaenko, L. Garmanchuk, O. Dzhus, L. Kladnytska. *Eur. Res. J.* 2019. Vol. 54, suppl. 63. PA3655.

241. Influence of transplanted bone marrow and adipose derived allogenic mesenchymal stromal cells on the biochemical parameters of C57Bl/6 mice blood / L. V. Kladnytska, A. Y. Mazurkevych, M. O. Maluk, et al. *Ukr. Biochem. J.* 2018. Vol.90. P.78.

242. Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome / R. H. Waterston, T. K. Lindblad, B. E. Rogers, et al. (Mouse Genome Sequencing Consortium). *Nature*. 2002. Vol. 420, N 6915. P. 520–562.

243. Interleukin 7 stimulates tumour necrosis factor alpha and Th1 cytokine production in joints of patients with rheumatoid arthritis / J. A. van Roon, K. A. Glaudemans, J. W. Bijlsma, F. P. Lefeber. *Ann. Rheum. Dis.* 2003. Vol. 62, N 2. P. 113–119.

244. International Society for Cellular Therapy perspective on immune functional assays for mesenchymal stromal cells as potency release criterion for advanced phase clinical trials / J. Galipeau, M. Krampera, J. Barrett, et al. *Cytotherapy*. 2016. Vol. 18, N 2. P. 151–159.

245. Intranuclear actin structure modulates mesenchymal stem cell differentiation / B. Sen, G. Uzer, R. M. Samsonraj, et al. *Stem Cells*. 2017. Vol. 35, N 6. P. 1624–1635.

246. Intravenously delivered mesenchymal stem cells: systemic anti-inflammatory effects improve left ventricular dysfunction in acute myocardial infarction and ischemic cardiomyopathy / D. Luger, M. J. Lipinski, P. C. Westman, et al. *Circ. Res.* 2017. Vol. 120, N 10. P. 1598–1613.

247. Isolation and characterisation of mesenchymal stem cells from rat bone marrow and the endosteal niche: a comparative study / N. Yusop, P. Battersby, A. Alraies, et al. *Stem Cells Int.* 2018. Vol. 2018. e6869128.

248. Isolation and characterization of multipotential mesenchymal stem cells from feline bone marrow / D. R. Martin, N. R. Cox, T. L. Hathcock, et al. *Exp. Hematol.* 2002. Vol. 30. P. 879–886.

249. Isolation and characterization of novel murine epiphysis derived mesenchymal stem cells / C. C. Cheng, W. S. Lian, F. S. Hsiao, et al. *PLoS One*. 2012. Vol. 7. P. 360–385.

250. Isolation of adipose tissue-derived stem cells: enzymatic digestion in combination with mechanical distortion to increase adipose tissue-derived stem cell yield from human aspirated fat / T. Alstrup, M. Eijken, A. B. Bohn, et al. *Curr. Protoc. Stem Cell Biol.* 2019. Vol. 48, N 1. e68.

251. Isolation, characterization, and differentiation potential of canine adipose-derived stem cells / N. M. Vieira, V. Brandalise, E. Zucconi, et al. *Cell Transplant.* 2010. Vol. 19, N 3. P. 279–289.

252. Isolation, cultivation, and characterization of human mesenchymal stem cells / D. Mushahary, A. Spittler, C. Kasper, et al. *Cytometry A*. 2018. Vol. 93, N 1. P. 19–31.

253. Iwatsuki M., Mimori K., Yokobori T. Epithelial-mesenchymal transition in cancer development and its clinical significance. *Cancer Sci.* 2010. Vol. 101. P. 293–299.

254. Jackson M. V., Krasnodembskaya A. D. Analysis of mitochondrial transfer in direct co-cultures of human monocyte-derived macrophages (MDM) and mesenchymal stem cells (MSC). *Bio Protoc.* 2017. Vol. 7, N 9. pii: e2255.
255. Jones S. A., Jenkins B. J. Recent insights into targeting the IL-6 cytokine family in inflammatory disease and cancer. *Nat. Rev. Immunol.* 2018. Vol. 18, N 12. P. 773–789.
256. Jossen V., van den Bos Ch., Eibl R. Manufacturing human mesenchymal stem cells at clinical scale: process and regulatory challenges. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2018. Vol. 102, N 9. P. 3981–3994.
257. Kakarala M., Wicha M. S. Implications of the cancer stem-cell hypothesis for breast cancer prevention and therapy. *J. Clin. Oncol.* 2008. Vol. 26, N 17. P. 2813–2820.
258. Kang J. X., Wan J. B., He C. Concise review: Regulation of stem cell proliferation and differentiation by essential fatty acids and their metabolites. *Stem Cells.* 2014. Vol. 32, N 5. P. 1092–1098.
259. Klopsch C., Gaebel R., Lemcke H. Vimentin-induced cardiac mesenchymal stem cells proliferate in the acute ischemic myocardium. *Cells Tissues Organs.* 2018. Vol. 206, N 1–2. P. 35–45.
260. Krajla-Luzniak V., Baer-Dubowska W. The Nrf2-ARE signaling pathway: An update on its regulation and possible role in cancer prevention and treatment. *Pharmacol. Rep.* 2017. Vol. 69, N 3. P. 393–402.
261. Le Blank K., Davies L. C. Mesenchymal stromal cells and the innate immune response. *Immunol. Lett.* 2015. Vol. 168, N 2. P. 140–146.
262. Lee H. - Y., Hong I. - S. Double - edged sword of mesenchymal stem cells: Cancer - promoting versus therapeutic potential. *Cancer Sci.* 2017. Vol. 108, N 10. P. 1939–1946.
263. Lemmens B., Lindqvist A. DNA replication and mitotic entry: a brake model for cell cycle progression. *J. Cell Biol.* 2019. Vol. 12. P. 3892–3902.

264. Leukemia inhibitory factor functions in parallel with interleukin-6 to promote ovarian cancer growth / K. McLean, L. Tan, D. E. Bolland, et al. *Oncogene*. 2019. Vol. 38, N 9. P. 1576–1584.
265. Lgr5-overexpressing mesenchymal stem cells augment fracture healing through regulation of Wnt/ERK signaling pathways and mitochondrial / W. Lin, L. Xu, Q. Pan, et al. *FASEB J*. 2019. Vol. 33, N 7. P. 8565–8577.
266. Li H. J., Reinhardt F., Yerschman H. R. Cancer-stimulated mesenchymal stem cells create a carcinoma stem cell niche via prostaglandin E2 signaling. *Cancer Discov*. 2012. Vol. 2, N 9. P. 840–855.
267. Li N., Hua J. Interactions between mesenchymal stem cells and the immune system. *Cell Mol. Life Sci*. 2017. Vol. 74, N 13. P. 2345–2360.
268. Li X., Han F., Liu W. PTBP1 promotes tumorigenesis by regulating apoptosis and cell cycle in colon cancer. *Bull Cancer*. 2018. Vol. 105, N 12. P. 1193–1201.
269. Li Zh. CD133: a stem cell biomarker and beyond. *Exp. Hematol. Oncol*. 2013. Vol. 2. e17.
270. Linden J., Cekic C. Regulation of lymphocyte function by adenosine. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol*. 2012. Vol. 32, N 9. P. 2097–2103.
271. Linking mitochondrial dysfunction to neurodegeneration in lysosomal storage diseases / A. Saffari, S. Kolker, G. F. Hoffmann, et al. *J. Inherit. Metab. Dis*. 2017. Vol. 40, N 5. P. 631–640.
272. Liras A. J. Future research and therapeutic applications of human stem cells: general, regulatory, and bioethical aspects. *Transl. Med*. 2010. Vol. 8. P. 131.
273. Loss of interactions between p53 and survivin gene in mesenchymal stem cells after spontaneous transformation in vitro / L. He, F. Zhao, Y. Zheng, et al. *Int. J. Biochem. Cell Biol*. 2016. Vol. 75. P. 74–84.

274. Luk F., de Witte S. F., Korevaar S. S. Inactivated mesenchymal stem cells maintain immunomodulatory capacity. *Stem Cells Dev.* 2016. Vol. 25, N 18. P. 1342–1354.
275. Luo J., Yu F. X. GPCR-Hippo Signaling in Cancer. *Cells.* 2019. Vol. 8, N 5. pii: e426.
276. Luz-Crawford P., Jorgensen C., Djouad F. Mesenchymal stem cells direct the immunological fate of macrophages. *Results Probl. Cell Differ.* 2017. Vol. 62. P. 61–72.
277. Lv F. J., Tuan R. S., Cheung K. M. Concise review: the surface markers and identity of human mesenchymal stem cells. *Stem Cells.* 2014. Vol. 32, N 6. P. 1408–1419.
278. Mabuchi Y., Matsuzaki Y. Prospective isolation of resident adult human mesenchymal stem cell population from multiple organs. *Int. J. Hematol.* 2016. Vol. 103, N 2. P. 138–144.
279. Maciel B., Rebelatto C. L., Brofman P. R.S., Morphology and morphometry of feline bone marrow-derived mesenchymal stem cells in culture. Cruz and Rosangela Locatelli-Dittrich. *Pesq. Vet. Bras.* 2014. Vol. 34, N 11. P. 1127-1134.
280. Madrigal M., Rao K. S., Riordan N. H. A review of therapeutic effects of mesenchymal stem cell secretions and induction of secretory modification by different culture methods. *J. Transl. Med.* 2014. Vol. 12. P. 260.
281. Mammalian MSC from selected species: features and applications / C. Uder, S. Bruckner, S. Winkler, et al. *Cytometry.* 2018. Vol. 93, N 1. P. 32–49.
282. Marion-Letellier R., Savoye G., Ghosh S. Fatty acids, eicosanoids and PPAR gamma. *Eur. J. Pharmacol.* 2016. Vol. 785. P. 44–49.
283. Marrow-derived stromal cells express genes encoding a broad spectrum of arteriogenic cytokines and promote in vitro and in vivo arteriogenesis through paracrine mechanisms / T. Kinnaird, E. Stabile, M. S. Burnett, et al. *Circ. Res.* 2004. Vol. 94. P. 678–685.

284. Mathew S. A., Bhonde R. R. Omega-3 polyunsaturated fatty acids promote angiogenesis in placenta derived mesenchymal stromal cells. *Pharmacol. Res.* 2018. Vol. 132. P. 90–98.
285. Mathivanan S., Simpson R. J. ExoCarta: A compendium of exosomal proteins and RNA. *Proteomics.* 2009. Vol. 9, N 21. P. 4997–5000.
286. Mauri C., Menon M. Human regulatory B cells in health and disease: therapeutic potential. *J. Clin. Invest.* 2017. Vol. 127, N 3. P. 772–779.
287. Mayo J. C. Biologic characterization of the subcutaneously implanted Lewis lung tumor. *Cancer Chemother. Rep.* 2. 1972. Vol. 3, N 1. P. 325–330.
288. Mazurkevich A. Y., Kladnytska L. V, Kovpak V. V. Features conditions selection and cultivation mouse bone marrow adhesive fraction mononuclear cells. Матеріали конференції «Cell Technology Week 2013» 2013 May14-17; Kyiv, Ukraine. 2013. P. 94
289. Mazurkevich A., Kladnytska L., Kovpak V. Features conditions selection and cultivation mouse bone marrow adhesive fraction mononuclear cells. *Visnyk Kyi'v. nac. un-tu imeni Tarasa Shevchenka.* 2013. Vyp. 2 (64). S. 41–43.
290. Mechanisms of disease: epithelial-mesenchymal transition - does cellular plasticity fuel neoplastic progression? / E.A. Turley, M. Veiseth, D. C. Radisky, M. J. Bissell. *Nat. Clin. Pract. Oncol.* 2008. Vol. 5. P. 280–290.
291. Mechanisms of immune suppression utilized by canine adipose and bone marrow-derived mesenchymal stem cells / L. Chow, V. Johnson, J. Coy, et al. *Stem Cell Dev.* 2017. Vol. 26, N 5. P. 374–389.
292. Melzer C., Yang Y., Haas R. Interaction of MSC with tumor cells. *Cell Commun. Signal.* 2016. Vol. 14, N 1. P. 20.
293. Membrane particles generated from mesenchymal stromal cells modulate immune responses by selective targeting of pro-inflammatory monocytes / F. Goncalves, F. Luk, S. S. Korevaar, et al. *Sci. Rep.* 2017. Vol. 7. P. 12100.

294. Membrane vesicles, current state-of-the-art: emerging role of extracellular vesicles / B. György, T. G. Szabó, M. Pásztói, et al. *Cell Mol. Life Sci.* 2011. Vol. 68, N 16. P. 2667–2688.

295. Merry D. E., Korsmayer S. J. Bcl-2 gene family in the nervous system. *Annu. Rev. Neurosci.* 1997. Vol. 20. P. 245–267.

296. Mesenchymal impact of apoptotic adipose-derived mesenchymal stem cells on attenuating organ damage and reducing mortality in rat sepsis syndrome induced by cecal puncture and ligation / C. L. Chang, S. Leu, H. C. Sung et al. *J. Transl. Med.* 2012. Vol. 10. e244.

297. Mesenchymal progenitor cell-mediated inhibition of tumor growth in vivo and in vitro in gelatin matrix / L. B. Ohlsson, L. Varas, C. Kjellman, et al. *Exp. Mol. Pathol.* 2003. Vol. 75, N 3. P. 248–255.

298. Mesenchymal stem cell administration attenuates colon cancer progression by modulating the immune component within the colorectal tumor microenvironment / S. Francois, B. Usunier, M. E. Forgue-Lafitte, et al. *Stem Cells Transl. Med.* 2019. Vol. 8, N 3. P. 285–300.

299. Mesenchymal stem cell transition to tumor-associated fibroblasts contributes to fibrovascular network expansion and tumor progression / E. L. Spaeth, J. L. Dembinski, A. K. Sasser, et al. *PLoS One.* 2009. Vol. 4, N 4. e4992.

300. Mesenchymal stem cell: an efficient mass producer of exosomes for drug delivery / R. W. Yeo, R. C. Lai, B. Zhang, et al. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2013. Vol. 65, N 3. P. 336–341.

301. Mesenchymal stem cell-based therapy of inflammatory lung diseases: current understanding and future perspectives / C. R. Harrell, R. Sadikot, J. Pascual, et al. *Stem Cells Int.* 2019. Vol. 2019. e4236973.

302. Mesenchymal stem cell-conditioned medium induces neutrophil apoptosis associated with inhibition of the NF- κ B pathway in endotoxin-induced

acute lung injury / V. Y. Su, C. S. Lin, S. C. Hung, K. Y. Yang. *Int. J. Mol. Sci.* 2019. Vol. 20, N 9. pii: E2208.

303. Mesenchymal stem cell-derived exosomes as a new therapeutic strategy for liver diseases / G. Lou, Z. Chen, M. Zheng, T. Liu. *Exp. Mol. Med.* 2017. Vol. 49, N 6. e346.

304. Mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles affect disease outcomes via transfer of microRNAs / G. Qiu, G. Zheng, M. Ge, et al. *Stem Cell Res. Ther.* 2018. Vol. 9, N 1. P. 320.

305. Mesenchymal stem cell - induced DDR2 mediates stromal - breast cancer interactions and metastasis growth / M. E. Gonzalez, E. E. Martin, T. Anwar, et al. *Cell Rep.* 2017. Vol. 18. P. 1215–1228.

306. Mesenchymal stem cell-mediated immunosuppression occurs via concerted action of chemokines and nitric oxide / G. Ren, L. Zhang, X. Zhao, et al. *Cell Stem Cell.* 2008. Vol. 2, N 2. P. 141–150.

307. Mesenchymal stem cell-mediated immunosuppression occurs via concerted Intravenous administration of bone marrow-derived multipotent mesenchymal stromal cells enhances the recruitment of CD11b(+) myeloid cells to the lungs and facilitates B16-F10 melanoma colonization / L. E. Souza, D. C. Almeida, J. N. Yaochite, et al. *Exp. Cell Res.* 2016. Vol. 345, N 2. P. 141–149.

308. Mesenchymal stem cell-mediated T cell suppression occurs through secreted galectins / M. Sioud, A. Mobergslien, A. Boudebous, Y. Floisand. *Int. J. Oncol.* 2011. Vol. 38, N 2. P. 385–390.

309. Mesenchymal stem cells alleviate oxidative stress-induced mitochondrial dysfunction in the airways / X. Li, C. Michaeloudes, Y. Zhang, et al. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2018. Vol. 141, N 5. P. 1634–1645.

310. Mesenchymal stem cells and macrophages interact through IL-6 to promote inflammatory breast cancer in pre-clinical models / A. R. Wolfe, N. J. Trenton, B. G. Debeb, et al. *Oncotarget.* 2016. Vol.7, N 50. P. 82482–82492.

311. Mesenchymal stem cells as a salvage treatment for severe refractory graft-vs-host disease in children after bone marrow transplantation / A. Krasowska-Kwiecien, J. Gozdzik, D. Jarocha, et al. *Transplant Proc.* 2019. Vol. 51, N 3. P. 880–889.
312. Mesenchymal stem cells deliver exogenous miR-21 via exosomes to inhibit nucleus pulposus cell apoptosis and reduce intervertebral disc degeneration / X. Cheng, G. Zhang, L. Zhang, et al. *J. Cell Mol. Med.* 2018. Vol. 22, N 1. P. 261–276.
313. Mesenchymal stem cells in suppression or progression of hematologic malignancy: current status and challenges / M. W. Lee, S. Ryu, D. S. Kim, et al. *Leukemia.* 2019. Vol. 33, N 3. P. 597–611.
314. Mesenchymal stem cells inhibit and stimulate mixed lymphocyte cultures and mitogenic responses independently of the major histocompatibility complex / K. Le Blanc, L. Tammik, B. Sundberg, et al. *Scand. J. Immunol.* 2003. Vol. 57, N 1. P. 11–20.
315. Mesenchymal stem cells promote metastasis of lung cancer cells by downregulating systemic antitumor immune response / M. Gazdic, B. Simovic Markovic, N. Jovicic, et al. *Stem Cells Int.* 2017. Vol. 2017. e6294717.
316. Mesenchymal stem cells protect nucleus pulposus cells from compression-induced apoptosis by inhibiting the mitochondrial pathway / S. Chen, L. Zhao, X. Deng, et al. *Stem Cells Int.* 2017. 2017. e9843120.
317. Mesenchymal stem cells release exosomes that transfer miRNAs to endothelial cells and promote angiogenesis / M. Gong, B. Yu, J. Wang, et al. *Oncotarget.* 2017. Vol. 8, N 28. P. 45200–45212.
318. Mesenchymal stem cells sense mitochondria released from damaged cells as danger signals to activate their rescue properties / M. Mahrouf-Yorgov, L. Augeul., C. C. Da Silva et al. *Cell Death Differ.* 2017. Vol. 24, N 7. P. 1224–1238.

319. Mesenchymal stem cells/multipotent stromal cells (MSCs) are glycolytic and thus glucose is a limiting factor of in vitro models of MSC starvation / A. Nuschke, M. Rodriques, A. W. Well, et al. *Stem Cell Res. Ther.* 2016. Vol. 7, N 1. P. 179.

320. Mesenchymal stem cells: a new trend for cell therapy / X. Wei, X. Yang, Z. P. Han, et al. *Acta Pharmacol. Sin.* 2013 Vol. 34, N 6. P. 747–754.

321. Mesenchymal stem cells: cell therapy and regeneration potential / C. Brown, C. McKee, S. Bakshi, et al. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* 2019. Vol. 13, N 9. C. 1738–1755.

322. Mesenchymal stem cells: Identification, phenotypic characterization, biological properties and potential for regenerative medicine through biomaterial micro-engineering of their niche / J. Kobolak, A. Dinnyes, A. Memic, et al. *Methods.* 2016. Vol. 99. P. 62–68.

323. Mesenchymal stem or stromal cells: toward a better understanding of their biology? / U. Linder, J. Kramer, J. Rohwedel, P. Schlenke. *Transfus. Med. Hemother.* 2010. Vol. 37, N 2. P. 75–83.

324. Mesenchymal stromal cell-derived extracellular vesicles protect the fetal brain after hypoxia-ischemia / D. R. Ophelders, T. G. Wolfs, R. K. Jellema, et al. *Stem Cells Transl. Med.* 2016. Vol. 5, N 6. P. 754–763.

325. Mesenchymal stromal cell-derived interleukin-6 promotes epithelial-mesenchymal transition and acquisition of epithelial stem-like cell properties in ameloblastoma epithelial cells / C. Jiang, Q. Zhang, R. M. Shanti, et al. *Stem Cells.* 2017. Vol. 35, N 9. P. 2083–2094.

326. Mesenchymal stromal cells ameliorate experimental autoimmune encephalomyelitis by inhibiting CD4 Th17 T cells in a CC chemokine ligand 2-dependent manner / M. Rafeu, P. M. Campeau, A. Aquilar-Mahecha, et al. *J. Immunol.* 2009. Vol. 182, N 10. P. 5994–6002.

327. Mesenchymal stromal cells derived from acute myeloid leukemia bone marrow exhibit aberrant cytogenetics and cytokine elaboration / J. C. Huang, S. K. Basu, X. Zhao, et al. *Blood Cancer J.* 2015. Vol. 5. e302.
328. Mesenchymal stromal cells for bone sarcoma treatment: Roadmap to clinical practice / A. Stamatopoulos, T. Stamatopoulos, Z. Gamie, et al. *J. Bone Oncol.* 2019. Vol. 16. e100231.
329. Mesenchymal stromal cells support the viability and differentiation of thymocytes through direct contact in autologous co-cultures / S. M. Azghadi, M. Suci, A. T. Gruia, et al. *Histochem. Cell Biol.* 2016. Vol. 146, N 2. P. 153–165.
330. Meta-analysis of preclinical studies of mesenchymal stromal cells to treat rheumatoid arthritis / L. Liu, C. W. Wong, M. Han, et al. *EBioMedicine.* 2019. Vol. 47. P. 563–577.
331. Metabolic features of cancer stem cells: the emerging role of lipid metabolism / R. Mancini, A. Noto, M. E. Pisanu, et al. *Oncogene.* 2018. Vol. 37, N 18. P. 2367–2378.
332. Metabolism and phospholipid assembly of polyunsaturated fatty acids in human bone marrow mesenchymal stromal cells / F. Tigistu-Sahle, M. Lampinen, L. Kilpinen, et al. *J. Lipid Res.* 2017. Vol. 58, N 1. P. 92–110.
333. Microvesicles derived from human bone marrow mesenchymal stem cells promote U2OS cell growth under hypoxia: the role of PI3K/AKT and HIF-1 α / S. Lin, B. Zhu, G. Huang, et al. *Hum. Cell.* 2019. Vol. 32, N 1. P. 64–74.
334. Ming G. L., Song H. Adult neurogenesis in the mammalian brain: significant answers and significant questions. *Neuron.* 2011. Vol. 70, N 4. P. 687–702.
335. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement / M. Dominici, K. Le Blanc, I. Mueller, et al. *Cytotherapy.* 2006. Vol. 8, N4. P. 315–317.

336. Mitochondrial fatty acid synthesis, fatty acids and mitochondrial physiology / A. J. Kastaniotis, K. J. Autio, J. M. Keratar, et al. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Biol. Lipids*. 2017. Vol. 1862, N 1. P. 39–48.

337. Mitochondrial transfer from bone marrow mesenchymal stem cells to motor neurons in spinal cord injury rats via gap junction / H. Li, C. Wang, T. He, et al. *Theranostics*. 2019. Vol. 9, N 7. P. 2017–2035.

338. Mitochondrial transfer of mesenchymal stem cells effectively protects corneal epithelial cells from mitochondrial damage / D. Jiang, F. Gao, Y. Zhang, et al. *Cell Death Dis.* 2016. Vol. 7, N 11. e2467.

339. Modeling Alzheimer's disease with human iPS cells: advancements, lessons, and applications / S. Essayan-Perez, B. Zhou, A. M. Nabet, et al. *Neurobiol. Dis.* 2019. Vol. 13. e104503

340. Molecular mechanisms of apoptosis and roles in cancer development and treatment / S. Goldar, M. S. Khaniani, S. M. Derakhshan, B. Baradaran. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* 2015. Vol. 16, N 6. P. 2129–2144.

341. Molecular mechanisms responsible for therapeutic potential of mesenchymal stem cell-derived secretome / C. R. Harrell, C. Fellabaum, N. Jovicic, et al. *Cells*. 2019. Vol. 8, N 5. pii: E467.

342. Morales A. V., Mira H. Adult neural stem cells: born to last. *Front Cell Dev. Biol.* 2019. Vol. 7. e96.

343. Morphological peculiarities and functional activity of adipose-derived mesenchymal stem cells during in vitro cultivation conditions / L. V. Kladnytska, A. I. Mazurkevych, V. T. Khomych, et al. *Науковий вісник Львівського національного університету ветеринарної медицини імені С. З. Гжицького*. 2018. Т. 20, N 92. С. 79–82.

344. MSC surface markers (CD44, CD73, and CD90) can identify human MSC-derived extracellular vesicles by conventional flow cytometry / T. Ramos, L. I. Sanchez-Abarca, S. Muntion, et al. *Cell Commun. Signal.* 2016. Vol. 14. e2.

345. MSC, metabolism, and cancer / Z. E. Stine, Z. E. Walton, B. J. Altman, et al. *Cancer Discov.* 2015. Vol. 5, N 10. P. 1024–1039.
346. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies / P. A. Zuk, M. Zhu, H. Mizuno, et al. *Tissue Eng.* 2001. Vol. 7, N 2. P. 211–228.
347. Na Y. R., Je S., Seok S. H. Metabolic features of macrophages in inflammatory diseases and cancer. *Cancer Lett.* 2018. Vol. 413. P. 46–58.
348. NADPH oxidases are essential for macrophage differentiation / Q. Xu, S Choksi., J. Qum, et al. *J. Biol. Chem.* 2016. Vol. 291, N 38. P. 20030–20041.
349. Nagao K., Marakami A., Umeda M. Structure and function of $\Delta 9$ -fatty acid desaturase. *Chem. Pharm. Bull (Tokyo)*. 2019. Vol. 67, N 4. P. 327–332.
350. Nakashima M., Iohara K. Mobilized dental pulp stem cells for pulp regeneration: initiation of clinical trial. *J. Endod.* 2014. Vol. 40, N 4, suppl. P. 26–32.
351. Nature vs. nurture: defining the effects of mesenchymal stromal cell isolation and culture conditions on resiliency to palmitate challenge / L. Boland, A. J. Burand, D. T. Boyt, et al. *Front. Immunol.* 2019. Vol. 10. e1080.
352. Neuroprotective effects of human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells on periventricular leukomalacia-like brain injury in neonatal rats / C. Morioka, M. Komaki, A. Taki, et al. *Inflamm. Regen.* 2017. Vol. 37. e1.
353. Nielsen S. R., Schmid M. C. Macrophages as key drivers of cancer progression and metastasis. *Mediators Inflamm.* 2017. Vol. 2017. e.9624760.
354. Nikolaienko T. V., Kladnytska L. V., Garmanchuk L. V. Influence of allogeneic mesenchymal stem cells on metastatic potential and tumor-infiltrating lymphocytes. *Annals of Oncology.* 2014. Vol. 25, N 4. P. 1652.
355. Nitta T., Suzuki H. Thymic stromal cell subsets for T cell development. *Cell Mol. Life Sci.* 2016. Vol. 73, N 5. P. 1021–1037.

356. Ntambi J. M. Regulation of stearyl-CoA desaturase by polyunsaturated fatty acids and cholesterol. *J. Lipid Res.* 1999. Vol. 40. P. 1549–1558.
357. Oh S. A., Li M. O. TGF- β : guardian of T cell function. *J. Immunol.* 2013. Vol. 191, N 8. P. 3973–3979.
358. Ohigashi I, Kozai M, Takahama Y. Development and developmental potential of cortical thymic epithelial cells. *Immunol. Rev.* 2016. Vol. 271, N 1. P. 10–22.
359. Ohkoshi E., Umemura N. Induced overexpression of CD44 associated with resistance to apoptosis on DNA damage response in human head and neck squamous cell carcinoma cells. *Int. J. Oncol.* 2017. Vol. 50, N 2. P. 387–395.
360. Oleic acid increases synthesis and secretion of VEGF in rat vascular smooth muscle cells: role of oxidative stress and impairment in obesity / G. Doronzo, M. Viretto, C. Barale, et al. *Int. J Mol. Sci.* 2013. Vol. 14, N 9. P. 18861–18880.
361. Oloyo A. K., Ambele M. A., Pepper M. S. Contrasting views on the role of mesenchymal stromal/stem cells in tumour growth: a systematic review of experimental design. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2018. Vol. 1083. P. 103–124.
362. Origin-specific adhesive interactions of mesenchymal stem cells with platelets influence their behavior after infusion / L. Sheriff, A. Alanazi, L. S. Ward, et al. *Stem Cells.* 2018. Vol. 36, N 7. P. 1062–1074.
363. Owen M., Friedenstein A. J. Stromal stem cells: marrow-derived osteogenic precursors. *Ciba Found Symp.* 1988. Vol. 136. P. 42–60.
364. Palazon A., Tyrakis P. A. HIF-1 α /VEGF-A axis in cytotoxic T cells regulates tumor progression. *Cancer Cell.* 2017. Vol. 32, N 5. P. 669–683.
365. Paracrine IL-6 signaling mediates the effects of pancreatic stellate cells on epithelial-mesenchymal transition via Stat3/Nrf2 pathway in pancreatic cancer cells / Y. S. Wu, I. Chung, W.F. Wong, et al. *Biochim Biophys Acta Gen Subj.* 2017. Vol. 1861, N 2. P. 296–306.

366. Park B. H., Fikrig S. M., Smithwich E. M. Infection and nitrobluetetrazolium reduction by neutrophils; a diagnostic aid. *Lancet*. 1968. Vol. 11, N 2. P. 532–534.
367. Parys M., Kruger J. M., Yuzbasiyan-Gurkan V. Evaluation of immunomodulatory properties of feline mesenchymal stem cells. *Stem Cell Dev*. 2017. Vol. 26, N 10. P. 776–785.
368. Peripheral blood-derived mesenchymal stem cells demonstrate immunomodulatory potential for therapeutic use in horses / A. L. F. Longhini, T. E. Salazar, C. Vieira, et al. *PloS One*. 2019. Vol. 14, N 3. e0212642
369. Peruzzo R, Szabo I. Contribution of mitochondrial ion channels to chemo-resistancer in cancer cells. *Cancers (Basel)*. 2019. Vol. 11, N 6. pii: E761.
370. PGE2 maintains self-renewal of human adult stem cells via EP2-mediated autocrine signaling and its production is regulated by cell-to-cell contact / B. C. Lee, H. S. Kim, T. H. Shin, et al. *Sci. Rep*. 2016. Vol. 6. e26298.
371. Phagocytic activity of peritoneal macrophages under the influence of allogenic stem cells / L. V. Kladnytska, A. Y. Mazurkevych, O. I. Dzhus, et al. 4 th European Congress of immunology, Vienna, September 6-9 2015. 2015. P. D.07.07.
372. Phylogenetic distinction of iNOS and IDO function in mesenchymal stem cell-mediated immunosuppression in mammalian species / J. Su, X. Chen, Y. Huang, et al. *Cell Death Differ*. 2014. Vol. 21, N 3. P. 288–296.
373. Podestà MA, Remuzzi G, Casiraghi F. Mesenchymal stromal cells for transplant tolerance. *Front. Immunol*. 2019. Vol.10. e1287. doi: 10.3389/fimmu.2019.01287.
374. Poly-L-lysine prevents senescence and augments growth in culturing mesenchymal stem cells ex vivo / J. S. Heo, H. O. Kim, S. Y. Song, et al. *Biomed. Res. Int*. 2016. Vol. 2016. e8196078.
375. Positive selection of Wharton's jelly-derived CD105(+) cells by MACS technique and their subsequent cultivation under suspension culture

condition: A simple, versatile culturing method to enhance the multipotentiality of mesenchymal stem cells / F. Amiri, R. Halabian, M. Dehgan Harati, et al. Hematology. 2015. Vol. 20, N 4. P. 208–216.

376. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo / S. Gronthos, M. Mankani, J. Brahimi, et al. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 2000. Vol. 97. P. 13625–13630.

377. Potent in vitro chondrogenesis of CD105 enriched human adipose-derived stem cells / T. Jiang, W. Liu, X. Lv, et al. Biomaterials. 2010. Vol. 31, N 13. P. 3564–3571.

378. Potential role of mesenchymal stem cells (MSCs) in the breast tumour microenvironment: stimulation of epithelial to mesenchymal transition (EMT) / F. T. Martin, R. M. Dwyer, J. Kelly, et al. Breast Cancer Res Treat. 2010. Vol. 124. P. 317–326.

379. Pozarowski P., Darzynkiewicz Z. Analysis of cell cycle by flow cytometry. In: Methods in Molecular Biology. 2004. Vol. 281: Checkpoint Controls and Cancer, Volume 2: Activation and Regulation Protocols Edited by: Axel H. Schönthal © Humana Press Inc., Totowa, NJ. – P. 301–311.

380. Pro-Apoptotic Apoptosis Protease-Activating Factor 1 (Apaf-1) has a cytoplasmic localization distinct from Bcl-2 or Bcl-X_L / G. Hausmann, L. A. O'Reilly, R. van Driel, et al. J. Cell Biol. 2000. Vol. 149, N 3. P. 623–634.

381. Prockop D. J., Oh J. Y., Lee R. H. Data against a common assumption: xenogeneic mouse models can be used to assay suppression of immunity by human MSCs. Mol. Ther. 2017. Vol. 25, N 8. P. 1748–1756.

382. Production of canine mesenchymal stem cells from adipose tissue and their application in dogs with chronic osteoarthritis of the humeroradial joints / A. Guercio, P. Di Marco, S. Casella, et al. Cell Biol. Int. 2012. Vol. 36, N 2. P. 189–194.

383. Prolonged incubation with Metformin decreased angiogenic potential in human bone marrow mesenchymal stem cells / S. Montazersaheb, F. Kabiri, N. Sakiani, et al. *Biomed. Pharmacother.* 2018. Vol. 108. P. 1328–1337.

384. Prospective association of fatty acids in the de novo lipogenesis pathway with risk of type 2 diabetes: the Cardiovascular Health Study / W. Ma, J. H. Wu, Q. Wang, et al. *Am. J. Clin. Nutr.* 2015, Vol. 101. P. 153–163.

385. Prostaglandin E2 indicates therapeutic efficacy of mesenchymal stem cells in experimental traumatic brain injury / D. J. Kota, K. S. Prabhakara, N. Toledano-Furman, et al. *Stem Cells.* 2017. Vol. 35, N 5. P. 1416–1430.

386. Prostaglandin E₂ secreted from feline adipose tissue-derived mesenchymal stem cells alleviate DSS-induced colitis by increasing regulatory T cells in mice / J. H. An, W. J. Song, Q. Li, et al. *BMC Vet. Res.* 2018. Vol. 14, N 1. e354.

387. Prostaglandin EP2 receptors mediate mesenchymal stromal cell-neuroprotective effects on dopaminergic neurons / J. A. Parga, M. Garcia-Garrote, S. Martinez, et al. *Mol. Neurobiol.* 2018. Vol. 55, N 6. P. 4763–4776.

388. Protocol for isolation and enriched monolayer cultivation of neural precursor cells from mouse dentate gyrus / Babu H. A., Claasen J. H., Kannan S., et al. *Front. Neurosci.* 2011. Vol. 5. P. 89.

389. Radcliffe J. D., Czajka-Narins D. M., Imrhan V. Fatty acid composition of serum, adipose tissue, and liver in rats fed diets containing corn oil or cottonseed oil. *Plant Foods Human Nutr.* 2004. Vol. 59, N 2. P. 73–77.

390. Rani S., Ritter T. The exosome - a naturally secreted nanoparticle and its application to wound healing. *Adv Mater.* 2016. Vol. 28, N 27. P. 5542–5552.

391. Rashid M. A., Haque M., Akbar M. Role of polyunsaturated fatty acids and their metabolites on stem cell proliferation and differentiation. *Adv. Neurobiol.* 2016. Vol. 12. P. 367–380.

392. Regeneration of corneal epithelium with dental pulp stem cells using a contact lens delivery system / Kushnerev E., Shawcross S. G., Sothirachagan S., et al. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2016. Vol. 57, N 13. P. 5192–5199.

393. Relationship between stearyl-CoA desaturase activity and plasma triglycerides in human and mouse hypertriglyceridemia / A. D. Attie, R. M. Krauss, M. P. Gray-Keller, et al. *J. Lipid Res.* 2002. Vol. 43, N 11. P. 1899–1907.

394. Researching into the cellular shape, volume and elasticity of mesenchymal stem cells, osteoblasts and osteosarcoma cells by atomic force microscopy / D. Docheva, D. Padula, C. Popov, et al. *J. Cell Mol. Med.* 2008. Vol. 12, N 2. P. 537–552.

395. Restored in vivo-like membrane lipidomics positively influence in vitro features of cultured mesenchymal stromal/stem cells derived from human placenta / A. Chatgililoglu, M. Rossi, F. Alviano, et al. *Stem Cell Res. Ther.* 2017. Vol. 8, N 1. e31.

396. RHAMM/ERK interaction induces proliferative activities of cementifying fibroma cells through a mechanism based on the CD44-EGFR / H. Hatano, H. Shigeishi, Y. Kudo, et al. *Lab. Invest.* 2011. Vol. 91, N 3. P. 379–391.

397. Rhee K. J., Lee J. I., Eom Y. Mesenchymal stem cell-mediated effects of tumor support or suppression. *Int. J. Mol. Sci.* 2015. Vol. 16, N 12. P. 30015–30033.

398. Ringe S. M., Sullivan F. J., Glynn S. A. Mesenchymal stem cells: key players in cancer progression. *Mol. Cancer.* 2017. Vol. 16, N 1. P. 31.

399. Romano M., Patruno S., Pomilio A., Recchiuti A. Concise review: pro-resolving lipid mediators and receptors in stem cell biology. *Stem Cells Transl. Med.* 2019. Vol. 8, N 10. P. 992–998.

400. Røsland G. V., Svendsen A., Torsvik A. Long-term cultures of bone marrow-derived human mesenchymal stem cells frequently undergo spontaneous malignant transformation. *Cancer Res.* 2009. Vol. 69, N 13. P. 5331–5339.

401. Saalbach A., Anderegg U. Thy-1: more than a marker for mesenchymal stromal cells. *FASEB J.* 2019. Vol. 33, N 6. P. 6689–6696.
402. Safety and efficacy of adult stem cell therapy for acute myocardial infarction and ischemic heart failure (Safecell Heart): a systematic review and meta-analysis / M. M. Lalu, S. Mazzeo, J. Zlepzig, et al. *Stem Cells Transl. Med.* 2018. Vol. 7, N 12. P. 857–866.
403. Same or not the same? Comparison of adipose tissue-derived versus bone marrow-derived mesenchymal stem and stromal cells / M. Strioga, S. Viswanathan, A. Darinskas, et al. *Stem Cell. Dev.* 2012. Vol. 21, N 14. P. 2724–2752.
404. Sato W., Aranami T., Yamamura T. Cutting edge: human Th17 cells are identified as bearing CCR2⁺CCR5⁻phenotype. *J. Immunol.* 2007. Vol. 178: P. 7525–7529.
405. Schonfeld P., Wojtczak L. Short- and medium-chain fatty acids in energy metabolism: the cellular perspective. *J. Lipid Res.* 2016. Vol. 57, N 6. P. 943–954.
406. Selection of highly osteogenic and chondrogenic cells from bone marrow stromal cells in biocompatible polymer-coated plates / G. Liu, K. Iwata, T. Ogasawara, et al. *J. Biomed. Mater. Res. A.* 2010. Vol. 92, N 4. P. 1273–1282.
407. Selective elimination of human pluripotent stem cells by an oleate synthesis inhibitor discovered in a high-throughput screen / U. Ben-David, Q. . Gan, T. Golan-Lev, et al. *Cell Stem Cell.* 2013. Vol. 12, N 2. P. 167–179.
408. Serum starvation-induces down-regulation of Bcl-2/Bax confers apoptosis in tongue coating-related cells in vitro / Y. Huang, Z. Fu, W. Dong, et al. *Mol. Med. Rep.* 2018. Vol. 17, N 4. P. 5057–5064.
409. Shi Y., Du L., Lin L. Tumour-associated mesenchymal stem/stromal cells: emerging therapeutic targets. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2017. Vol. 16, N 1. P. 35–52.

410. Shimomura A., Iizuka-Kogo A., Yamamoto N. lower volume culture method for obtaining a larger yield of neuron-like cells from mesenchymal stem cells. *Med. Mol. Morphol.* 2016. Vol. 49, N 2. P. 119–126.
411. Shinagawa K., Kitadai Y., Tanaka M. Mesenchymal stem cells enhance growth and metastasis of colon cancer. *Int. J. Cancer.* 2010. Vol. 127, N 10. P. 2323–2333.
412. Small molecules enhance neurogenic differentiation of dental-derived adult stem cells / B. C. Heng, S. Jiang, B. Yi, et al. *Arch. Oral. Biol.* 2019. Vol. 102. P. 26–38.
413. Small molecules from natural products targeting the Wnt/ β -catenin pathway as a therapeutic strategy / D. Liu, L. Chen, H. Zhao, et al. *Biomed. Pharmacother.* 2019. Vol. 117. e108990.
414. Soluble factors-mediated immunomodulatory effects of canine adipose tissue-derived mesenchymal stem cells / J. W. Kang, K. S. Kang, H. C. Koo, et al. *Stem Cells Dev.* 2008. Vol. 17, N 4. P. 681–693.
415. Soufi A. Cycling through developmental decisions: how cell cycle dynamics control pluripotency, differentiation and reprogramming / A. Soufi, S. Dalton // *Development.* – 2016. – №143(23). – P.4301-4311.
416. Spleen functional state in mice C57BL/6 on influence of allogeneic bone marrow derived mesenchymal stem cells / L. V. Kladnytska, A. I. Mazurkevych, S. V. Velychko, et al. Матеріали міжнародної науково-практичної конференції «Актуальні проблеми фізіології тварин» 3-5 травня 2018, м. Чернігів. 2018. С. 52.
417. Spontaneous human adult stem cell transformation / D. Rubio, J. Garcia-Castro, M. C. Martín, et al. *Cancer Res.* 2005. Vol. 65, N 8. P. 3035–3038.
418. Sprent J., Surh C. D. Interleukin 7, maestro of the immune system. *Semin. Immunol.* 2012. Vol. 24, N 3. P. 149–150.
419. Stearoyl-CoA desaturase promotes liver fibrosis and tumor development in mice via a Wnt positive-signaling loop by stabilization of low-

density lipoprotein-receptor-related proteins 5 and 6 / K. K. Y. Lai, S. M. Kweon, F. Chu, et al. *Gastroenterology*. 2017. Vol. 152, N 6. P. 1477–1491.

420. Spontaneous tumors in aging colonies of C57BL/6J mice / A. Schile, S. Dion, D. Imai-Leonard, R. Doty. *AACR Annual Meeting*. 2018. Vol. 78, N 13. Abs. 5113.

421. Stojanović S., Najman S. The effect of conditioned media of stem cells derived from lipoma and adipose tissue on macrophages' response and wound healing in indirect co-culture system in vitro. *Int. J. Mol. Sci.* 2019. Vol. 20, N 7. pii: E1671.

422. Suppression of canine dendritic cell activation/maturation and inflammatory cytokine release by mesenchymal stem cells occurs through multiple distinct biochemical pathways / W. H. Wheat, L. Chow, J. N. Kurihara, et al. *Stem Cell Dev.* 2017. Vol. 26, N 4. P. 249–262.

423. Suppression of PTBP1 signaling is responsible for mesenchymal stem cell induced invasion of low malignancy cancer cells / X. Fu, F. Xie, F. Gong, et al. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Res.* 2018. Vol. 1865, N 11, Pt A. P. 1552–1565.

424. Systematic bioinformatic analysis of expression levels of 17,330 human genes across 9,783 samples from 175 types of healthy and pathological tissues / S. Kilpinen, R. Autio, K. Ojala, et al. *Genome Biol.* 2008. Vol. 9, N 9. R139.

425. Taher M. Y., Davies D. M., Maher J. The role of the interleukin (IL)-6/IL-6 receptor axis in cancer. *Biochem. Soc. Trans.* 2018. Vol. 46, N 6. P. 1449–1462.

426. Tang Y., Yu P., Cheng L. Current progress in the derivation and therapeutic application of neural stem cells. *Cell Death Dis.* 2017. Vol. 8, N 10. e3108.

427. Taniguchi H., Suzuki Y., Natori Y. The evolving landscape of cancer stem cells and ways to overcome cancer heterogeneity. *Cancers (Basel)*. 2019. Vol. 11, N 4. pii: E532.
428. Targeting adenosine in cancer immunotherapy to enhance T-cell function / S. Vigano, D. Alatzoglou, M. Irving, et al. *Front. Immunol.* 2019. Vol. 10. e925.
429. Targeting the epidermal growth factor receptor can counteract the inhibition of natural killer cell function exerted by colorectal tumor-associated fibroblasts / D. Costa, R. Venè, R. Benelli, et al. *Front. Immunol.* 2018. Vol. 9. e1150.
430. Teshima T., H. Matsumoto, Koyama H. Soluble factors from adipose tissue-derived mesenchymal stem cells promote canine hepatocellular carcinoma cell proliferation and invasion. *PLoS One*. 2018. Vol. 13, N 1. e0191539.
431. The (in) auspicious role of mesenchymal stromal cells in cancer: be it friend or foe / S. Kidd, E. Spaethm, A. Klopp, et al. *Cytotherapy*. 2008. Vol. 10, N 7. P. 657–667.
432. The cell cycle in stem cell proliferation, pluripotency and differentiation / L. Liu, W. Michowski, A. Kolodziejczyk, P. Sicinski. *Nat. Cell Biol.* 2019. Vol. 21. N 9: P.1060–1067.
433. The chemical biology of apoptosis: Revisited after 17 years / S. Yang, Y. Mao, H. Zhang, et al. *Eur. J. Med. Chem.* 2019. Vol. 177. P. 63–75.
434. The differentiation of skin mesenchymal stem cells towards a Schwann cell phenotype: impact of Sigma-1 receptor activation / L. Saulite, E. Vavers, L. Zvejniece, et al. *Mol. Neurobiol.* 2018. Vol. 55, N 4. P. 2840–2850.
435. The effect of allogenic mesenchymal stem cell transplantation on the activity of succinate dehydrogenase of recipient liver mitochondria / L. V. Kladnytska, A. Y. Mazurkevych, V. A. Tomchuk, et al. Thesis of conference “Modern Aspects of Biochemistry and Biotechnology-2019”, 2019. March 21-22 Kyiv, Ukraine. 2019. P. 4.

436. The effect of mesenchymal stem cells derived microvesicles on the treatment of experimental CCL4 induced liver fibrosis in rats / D. Sabry, A. Mohamed, M. Monir, H. A. Ibrahim. *Int. J. Stem Cells*. 2019. Vol. 12, N 3. P. 400–409.

437. The effects of topical mesenchymal stem cell transplantation in canine experimental cutaneous wounds / J. W. Kim, J. H. Lee, Y. S. Lyoo, et al. *Vet. Dermatol*. 2013. Vol. 24, N 2. P. 242–253.

438. The growth inhibitory effect of mesenchymal stem cells on tumor cells in vitro and in vivo / Y. R. Lu, Y. Yuan, X. J. Wang, et al. *Cancer Biol. Ther.* 2008. Vol. 7, N 2. P. 245–251.

439. The holy grail of orthopedic surgery: mesenchymal stem cells-their current uses and potential applications / R. Berebichez-Fridman, R. Gómez-García, J. Granados-Montiel, et al. *Stem Cells Int*. 2017. Vol. 2017. e2638305.

440. The hypoxia conditioned mesenchymal stem cells promote hepatocellular carcinoma progression through YAP mediated lipogenesis reprogramming / Y. Liu, H. Ren, Y. Zhou, et al. *J. Exp. Clin. Cancer Res*. 2019. Vol. 38, N 1. P. 228.

441. The immunomodulatory activity and mechanism of docosahexenoic acid (DHA) on immunosuppressive mice models / L. Han, H. Lei, Z. Tian, et al. *Food Funct*. 2018. Vol. 9, N 6. P. 3254–3263.

442. The influence of allogeneic bone marrow derived mesenchymal stem cells on indicators of functional state of immune organs in mice C57Bl/6 / L. V. Kladnytska, A. I. Mazurkevych, S. V. Velychko, et al. *Науковий вісник Національного університету біоресурсів і природокористування України. Серія: Ветеринарна медицина*. 2018. N 285. С. 165–175

443. The influence of transplanted allogenic bone marrow and adipose derived mesenchymal stem cells on the immune organs of C57Bl/6 mice / L. V. Kladnytska, A. Y. Mazurkevych, V. B. Danilov, et al. *Exp. Oncology*. 2018. Vol. 40, N 2. P. 166–167.

444. The inhibitory effect of mesenchymal stem cell on blood-brain barrier disruption following intracerebral hemorrhage in rats: contribution of TSG-6 / M. Chen, X. Li, X. Zhang, et al. *J. Neuroinflammation*. 2015 Vol. 12. e61.
445. The significant role of interleukin-6 and its signaling pathway in the immunopathogenesis and treatment of breast cancer / A. Masjedi, V. Hashemi, M. Hojjat-Farsang, et al. *Biomed. Pharmacother*. 2018. Vol. 108. P. 1415–1424.
446. The spleen may be an important target of stem cell therapy for stroke / Z. Wang, D. He, Y. Y. Zeng et al. *J. Neuroinflammation*. 2019. Vol. 16, N 1. e20.
447. The system influence of allogeneic adipose tissue derived mesenchymal stem cells on the functional state of immune organs / L. V. Kladnytska, A. I. Mazurkevych, M. O. Maluk, et al. *Науковий вісник Львівського національного університету ветеринарної медицини імені С. З. жицького*. 2018. Т. 20, N 83. С. 347–351.
448. Therapeutic potential of mesenchymal stromal cells in a mouse breast cancer metastasis model / B. Sun, K. H. Roh, J. R. Park, et al. *Cytotherapy*. 2009. Vol. 11, N 3. P. 289–298.
449. Thy-1 (CD90) promotes bone formation and protects against obesity / A. K. Picke, G. M. Campbell, M. Blüher, et al. *Sci. Transl. Med*. 2018. Vol. 10, N 453. pii: eaao6806.
450. Timaner M., Tsai K. K., Shaked Y. The multifaceted role of mesenchymal stem cells in cancer. *Semin. Cancer Biol*. 2019. pii: S1044-579X(19)30135-X
451. TOOTH (The Open study of dental pulp stem cell Therapy in Humans): Study protocol for evaluating safety and feasibility of autologous human adult dental pulp stem cell therapy in patients with chronic disability after stroke / A. Nagpal, K. L. Kremer, M. A., Hamilton-Bruce et al. *Int. J. Stroke*. 2016. Vol. 11, N 5. P. 575–585.

452. Torres V. I., Godoy J. A., Inestrosa N. C. Modulating Wnt signaling at the root: Porcupine and Wnt acylation. *Pharmacol. Ther.* 2019. Vol. 198. P. 34–45.
453. Torsvik A., Bjerkvig R. Mesenchymal stem cell signaling in cancer progression. *Cancer Treat. Rev.* 2013. Vol. 39, N 2. P. 180–188.
454. Transfer of mitochondria from astrocytes to neurons after stroke / K. Hayakawa, E. Esposito, X. Wang, et al. *Nature*. 2016. Vol. 535, N 7613. P. 551–515.
455. Tropism of mesenchymal stem cell toward CD133⁺ stem cell of glioblastoma in vitro and promote tumor proliferation in vivo / L. F. Pavon, T. . Sibov, A. V. de Souza, et al. *Stem Cell Res. Ther.* 2018. Vol. 9, N 1. P. 310.
456. Tsubakihara Y., Moustakas A. Epithelial-mesenchymal transition and metastasis under the control of transforming growth factor β . *Int. J. Mol. Sci.* 2018. Vol. 19, N11. P. 3672.
457. Tsujimoto Y., Shimizu S. Bcl-2 family: life-or-death switch. *FEBS Letters*. 2000. Vol. 466, N 1. P.6–10.
458. Tumorigenicity evaluation of umbilical cord blood - derived mesenchymal stem cells / S. J. Park, H. J. Kim, W. Kim, et al. *Toxicol. Res.* 2016. Vol. 32. P. 251–258.
459. Turei D., Papp D., Faztkas D. NRF2-ome: an integrated web resource to discover protein interaction and regulatory networks of NRF2. *Oxid. Med. Cell. Long.* 2013. Vol. 2013. e737591.
460. Umbilical cord-derived mesenchymal stem cells instruct monocytes towards an IL10-producing phenotype by secreting IL6 and HGF / Y. Deng, Y. Zhang, L. Ye, et al. *Sci. Rep.* 2016. Vol. 6. P. 37566.
461. Unsaturated fatty acids induce mesenchymal stem cells to increase secretion of angiogenic mediators / A. N. Smith, L. A. Muffley, A. N. Bell, et al. *J. Cell Physiol.* 2012. Vol. 227, N 9. P. 3225–3233.

462. Upregulation of PTEN in glioma cells by cord blood mesenchymal stem cells inhibits migration via downregulation of the PI3K/Akt pathway / V. R. Dasari, K. Kaur, K. K. Velpula, et al. PLoS One. 2010. Vol. 5, N 4. e10350.
463. Using dental pulp stem cells for stroke therapy / M. R. Gancheva, K. L. Kremer, S. Gronthos, S. A. Koblar. Front. Neurol. 2019. Vol. 10. e422.
464. van Balkom B. W. M., Gremmels H., Giebel B. Proteomic signature of mesenchymal stromal cell-derived small extracellular vesicles. Proteomics. 2019. Vol. 19, N 1–2. e1800163.
465. Varzideh F., Mahmoudi E., Pahlavan S. Coculture with noncardiac cells promoted maturation of human stem cell-derived cardiomyocyte microtissues. J. Cell Biochem. 2019. Vol. 120, N 10. P. 16681–16691.
466. Vega S. L., Arvind V., Mishra P. Substrate micropatterns produced by polymer demixing regulate focal adhesions, actin anisotropy, and lineage differentiation of stem cells. Acta Biomater. 2018. Vol. 76. P. 21–28.
467. VEGF expression by mesenchymal stem cells contributes to angiogenesis in pancreatic carcinoma / B. Beckermann, G. Kallifatidis, A. Groth, et al. Br. J. Cancer. 2008. Vol. 99. P. 622–631.
468. VEGF secreted by mesenchymal stem cells mediates the differentiation of endothelial progenitor cells into endothelial cells via paracrine mechanisms / Q. Ge, H. Zhang, J. Hou, et al. Mol. Med. Rep. 2018. Vol. 17, N 1. P. 1667–1675.
469. Vlashi E., Pajonk F. Cancer stem cells, cancer cell plasticity and radiation therapy. Semin. Cancer Biol. 2015. e28–35.
470. Wang M., Su P. The role of the Fas/FasL signaling pathway in environmental toxicant-induced testicular cell apoptosis: an update. Syst. Biol. Reprod. Med. 2018. Vol. 64, N 2. P. 93–102.
471. Wang S. W., Sun Y. M. The IL-6/JAK/STAT3 pathway: potential therapeutic strategies in treating colorectal cancer (Review). Int. J. Oncol. 2014. Vol. 44, N 4. P. 1032–1040.

472. Wang Y., Tjandra N. Structural insights of tBid, the caspase-8-activated Bid, and its BH₃ domain. *J. Biol. Chem.* 2013. Vol. 288, N 50. P. 35840–35851.
473. Webb T. L., Quimby J. M., Dow S. W. *In vitro* comparison of feline bone marrow-derived and adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. *J. Feline Med. Surg.* 2012. Vol. 14. P. 165–168.
474. Weiss A. R. R., Dahlke M. H. Immunomodulation by mesenchymal stem cells (MSCs): mechanisms of action of living, apoptotic, and dead MSCs. *Front. Immunol.* 2019. Vol. 10. P. 1191.
475. Wilson A., Webster A., Genever P. Nomenclature and heterogeneity: consequences for the use of mesenchymal stem cells in regenerative medicine. *Regen. Med.* 2019. Vol. 14, N 6. P. 595–611.
476. Wnt/ β -catenin signaling pathway safeguards epigenetic stability and homeostasis of mouse embryonic stem cells / I. Theka, F. Sottile, M. Cammisa, et al. *Sci. Rep.* 2019. Vol. 9, N 1. P. 948.
477. Woodall B. P., Gustafsson A. B. Mesenchymal stem cell-mediated autophagy inhibition. *Circ. Res.* 2018. Vol. 123, N 5. P. 518–520.
478. Wu S., Lu H., Bai Y. Nrf2 in cancers: A double-edged sword. *Cancer Med.* 2019. Vol. 8, N 5. P. 2252–2267.
479. Xu C., Fu F., Zhang S. Mesenchymal stem cells maintain the microenvironment of central nervous system by regulating the polarization of macrophages/microglia after traumatic brain injury. *Int. J. Neurosci.* 2017. Vol. 127, N 12. P. 1124–1135.
480. Yaghooti H., Mohammadtaghvaei N, Mahboobnia K. Effects of palmitate and astaxanthin on cell viability and proinflammatory characteristics of mesenchymal stem cells. *Int. Immunopharmacol.* 2019. Vol. 68. P. 164–170.
481. Yang R., Xu X. Isolation and culture of neural crest stem cells from human hair follicles. *Methods Mol. Biol.* 2016. Vol. 1453. P. 49–55.

482. Yang Y. Z., Zhang X. Y., Li J. MSC senescence-related signaling pathway - review. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi*. 2018. Vol. 26, N 1. P. 307–310.
483. Yianni V., Sharpe P. T. Perivascular-derived mesenchymal stem cells. *J. Dent. Res*. 2019. Vol. 98, N 10. P. 1066–1072.
484. Yuzefovych L., Wilson G., Rachek L. Different effects of oleate vs. palmitate on mitochondrial function, apoptosis, and insulin signaling in L6 skeletal muscle cells: role of oxidative stress. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab*. 2010. Vol. 299, N 6. E 1096–E1105.
485. Zhang D. Y., Wang H. J., Tan Y. Z. Wnt/ β -catenin signaling induces the aging of mesenchymal stem cell through the DNA damage response and the p53/p21 pathway. *PLoS One*. 2011. Vol. 6, N 6. e0021397.
486. Zhang Q., Xiang W., Yi D. Y. Current status and potential challenges of mesenchymal stem cell-based therapy for malignant gliomas. *Stem Cell Res. Ther*. 2018. Vol. 9, N. 1. P. 228.
487. Zhang X., Goncalves R., Mosser D. The isolation and characterization of murine macrophages. *Curr. Protoc. Immunol*. 2008. Chapter 14. P.1411–1414.

ДОДАТКИ

Додаток А

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 C 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 C57Bl/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 C57BL/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 C57Bl/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 C57Bl/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 кота. Наукові доповіді Національного університету біоресурсів і природокористування України. 2016. № 61. *(Здобувачем виконано культивування клітин, підготовлено зразки культури стовбурових клітин кісткового мозку кота та визначено вміст жирних кислот).*

10. Кладницька Л. В., Мазуркевич А. Й., Величко С. В. Метод отримання культури нейральних стовбурових клітин кота. 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 природо-користування 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, ядро-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. **Кладницкая 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., Кладницкая 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) А61 К35/30 (2015.01) А61 Р25/00. 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. K., 2013. С. 94. (Здобувачем порівняно способи обробки та культивування адгезивної фракції моноклеарних 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 мишей 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 природо-користування 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 порівно 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 Iu. O., Bokotko R. R., Dovgopol N. I., Velychko V. S., Ryzukova 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. Р. 14. *(Здобувачем досліджено активність сукцинатдегідрогенази мітохондрій печінки мишей за впливу стовбурових клітин).*

Додаток Б 1

«Затверджую»

Проректор з наукової роботи
Одеського державного аграрного
університету



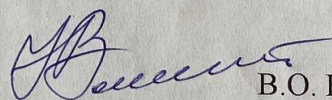
А К Т

**про впровадження результатів
докторської дисертаційної роботи в навчальний процес**

Даним актом стверджується, що результати дисертаційної роботи **Кладницької Лариси Володимирівни** на тему: **«Морфофункціональні властивості стовбурових клітин та їх вплив на пухлинний процес»**, представленої на здобуття наукового ступеня доктора ветеринарних наук зі спеціальності 16.00.02 «Патологія, онкологія і морфологія тварин», впроваджено в навчальну програму при викладанні дисципліни «Фізіологія тварин» стосовно функціональних і морфологічних властивостей стовбурових клітин залежно від пасажу культивування, на кафедрі фізіології, біохімії та мікробіології у Одеському державному аграрному університеті при підготовці фахівців зі спеціальності 211 «Ветеринарна медицина».


Затверджено на засіданні кафедри фізіології, біохімії та мікробіології (протокол № 3 від 21 жовтня 2019 р.).

Завідувач кафедри фізіології, біохімії
та мікробіології, канд. вет. н., доцент


В.О. Найда

Додаток Б 2


«ЗАТВЕРДЖУЮ»
В.о. директора Інституту біології тварин НААН,
дільськогосподарських наук, професор

 М.М.Шаран
10 2019 р.

Акт
впровадження результатів
докторської дисертаційної роботи в наукову діяльність

1. Даним актом стверджується, що результати дисертаційної роботи **Клавинської Дариси Володимирівни** на тему: «Морфофункціональні властивості стовбурових клітин та їх вплив на пухлинний процес», що представлена на здобуття наукового ступеня доктора ветеринарних наук зі спеціальності 16.04.02 «Патологія, онкологія і морфологія тварин», використовуються у наукових дослідженнях лабораторії екологічної фізіології та якості продукції Інституту біології тварин НААН.

2. Інформаційний лист щодо результатів досліджень за темою дисертаційної роботи Клавинської Д.В. розглянуто та схвалено на засіданні лабораторії екологічної фізіології та якості продукції Інституту біології тварин НААН (протокол № 28 від 22.10.2019).

Завідувач лабораторії екологічної
фізіології та якості продукції
Д. вет. н., с.н.с.

Ковальчук І. І.

ЗАТВЕРДЖУЮ :
Перший проректор
з наукової роботи,



Д.М. Онопрієнко
« 09 » 09 2019р.

ПОГОДЖЕНО:

Проректор
з наукової роботи ДДАЕУ,
д. б. н., професор

Ю.І. Грипан
« 18 » 09 2019р.

А К Т
про впровадження результатів
докторської дисертаційної роботи в навчальний процес

Даним актом стверджується, що результати дисертаційної роботи **Кладницької Лариси Володимирівни** на тему: **«Морфофункціональні властивості стовбурових клітин та їх вплив на пухлинний процес»**, представленої на здобуття наукового ступеня доктора ветеринарних наук зі спеціальності 16.00.02 «Патологія, онкологія і морфологія тварин», впроваджено у навчальну програму при викладанні дисципліни **«Біохімія тварин»** стосовно особливостей вмісту жирних кислот у ліпідах стовбурових клітин різного походження, та їх вплив на активність сукцинатдегідрогенази мітохондрій печінки. **«Фізіологія тварин»** стосовно функціональних властивостей, перебігу клітинного циклу стовбурових клітин залежно від пасажу культивування, **«Патологічна фізіологія»** стосовно впливу стовбурових клітин на пухлинний процес на кафедрі фізіології та біохімії сільськогосподарських тварин у Дніпровському державному аграрно-економічному університеті при підготовці фахівців зі спеціальності 211 **«Ветеринарна медицина»**.

Затверджено на засіданні кафедри фізіології та біохімії сільськогосподарських тварин (протокол № 2 від 18.09. 2019р.).

Декан факультету ветеринарної медицини, к.вет.н., доцент

І.А. Бібен

Завідувач кафедри фізіології та біохімії с.-г. тварин, к.б.н., професор

Л.М. Степченко

Додаток Б 4

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Проректор з навчальної роботи
Харківської державної
зооветеринарної академії

Хмель М.М.

«22» жовтня 2019 р.

**Акт
впровадження результатів
докторської дисертаційної роботи у навчальний процес**

Даним актом стверджується, що результати дисертаційної роботи **Кладницької Лариси Володимирівни** на тему: **«Морфофункціональні властивості стовбурових клітин та їх вплив на пухлинний процес»**, представленої на здобуття наукового ступеня доктора ветеринарних наук зі спеціальності 16.00.02 «Патологія, онкологія і морфологія тварин», впроваджено у навчальну програму при викладанні дисципліни «Патофізіологія тварин» стосовно перебігу пухлинного процесу за впливу стовбурових клітин, «Фізіологія тварин» стосовно функціональних і морфологічних властивостей стовбурових клітин залежно від пасажу культивування на кафедрі нормальної і патологічної фізіології тварин Харківської державної зооветеринарної академії при підготовці фахівців зі спеціальності 211 «Ветеринарна медицина».

Затверджено на засіданні кафедри нормальної і патологічної фізіології тварин (протокол № 2 від 22 жовтня 2019 р.).

**Завідувач кафедри нормальної і
патологічної фізіології
Харківської державної
зооветеринарної академії, доктор
ветеринарних наук, професор**

Жукова І. О.

Додаток Б 5

ЗАТВЕРДЖУЮ:

Перший проректор

Сумського НАУ,

д. ю. н., професор

М. П. Курило



2019 р

Акт

впровадження результатів

докторської дисертаційної роботи в навчальний процес

Даним актом стверджується, що результати дисертаційної роботи **Кладницької Лариси Володимирівни** на тему: **«Морфофункціональні властивості стовбурових клітин та їх вплив на пухлинний процес»**, представленої на здобуття наукового ступеня доктора ветеринарних наук зі спеціальності 16.00.02 «Патологія, онкологія і морфологія тварин», впроваджено у навчальну програму при викладанні дисципліни «Фізіологія тварин» стосовно функціональних і морфологічних властивостей стовбурових клітин залежно від пасажу культивування, «Патофізіологія тварин» стосовно перебігу пухлинного процесу за впливу стовбурових клітин на кафедрі анатомії, нормальної та патологічної фізіології тварин у Сумському національному аграрному університеті при підготовці фахівців зі спеціальності 211 «Ветеринарна медицина».

Затверджено на засіданні кафедри анатомії, нормальної та патологічної фізіології тварин (протокол № 18 від 07.10.19 р.).

Погоджено:

Проректор з науково-педагогічної
та навчальної роботи СНАУ

В. М. Жмайлов

Проректор з наукової роботи СНАУ

д. е. н., професор

Ю. І. Данько

Декан факультету ветеринарної
медицини

О. Л. Нечипоренко

Завідувач кафедри анатомії, нормальної
та патологічної фізіології тварин,

д. вет. н., професор

М. Д. Камбур

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Проректор з наукової роботи
ІННУВМ ім. С.З. Гжицького
Професор О.М. Федель
2019 р.



АКТ

вировалження результатів докторської дисертаційної роботи в навчальний процес

Даним актом стверджується, що результати дисертаційної роботи Кладивської Лариси Володимирівни на тему: «Морфофункціональні властивості стовбурових клітин та їх вплив на пухлинний процес», представлені на здобуття наукового ступеня доктора ветеринарних наук зі спеціальності 16.00.02 «Патологія, онкологія і морфологія тварин», впроваджено у навчальну програму при викладанні дисципліни «Патологія тварин» стосовно впливу стовбурових клітин на пухлинний процес, «Фізіологія тварин» стосовно функціональних і морфологічних властивостей стовбурових клітин залежно від пасажу культивування на кафедрі нормальної та патологічної фізіології імені С.В. Стояновського Львівського національного університету ветеринарної медицини та біотехнологій імені С.З. Гжицького при підготовці фахівців зі спеціальності 211 «Ветеринарна медицина».

Затверджено на засіданні кафедри нормальної та патологічної фізіології імені С.В. Стояновського (протокол № 4 від 03.10.2019 р.).

Завідувач кафедри нормальної та
патологічної фізіології імені С.В. Стояновського,
д. вет. н., професор

Додаток Б 7

«Затверджую»

Проректор з наукової та
інноваційної роботи
Білоцерківського національного
агарного університету, професор
О.М. Варченко



2019

р.

А К Т

про впровадження результатів
докторської дисертаційної роботи в навчальний процес

Даним актом стверджується, що результати дисертаційної роботи **Кладницької Лариси Володимирівни** на тему: **«Морфо-функціональні властивості стовбурових клітин та їх вплив на пухлинний процес»**, представленої на здобуття наукового ступеня доктора ветеринарних наук зі спеціальності 16.00.02 «Патологія, онкологія і морфологія тварин», впроваджено у навчальну програму при викладанні дисципліни «Патофізіологія тварин» стосовно перебігу пухлинного процесу за впливу стовбурових клітин, «Фізіологія тварин» стосовно функціональних і морфологічних властивостей стовбурових клітин залежно від пасажу культивування, на кафедрі нормальної та патологічної фізіології у Білоцерківському національному агарному університеті при підготовці фахівців зі спеціальності 211 «Ветеринарна медицина».

Затверджено на засіданні кафедри нормальної та патологічної фізіології (протокол № 2 від 24.08.19).

Професор кафедри нормальної
та патологічної фізіології тварин,
доктор вет. наук

М.П. Ніщенко

Додаток В 1



