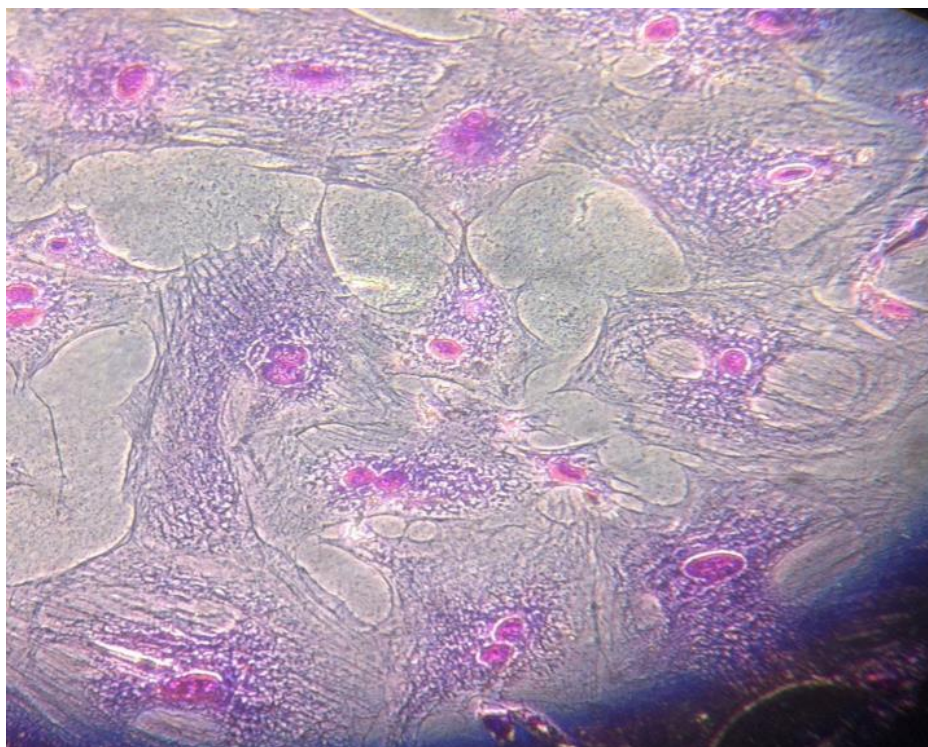


**МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ**  
**НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ БІОРЕСУРСІВ І**  
**ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ УКРАЇНИ**

**Л. В. КЛАДНИЦЬКА, А. Й. МАЗУРКЕВИЧ,**  
**С. В. ВЕЛИЧКО, Р. Р. БОКОТЬКО, Т. Л. САВЧУК**

**ВПЛИВ МЕЗЕНХІМНИХ СТОВБУРОВИХ**  
**КЛІТИН НА ПУХЛИННИЙ ПРОЦЕС НА**  
**МОДЕЛІ МЕТАСТАЗУЮЧОЇ КАРЦИНОМИ**  
**ЛЕГЕНІ ЛЬЮЇС**

**МОНОГРАФІЯ**



**Київ – 2021**

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

**КЛАДНИЦЬКА Л. В.**, доктор ветеринарних наук, доцент, доцент кафедри біохімії і фізіології тварин імені академіка М.Ф.Гулого Національного університету біоресурсів і природокористування України,;

**МАЗУРКЕВИЧ А. Й.**, доктор ветеринарних наук, академік, професор кафедри хірургії і патофізіології тварин імені академіка М. О. Поваженка Національного університету біоресурсів і природокористування України, академік Академії наук вищої освіти України;

**ВЕЛИЧКО С. В.**, кандидат ветеринарних наук, головний лікар клініки ветеринарної медицини “WSW clinic” міста Києва

**БОКОТЬКО Р. Р.**, кандидат ветеринарних наук, старший викладач, старший викладач кафедри хірургії і патофізіології тварин імені академіка М. О. Поваженка Національного університету біоресурсів і природокористування України,

**САВЧУК Т.Л.**, кандидат ветеринарних наук, старший викладач, старший викладач кафедри хірургії і патофізіології тварин імені академіка М. О. Поваженка Національного університету біоресурсів і природокористування України,

**ВПЛИВ МЕЗЕНХІМНИХ СТОВБУРОВИХ  
КЛІТИН НА ПУХЛИННИЙ ПРОЦЕС НА  
МОДЕЛІ МЕТАСТАЗУЮЧОЇ КАРЦИНОМИ  
ЛЕГЕНІ ЛЬЮЇС****МОНОГРАФІЯ****Київ – 2021**

ББК 48

УДК 636.6:612:546.289:549.23

Рецензенти:

**Горальський Леонід Петрович** – доктор ветеринарних наук, професор, академік Академії наук вищої освіти України. завідувач кафедри анатомії і гістології Поліського національного університету

**Мельник Олег Петрович** – доктор ветеринарних наук, професор, академік Академії наук вищої освіти України. завідувач кафедри анатомії, гістології і патоморфології тварин ім. акад. В. Г. Касяненка НУБіП України

**Салата Володимир Зіновійович** – доктор ветеринарних наук, професор, професор кафедри ветеринарно-санітарного інспектування Львівського національного університету ветеринарної медицини та біотехнологій ім. С. З. Гжицького, академік Академії наук вищої освіти України.

**Рекомендовано до друку вченою радою Національного університету біоресурсів і природокористування України, протокол № 4, від «23» листопада 2021 р.**

**ВПЛИВ МЕЗЕНХІМНИХ СТОВБУРОВИХ КЛІТИН НА ПУХЛИННИЙ ПРОЦЕС НА МОДЕЛІ МЕТАСТАЗУЮЧОЇ КАРЦИНОМИ ЛЕГЕНІ ЛЬЮЇС: Монографія / Л. В. КЛАДНИЦЬКА, А. Й. МАЗУРКЕВИЧ, С. В. ВЕЛИЧКО, Р. Р. БОКОТЬКО, Т. Л. САВЧУК – К.: Видавничий центр НУБіП України, 2021. – 245 с. (Анотації українською, англійською та російською мовами).**

Монографію присвячено результатам вивчення системного впливу мезенхімних стовбурових клітин на пухлинний процес на моделі метастазуючої карциноми легені Льюїс. Уперше доведено, що за системного впливу алогенних мезенхімних стовбурових клітин у тварин-реципієнтів збільшується маса первинної пухлини, загальний об'єм метастазів, кількості анеуплоїдів у первинній пухлині та їх кількості серед клітин проліферативного пулу, знижується кількість клітин в стані апоптозу, відбувається швидший перехід пухлинного процесу до васкулярної стадії. Встановлено причинно-наслідкову залежність трансплантації стовбурових клітин, загального об'єму метастазів, кількості клітин первинної пухлини в стані апоптозу, що засвідчує активізацію пухлинного процесу.

Монографія розрахована на наукових співробітників, аспірантів, магістрів, студентів вищих навчальних закладів, спеціалістів ветеринарної медицини.

© Кладницька Л. В., Мазуркевич А. Й., Величко С. В., Бокотько Р. Р., Савчук Т.Л.

© НУБіП України, 2021

## ЗМІСТ

<b>ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СИМВОЛІВ, ОДИНИЦЬ, СКОРОЧЕНЬ</b>	7
<b>ВСТУП</b>	10
<b>РОЗДІЛ ПЕРШИЙ. МЕЗЕНХІМНІ СТОВБУРОВІ КЛІТИНИ І ПУХЛИННИЙ ПРОЦЕС</b>	12
1.1 Мультипотентні стовбурові клітин за протоколом Міжнародного товариства клітинної терапії	12
1.2 Первинний матеріал для отримання фракції клітин з високими адгезивними та проліферативними властивостями	13
1.3 Методи отримання та обробки первинного матеріалу – джерела адгезивної фракції моноклеарних клітин з високою проліферативною активністю	19
1.4. Особливості енергетичного метаболізму у клітинах з високою проліферативною активністю	27
1.5. Імунний статус організму за пухлинного процесу та імуномодулюючі властивості мезенхімних стовбурових клітин різного походження	31
1.6 Мезенхімні стовбурові клітини і пухлинний ріст	39
1.7 Пригнічення пухлинного росту за впливу мезенхімних стовбурових клітин	41
1.8 Активація пухлинного росту за впливу мезенхімних стовбурових клітин	45
1.9 Активація ангиогенезу у стромі пухлин за впливу мезенхімних стовбурових клітин	48
1.10 Вплив МСК на клітини імунної системи тварин- пухлиноносіїв	51
1.11 Активація епітеліально-мезенхімального переходу за	

впливу мезенхімних стовбурових клітин	53
1.12 Вплив мезенхімних стовбурових клітин на регуляцію процесів апоптозу в пухлинних клітинах	55
1.13 Вплив мезенхімних стовбурових клітин на індукцію пухлинного росту в організмі реципієнтів	61
Висновок до розділу 1	64
<b>РОЗДІЛ ДРУГИЙ. КРИТЕРІЇ ОЦІНКИ ВПЛИВУ СТОВБУРОВИХ КЛІТИН НА ПУХЛИННИЙ ПРОЦЕС ЗА КАРЦИНОМИ ЛЕГЕНІ ЛЬЮЇС</b>	66
Висновок до розділу 2	86
<b>РОЗДІЛ ТРЕТІЙ. ОТРИМАННЯ МЕЗЕНХІМНИХ СТОВБУРОВИХ КЛІТИН ТА ЇХ ВПЛИВ НА ПУХЛИННИЙ ПРОЦЕС</b>	88
3.1. Отримання стовбурових клітин червоного кісткового мозку та їх функціональні властивості	88
3.1.1 Отримання та функціональна активність мезенхімних стовбурових клітин червоного кісткового мозку залежно від умов обробки та культивування первинного матеріалу.	88
3.1.2. Клітинний цикл мезенхімних стовбурових клітин культури червоного кісткового мозку за різних пасажів культивування.	94
3.1.3. Імунофенотипова характеристика стовбурових клітин культури кісткового мозку мишей на різних етапах культивування	
3.1.4. Жирнокислотний склад ліпідів стовбурових клітин культури червоного кісткового мозку	99
Висновки до підрозділу 3.1	102
3.2. Характеристика впливу алогенних мезенхімальних клітин кісткового мозку та жирової тканини на функціональний	

стан тимусу і селезінки мишей лінії C57Bl/6.	106
3.2.1. Характеристика впливу алогенних мезенхімальних клітин кісткового мозку та жирової тканини на функціональний стан імунних органів мишей лінії C57Bl/6. Вплив мезенхімних стовбурових клітин на канцерогенез на моделі метастазуючої карциноми легені Льюїс	106
Висновки до підрозділу 3.2	109
3.3. Мезенхімні стовбурові клітини та пухлинний процес на моделі метастазуючої карциноми легені Льюїс	112
3.3.1. Вплив мезенхімних стовбурових клітин на швидкість росту і метастазування перевивної карциноми легені Льюїс	112
3.3.2. Мікроскопічні зміни в скелетних м'язах мишей з трансплантованою карциномою легені Льюїс	118
3.3.3. Мікроскопічні зміни в скелетних м'язах мишей з трансплантованою карциномою легені Льюїс при застосуванні мезенхімних стовбурових клітин	129
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	147
Висновки до підрозділу 3.3	150
<b>РОЗДІЛ ЧЕТВЕРТИЙ. ХАРАКТЕРИСТИКА ПУХЛИННОГО ПРОЦЕСУ ЗА ВПЛИВУ АЛОГЕННИХ МЕЗЕНХІМНИХ СТОВБУРОВИХ КЛІТИН НА ПРИКЛАДІ КАРЦИНОМИ ЛЕГЕНІ ЛЬЮІС</b>	152
<b>ВИСНОВКИ ТА ПРАКТИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ</b>	179
<b>СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ</b>	183
<b>АНТОАЦІЯ</b>	240

## **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

ІІ – 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 – С-С 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 – кіназа, 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 $\alpha$  – 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 – індукцибельна 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 (phosphatidylinositol-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-СoA 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- $\beta$  – 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  $\lambda$  емісії

## ВСТУП

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. Остаточо не розроблені ефективні підходи виділення і отримання стовбурових клітин тварин різних видів, недостатньо охарактеризований їх антигенний спектр, клітинний цикл, морфологічні, функціональні показники, особливості ліпідного обміну, співвідношення насичених, мононенасичених та поліненасичених жирних кислот, що є ключовим фактором у процесах проліферації і підтримання їх основних морфологічних та функціональних характеристик [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.

## РОЗДІЛ ПЕРШИЙ

### МЕЗЕНХІМНІ СТОВБУРОВІ КЛІТИНИ І ПУХЛИННИЙ ПРОЦЕС

#### 1.1. Мультипотентні стовбурові клітини за протоколом Міжнародного товариства клітинної терапії

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 ангиогенезу, 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).

## **1.2. Первинний матеріал для отримання фракції клітин з високими адгезивними та проліферативними властивостями**

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, антиапоптозичними 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 ангиогенезом 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- $\beta$  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 I типу, бета-інтегрини, в них відбувається експресія специфічного фактору транскрипції *PPAR-gamma*. За розвитку хрящової тканини в клітинах з'являється експресія фактору 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 I 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 адипоцитів – 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 моноклеарних 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 – метакрилоїлоксигетіл фосфорілхоліном [406]. Zheng et al. встановили, що адгезія, проліферація та диференціювання МСК у остецити 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 аlogenний 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 CO<sub>2</sub> інкубаторі, за вмісту 5 % CO<sub>2</sub>.

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 см<sup>3</sup>), 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 M-фази – мітоз. M-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 колонієформуєчих 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 kota 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 kota 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. Особливості енергетичного метаболізму у клітинах з високою проліферативною активністю**

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].

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].

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, протаноїд 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- $\gamma$  і TNF- $\alpha$  [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 медіаторів ангиогенезу: 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 р38 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 ангиогенні властивості. З огляду на вищевикладене актуальність визначення вмісту жирних кислот у складі ліпідів МСК різного походження не викликає сумніву.

### **1.5. Імунний статус організму за пухлинного процесу та імуномодулюючі 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 імуномодельююча 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 МКС 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 I (CD8-позитивних Т-лімфоцитів) або II 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 I типу, ІЛ-4 – Т-лімфоцитів хелперів I типу, ІЛ-6 і ІЛ-23 – так званих Т-хелперів 17 (Th17; Т-клітин, які секретують ІЛ-17) [157, 364, 404, 418].

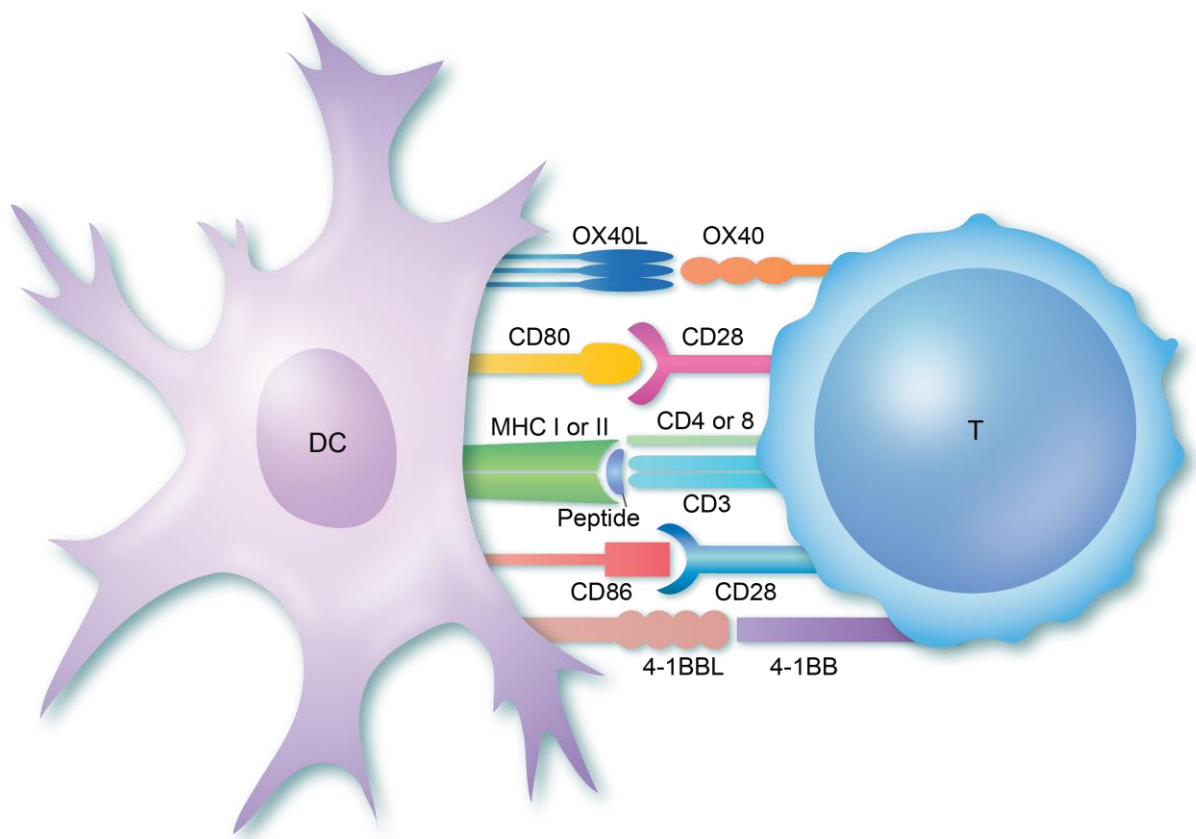


Рис. 1.1. Схематичне представлення механізму активації Т-лімфоцитів за М. Cavanagh (сайт доступу online: <https://www.immunology.org/public-information/bitesized-immunology/systems-and-processes/t-cell-activation>).

Як зазначалось вище, МСК експресують антигени сумісності I класу та не експресують антигени гістосумісності II 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 I типу, Т-лімфоцитами хелперами I типу та НК-клітинами;

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

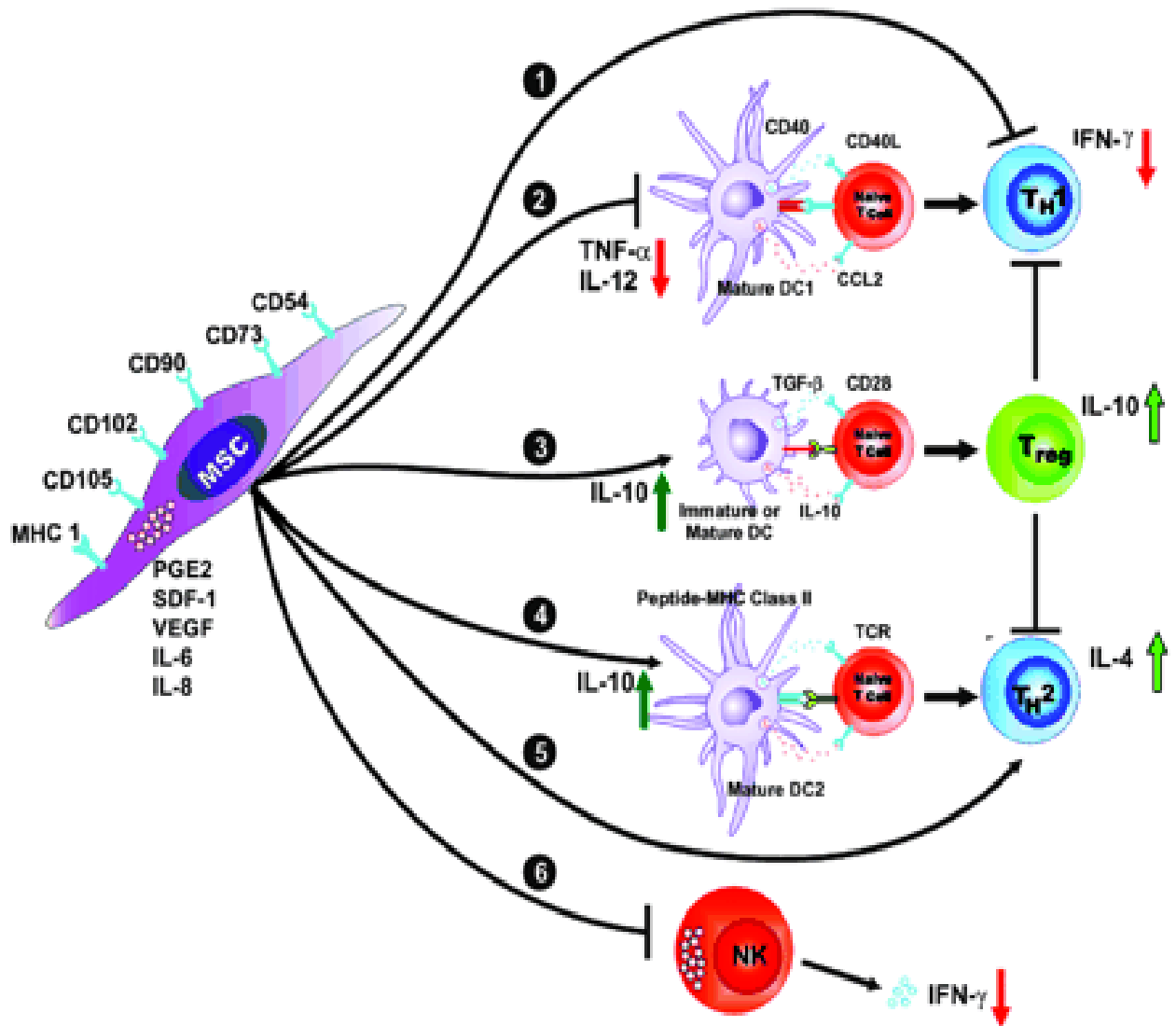


Рис. 1.2. Модель впливу МСК на імунну відповідь організму людини за Aggarwal, Pittenger [78].

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 унеможлиблює його переміщення по мембрані і утворення кластерів - тобто, усувають передумови для активації Т-лімфоцитів [308].

Жодний з вказаних чинників не діє ізольовано, тому імуносупресивная 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- $\beta$ ) 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- $\beta$ -залежний сигнальний шлях інгібіції Т-лімфоцитів, а МСК-КМ – TGF- $\beta$ -залежний та опосередковані рецептором аденозину і простагландинами. TGF- $\beta$  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- $\beta$ -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- $\beta$  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- $\beta$ -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 імуномодельючі 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<sup>+</sup>, CD25<sup>+</sup>, FoxP3<sup>+</sup>, CD127<sup>-</sup>). 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

ІІ-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 Н22, 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 фосфорилування 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 відмінє протипухлинну дію МСК. Однак, протипухлинний ефект МСК та пригнічення фосфорилування 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 фосфорилування 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 дефосфорилує фосфатиділ-інозитол-3, 4, 5 трифосфат та конвертує його у фосфатиділ-інозитол-4, 5 біфосфат, що унеможлиблює фосфорилування 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 Voesck 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, АКТ/mTOR/SREBP1 і Нірро шляхи внутрішньоклітинної передачі сигналів, окиснення жирних кислот, репрограмування енергетичного метаболізму пухлини [430]. Ефект був більш виразним, якщо МСК попередньо нарощували 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 Нірро 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/АКТ сигнального шляху, підвищення експресії гіпоксія-індукованого фактору 1 –

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

Значення екзосом, які секретують мезенхімні стовбурові клітини, для промоції росту гліом підкреслюють також Ravon 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].

Sraeth 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, металопротеїназ (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) мікроекзосомы або екзосомы – часточки розміром 100 – 1000 нм, які є фрагментами зовнішньої плазматичної мембрани; 2) власно екзосомы – 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].

Екзосомы 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<sup>+</sup> Т-лімфоцитів хелперів та цитотоксичних CD8<sup>+</sup> 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- $\beta$ , 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 В16 мишам подвоювало кількість легеневих метастазів, не впливало на ступінь інфільтрації пухлин лімфоїдними клітинами, але збільшувало кількість CD11b<sup>+</sup> 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 В16 та у черевну порожнину клітин асцитної гепатоми Н22 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<sup>+</sup> моноцитами/макрофагами з високою фагоцитарною активністю та, навпаки, збільшенням концентрації CD3<sup>+</sup> 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- $\beta$ , 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- $\beta$  пригнічують активність Т-клітин і НК-клітин. Застосування моноклональних антитіл, спрямованих проти рецепторів TGF- $\beta$ , 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 E-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 E – 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 випадкі 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- $\beta$  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- $\beta$  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.

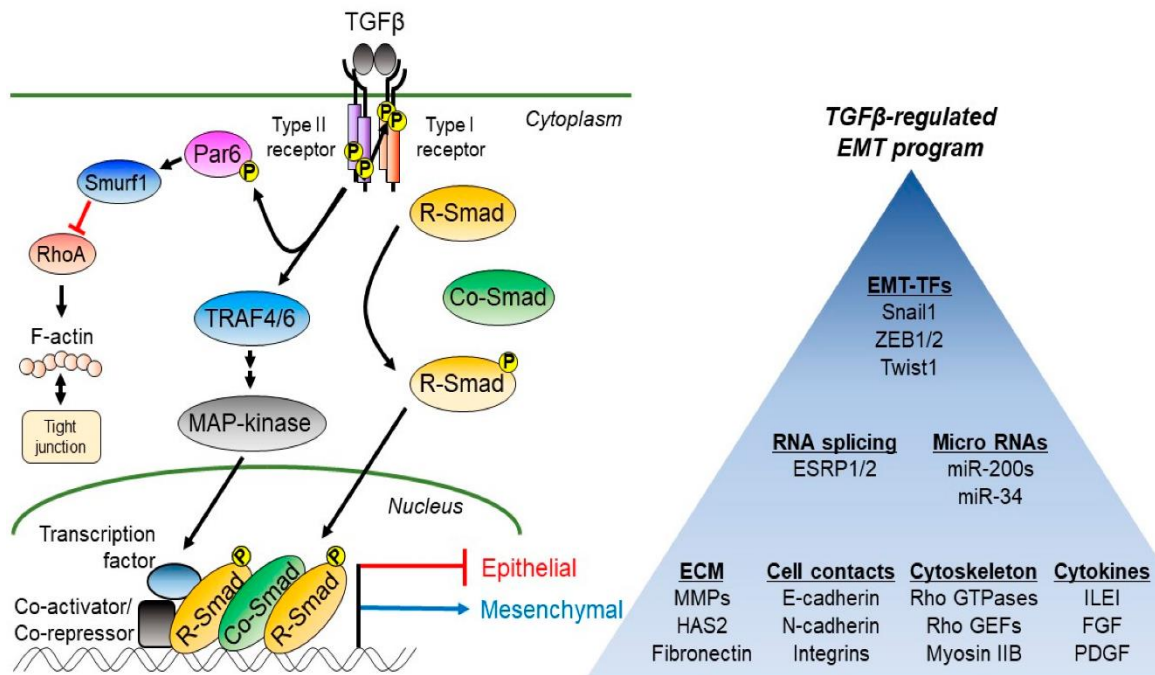


Рис. 1.3. Механізм впливу трансформуючого факторі росту бета, що секретується МСК, на процес епітеліально – мезенхімного переходу за Tsubakihara, Moustakas [456].

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 з'ясуванням 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).

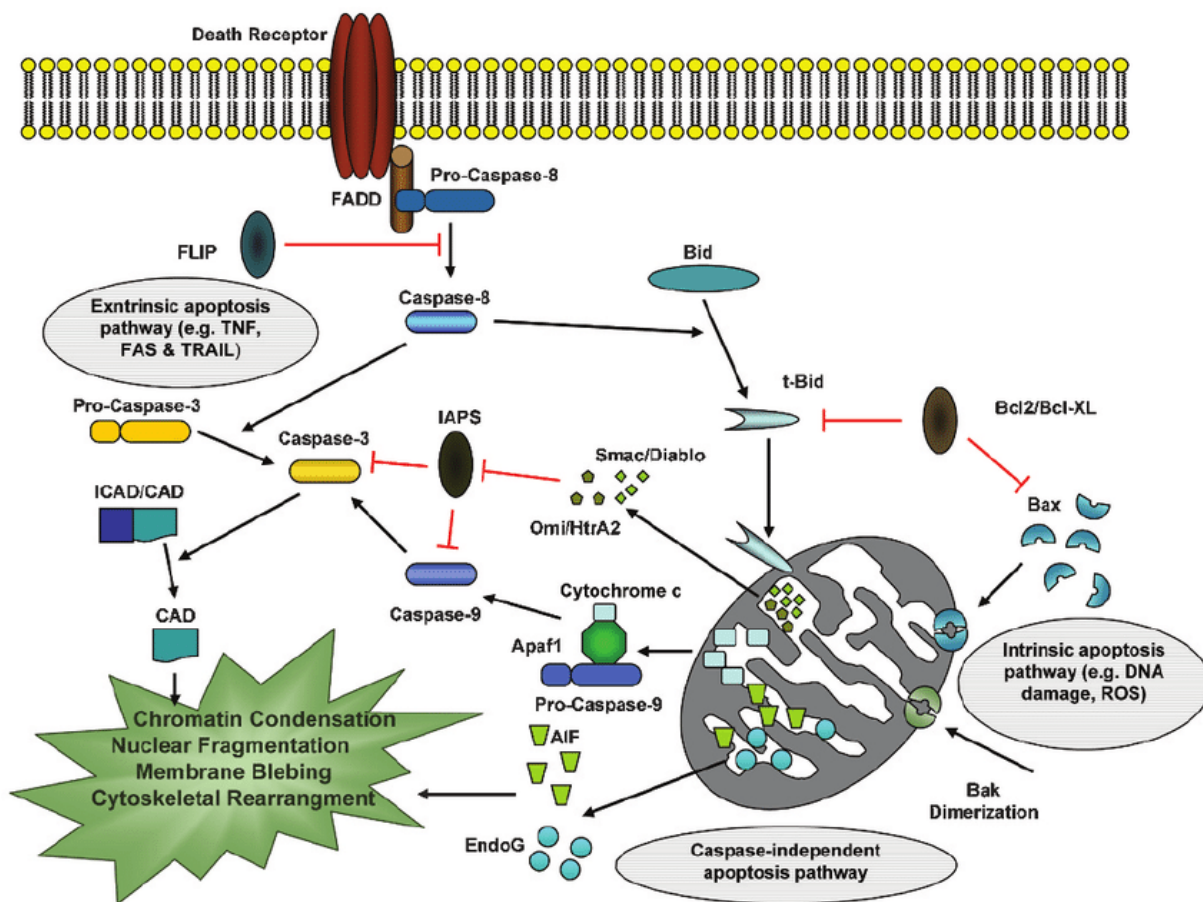


Рис. 1.4. Схема основних механізмів індукції апоптозу за Ghavami et al. [197].

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).

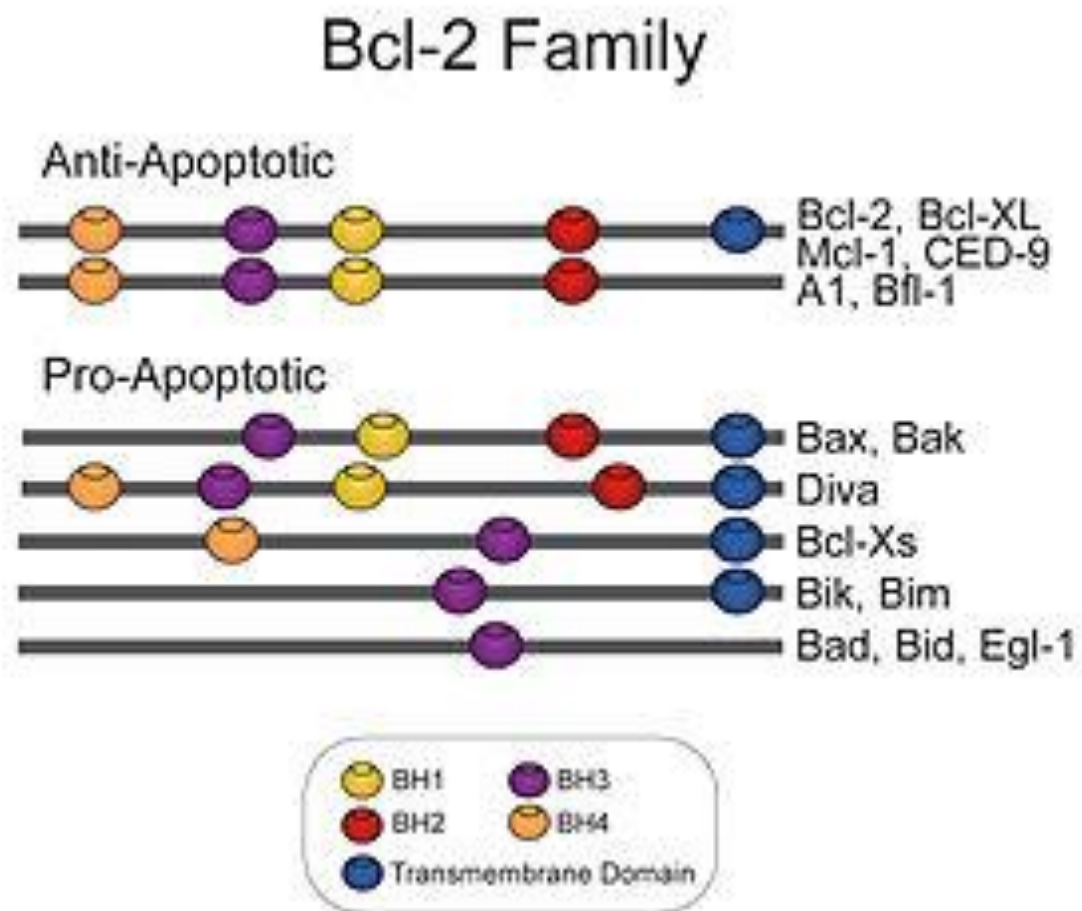


Рис. 1.5. Схематичне представлення основних білків родини Bcl-2 за [457]. BH – окремі гомологічні домени.

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 ефektorних 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 імуноскомпроментованим 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 – трисоміяГ, тетраплоїдія, транс локації 3-ї і 12-ї хромосом, внутрихромосоїній 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 Noughton 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.

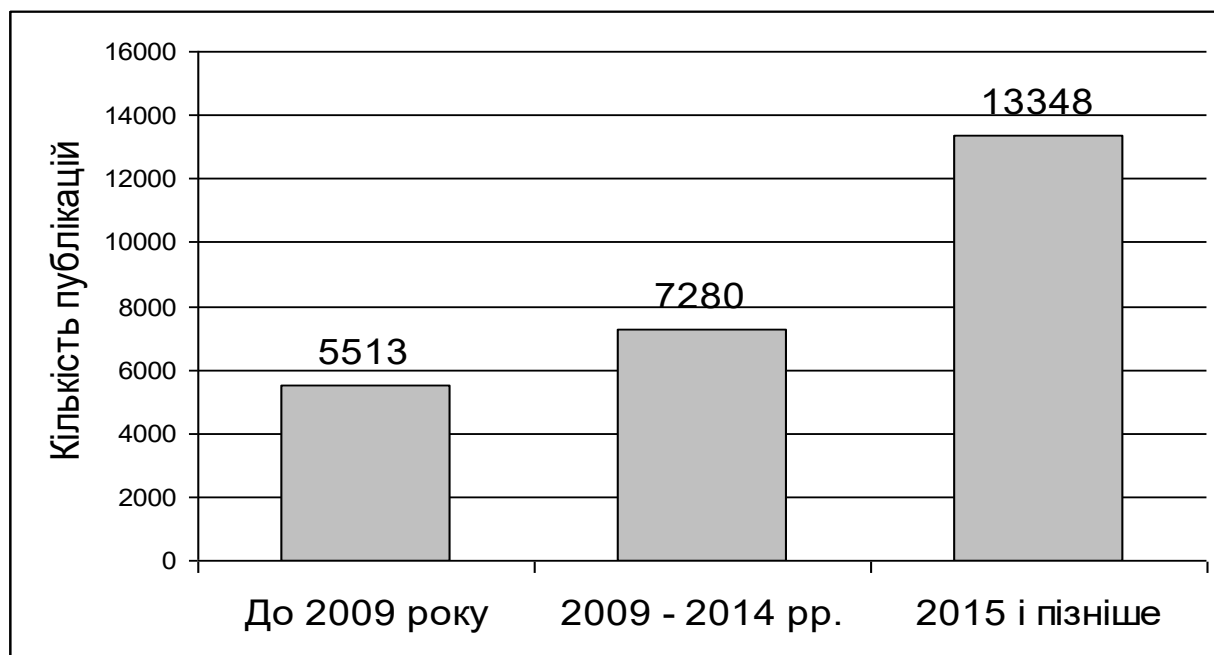


Рис. 1.6. Загальна кількість публікацій, присвячена МСК, у Міжнародній базі даних PubMed (за даними сайту доступу <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>)

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 ДРУГИЙ**

### **КРИТЕРІЇ ОЦІНКИ ВПЛИВУ СТОВБУРОВИХ КЛІТИН НА ПУХЛИННИЙ ПРОЦЕС ЗА КАРЦИНОМИ ЛЕГЕНІ ЛЬЮЇС**

Дослідження проведені 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 протягом 2013–2019 років. 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 С57В1/6 вагою 20–24 г віком 2–3 місяці; 35 собаках різних порід вагою 10–25 кг віком 10–18 місяців; 3 конях української верхової породи, вагою 400–450 кг віком 4–5 років, 15 новонароджених цуценятах та 12 кошенятах.

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  $-18^{\circ}\text{C}$  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  $0,22\ \mu\text{m}$ . 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 x0,25 mm ID, 0,20  $\mu$ m film (Supelco). Культивування клітин проводили в CO<sub>2</sub>-інкубаторі HERACELL (Німеччина) за температурного режиму 37° C, 5 % вмісту CO<sub>2</sub> 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 дм<sup>3</sup> 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 дм<sup>3</sup> 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 дм<sup>3</sup> 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 дм<sup>3</sup> 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 мезенхімного походження. Розробляли методики отримання первинного матеріалу та культивування стовбурових клітин культури кісткового мозку. Досліджували імунофенотип стовбурових клітин, клітинний цикл перед трансплантацією.

У другій 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).

У дослідженнях використано матеріал 250 самців лінійних мишей C57Bl/6.

*Отримання мезенхімних стовбурових клітин культури кісткового мозку тварин.* Мезенхімні стовбурові клітини культури кісткового мозку kota , собаки отримували за загально прийнятими методиками [44]. Отримання мезенхімних стовбурових клітин культури кісткового мозку мишей лінії C57Bl/6 здійснювали за наступної процедури. 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.



Рис. 2.1. Загальна схема досліджень

Евтаназію дослідних мишей здійснювали шляхом зміни дислокації шийних хребців під наркозом. Препарували трубчасті кістки – стегнову, 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 мононуклеарні 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.

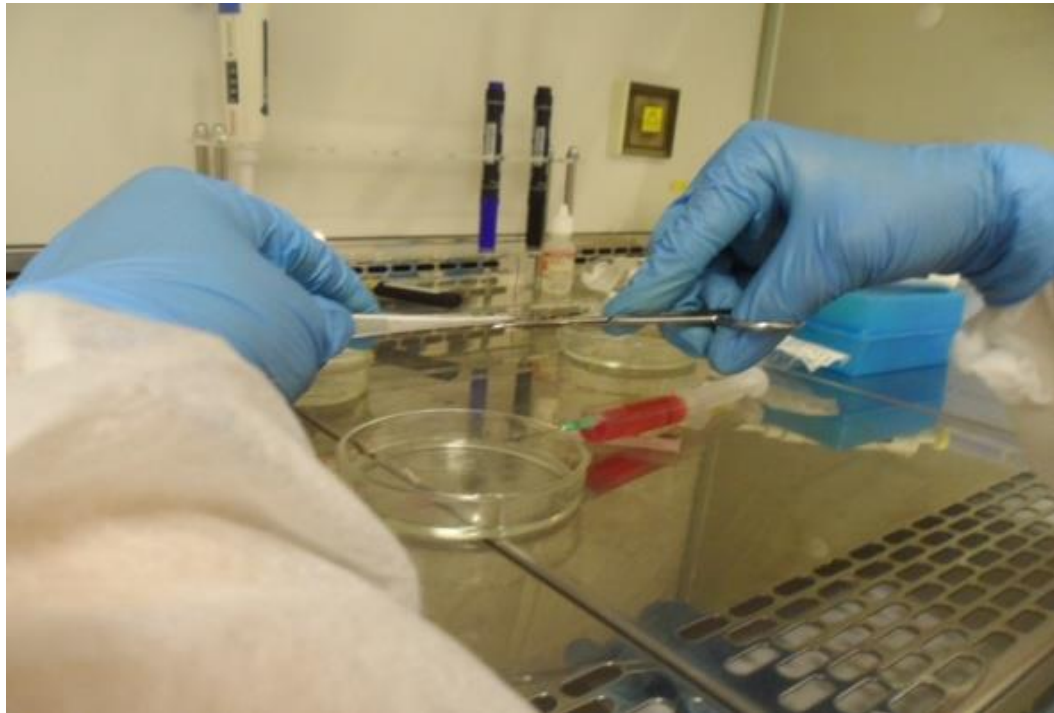


Рис. 2.2. Видалення епіфізів стегнової, великої гомілкової, плечової кісток мишей C57 В1/6.

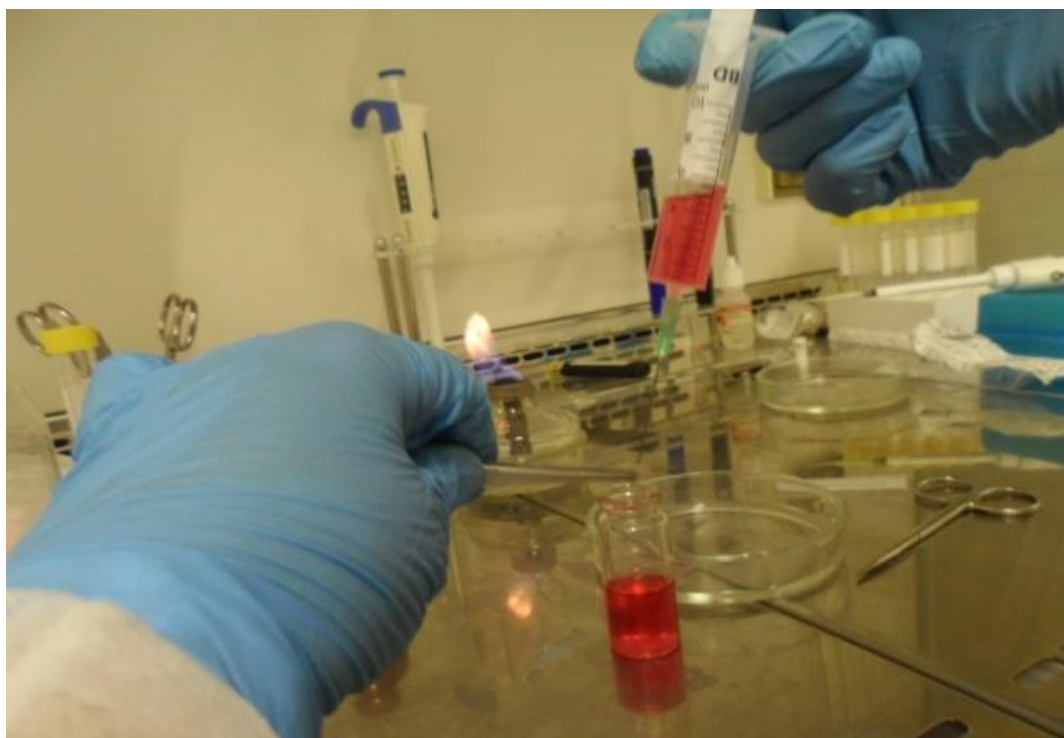


Рис. 2.3 Аспірація кісткового мозку зі стегнових, плечових та великих гомілкових кісток мишей C57Bl/6.

У дослідях з оцінки ефективності методу виділення клітин мононуклеарної 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.

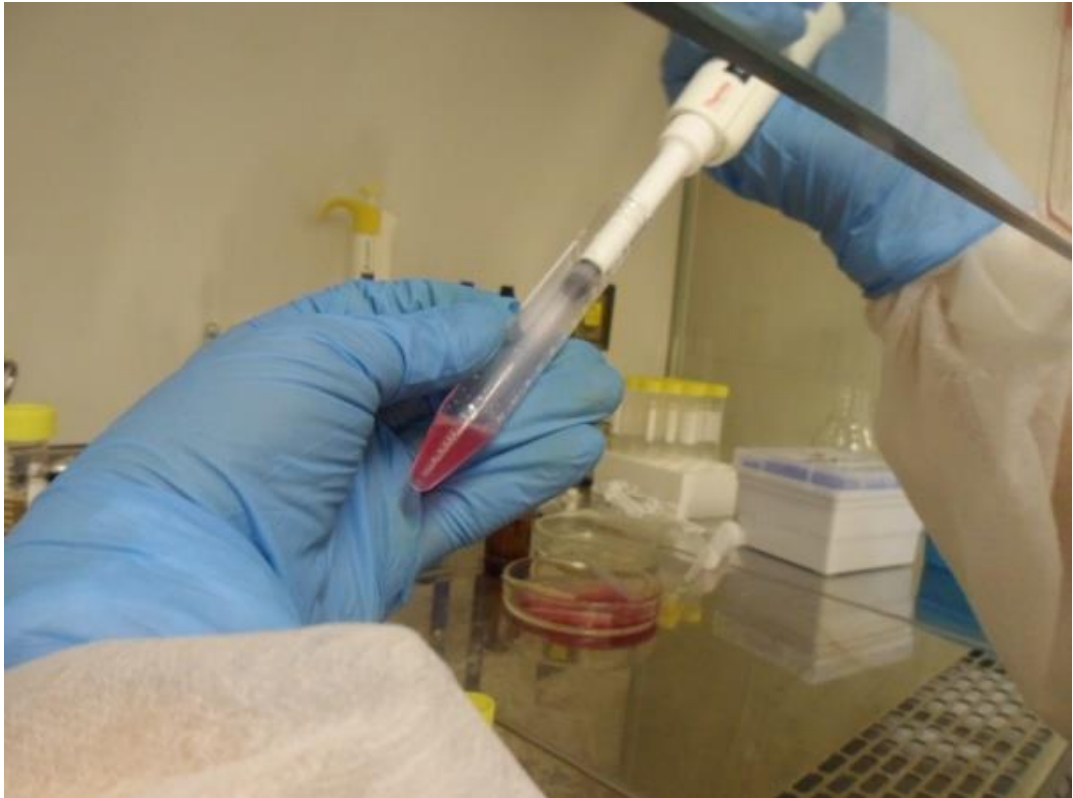


Рис. 2.4. Ресуспензування аспірату кісткового мозку у середовищі DMEM.

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 CO<sub>2</sub> - інкубаторі HERACELL (Німеччина) за температурного режиму 37° C, 5 % вмісту CO<sub>2</sub> 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.

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  $1 \text{ см}^3$ ;

$A$  – число клітин у всіх квадратах;

1000 – кількість  $\text{мм}^3$  в  $\text{см}^3$ ;

0,9 – об'єм камери Горяєва в  $\text{мм}^3$ .

Підрахунок індексу проліферації клітин здійснювали за формулою:

$$X = a / b$$

де  $a$  – остаточна концентрація клітин/ $\text{см}^3$ ;

$b$  – посівна концентрація клітин/ $\text{см}^3$  [34, 57].

Оцінку *життєздатності* культивованих МСК різного походження здійснювали за допомогою вітального фарбування 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  $37^\circ \text{C}$  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].

*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  $5 \times 10^5$  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 рибонуклеази та 10 мкл пропідію йодистого (Sigma, США) для зафарбовування ДНК. Інкубували протягом 10 хв. за  $37^{\circ}\text{C}$  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 Vecton Dickinson, США, що обладнаний аргонним лазером (довжина хвилі  $\lambda$  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  $2 \times 10^3$  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 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<sub>2</sub> інкубаторі за температури 37° С, 5 % вмісту CO<sub>2</sub> 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° С, промивали фосфатно-буферним розчином, після чого інкубували 20 хв. за температури 37° С 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° С. 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 і заключали в спеціальне водорозчинне середовище, що запобігає руйнуванню барвника (Faramount aqueous mounting medium, Dako). Аналіз результатів проводили за визначенням кількості клітин з експресією (коричневе 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- $\beta$ -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 ізотіціанатом (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.

У **другій 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° С, абсолютної вологості і 5 % CO<sub>2</sub>. 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.

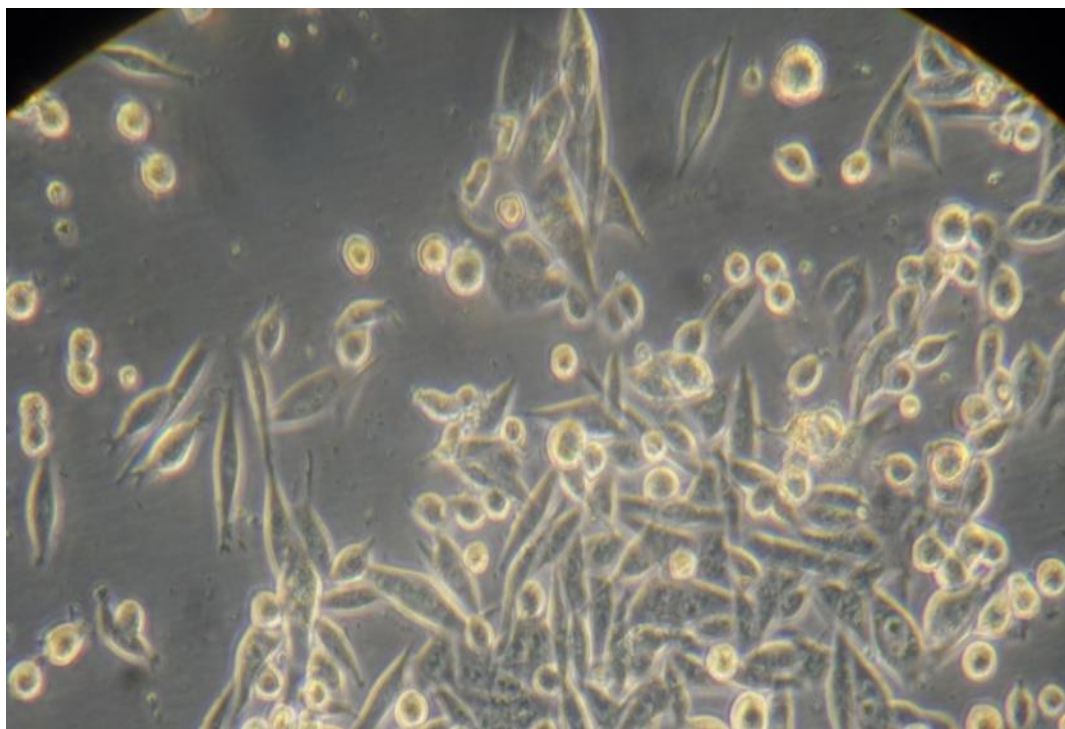


Рис. 2.13. Клітини культури карциноми легені Льюїс. Мікропрепарат, × 100.

При досягненні потрібної дисоціації додавали фетальну сироватку телят 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 C57 Bl/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 ( $\text{мм}^3$ ),

$R$  – радіус метастазу (мм).

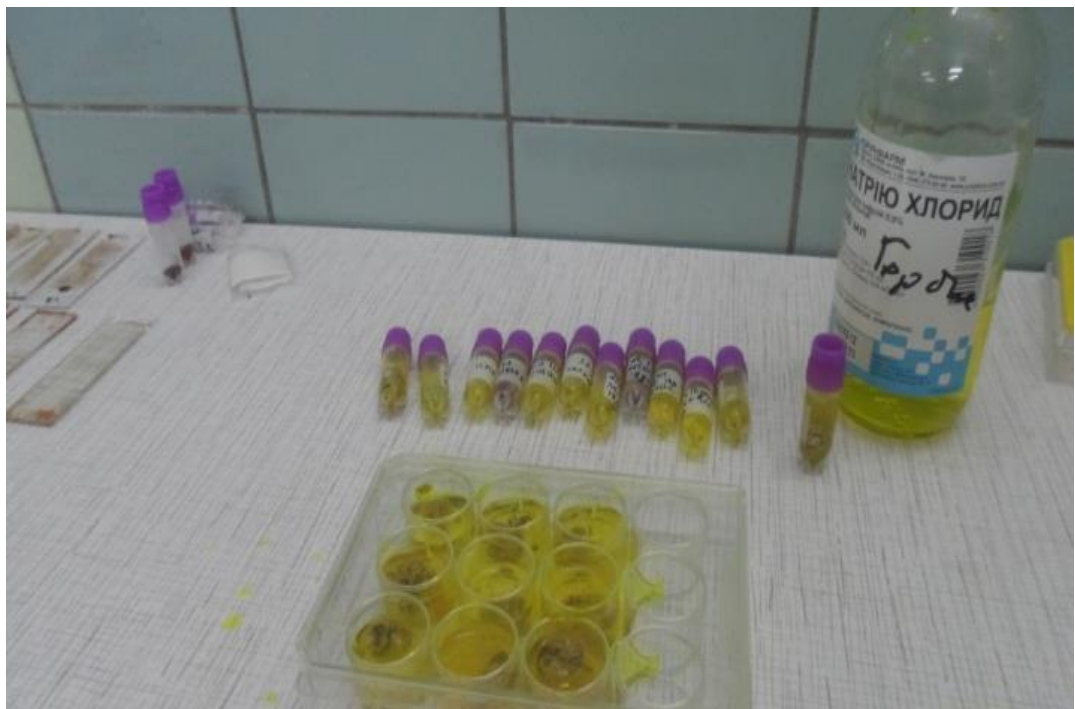


Рис. 2.16. Легені мишей дослідних груп, уражені метастазами, які фіксували в суміш Буена.

*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 мікроскопі МПС-2 виготовляли гістологічні зрізи завтовшки 5-10 мкм. Зрізи обережно знімали з поверхні мікроскопного 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 гематоксилином 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, вимірної сітки Вайбеля, мікроскопа МБИ-2 і окуляр-мікрометра МОВ-1-15<sup>x</sup> [1, 20, 47], а також за допомогою програмного забезпечення UTHSCSA Image Tool для Windows 7 (version 3.0).

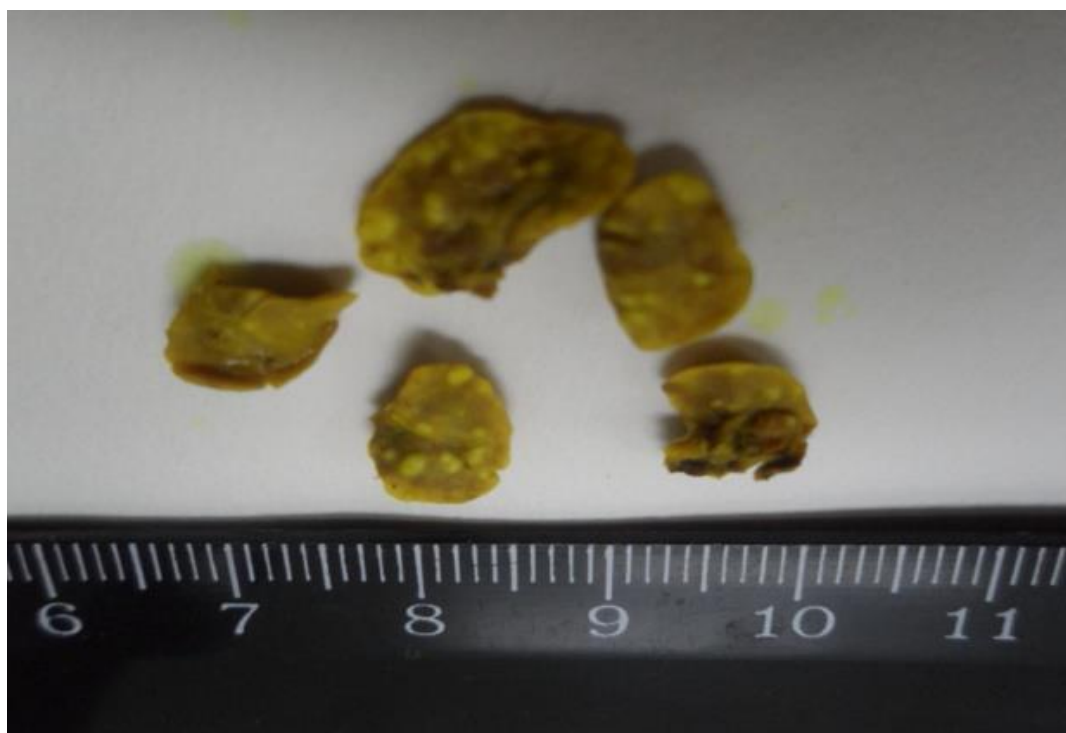


Рис. 2.18. Підрахунок кількості метастазів у легенях та вимірювання їх діаметру у мишей лінії C57Bl/6 з трансплантованою карциномою легені Льюїс. Макропрепарат.

*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 kota») [35].

## РОЗДІЛ ТРЕТІЙ

### ОТРИМАННЯ МЕЗЕНХІМНИХ СТОВБУРОВИХ КЛІТИН ТА ЇХ ВПЛИВ НА ПУХЛИНИЙ ПРОЦЕС

#### 3.1. Отримання стовбурових клітин культури червоного кісткового мозку та їх функціональні властивості

**3.1.1 Отримання та функціональна активність мезенхімних стовбурових клітин червоного кісткового мозку залежно від умов обробки та культивування первинного матеріалу.** У досліджах 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. 3.1 ) та 1,076

на 2-3-тю добу кiльтивування дав бiльший вихiд прикрiплених клiтин (рис. 3.2).

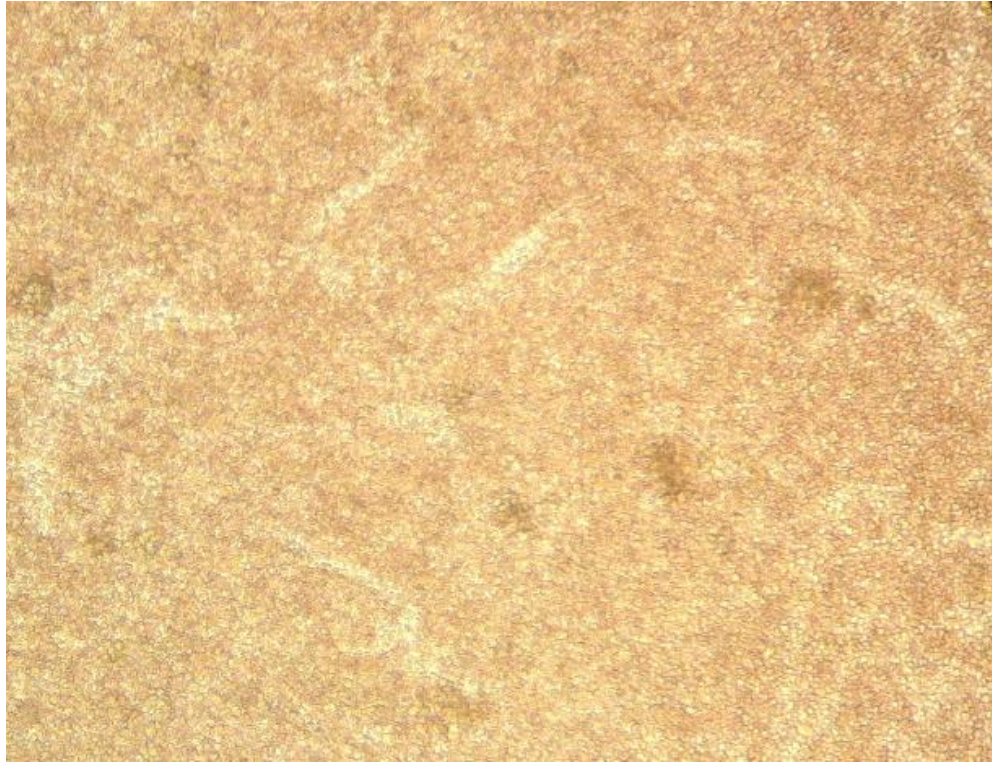


Рис. 3.1 Адгезія клiтин до поверхнi культурального посуду за кiльтивування первинного матерiалу, отриманого при використаннi градиєнта щiльностi фiколу 1,074. Мiкропрепарат,  $\times 100$ .

Саме у цих зразках ми реєстрували прикрiплення бiльшої кiлькостi клiтин до дна культурального посуду в найкоротший термiн. На нашу думку, це пов'язано з тим, що за вказаних показникiв градиєнта щiльностi фiкол-верографiна у первинний матерiал потрапила необхідна кiлькiсть попередникiв МСК i саме у такому складi речовин, що сприяє процесу адгезii МСК до дна культурального посуду.

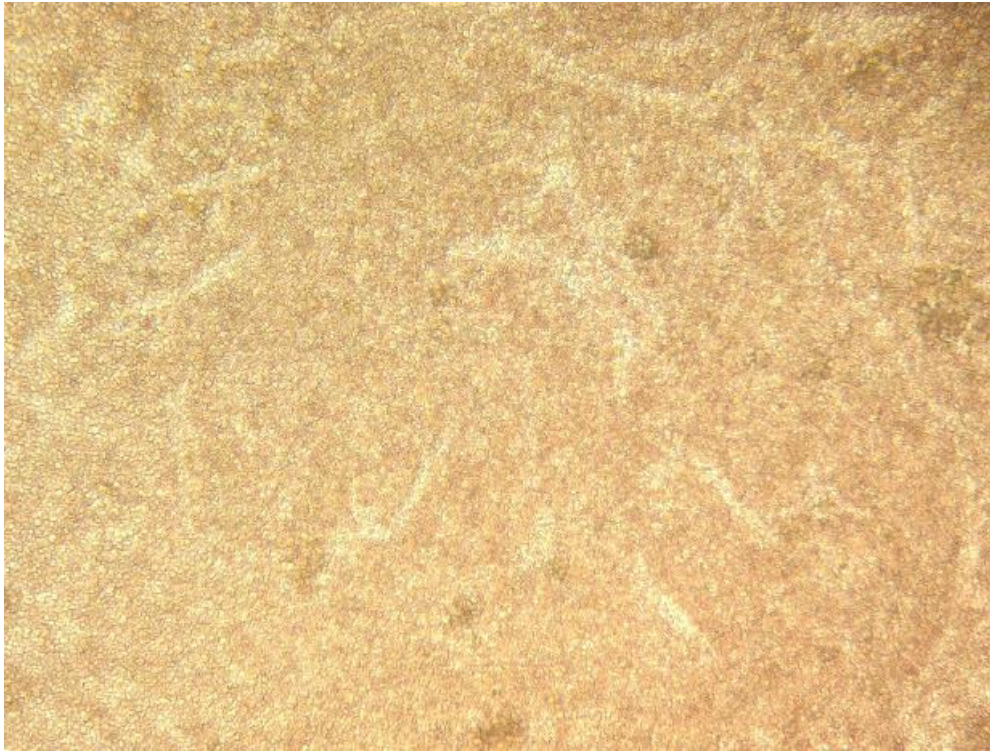


Рис. 3.2 Адгезія клітин до поверхні культурального посуду за культивування первинного матеріалу, отриманого при використанні градієнта щільності фіколу 1,076. Мікропрепарат,  $\times 100$ .

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.3.1).

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  $r = -0,32$ , ( $p < 0,05$ ).

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.

Таблиця 3.1

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

Градiєнт щiльностi фiколу	Показники		
	Кiлькiсть клiтин	Коефiцiєнт пролiферацiї	Життєздатнiсть, %
контроль	583993,1 ± 1567,6	2,33 ± 0,06	92,35 ± 0,99
1,074	713802,9 ± 3860,7**	2,86 ± 0,01**	95,37 ± 0,43*
1,076	635502,4 ± 4548,2**	2,54 ± 0,02*	91,20 ± 0,13
1,078	555576,4 ± 3343,6	2,22 ± 0,01	96,92 ± 0,27
1,080	355502,4 ± 3288,4*	1,42 ± 0,01	82,93 ± 0,54

*Примiтка: \* – p < 0,05, \*\* – p < 0,01, \*\*\* – p < 0,001 порiвняно з показниками контрольної групи.*

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 фiколу 1,074 та 1,076.

Це засвідчує й найвищий показник кількості клітин за використання щільності фiколу 1,074, що становив 683000±1400 (p<0,01) порівняно за показниками при щільності 1,080 і контролем (табл. 3.2).

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

Таблиця 3.2

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

Градiєнт щiльностi фiколу	Показники		
	Кiлькiсть клiтин	Коефiцiєнт пролiферацiї	Життєздатнiсть, %
контроль	529000 ± 2700	2,12 ± 0,08	91,37 ± 0,40
1,074	683000 ± 1400*	2,73 ± 0,06*	95,06 ± 1,13*
1,076	663000 ± 1500*	2,65 ± 0,02*	90,03 ± 3,09
1,078	548000 ± 900	2,19 ± 0,09	93,02 ± 2,30
1,080	455000 ± 1600*	1,82 ± 0,08	84,37 ± 2,12*

*Примiтка: \* –  $p < 0,05$ , \*\* –  $p < 0,01$ , \*\*\* –  $p < 0,001$  порiвняно з показниками контрольної групи.*

За центрифугуваннi суспензiї клiтин кiсткового мозку за щiльностi фiколу 1,078 i 1,080 первинний матерiал не мiстив тих необхідних пропорцiй мононуклеарних клiтин, що забезпечують високу пролiферативну активнiсть МСК, за що свiдчать показники загальної кiлькостi отриманих клiтин та коефiцiєнти пролiферацiї.

Встановлено оберненi кореляцiйнi зв'язки кiлькостi клiтин у первиннiй культурi  $r = -0,84$  ( $p < 0,001$ ), iндексу пролiферацiї  $r = -0,75$  ( $p < 0,001$ ) та життєздатностi  $r = -0,56$  ( $p < 0,05$ ) вiд щiльностi градiєнта фiколу.

Достовiрної рiзницi мiж показниками пролiферативної активностi МСК, iх життєздатнiстю при культивуваннi клiтин у поживних середовищах DMEM та RPMI не виявлено.

Отже, умови обробки первинного матерiалу, а саме кiсткового мозку лiнiйних мишей C57BL/6, достовiрно впливають на кiлькiсть мезенхiмних

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.

Це підтверджувалося і даними ядерно-цитоплазмового співвідношення, яке змінювалося у процесі культивування (табл. 3.3).

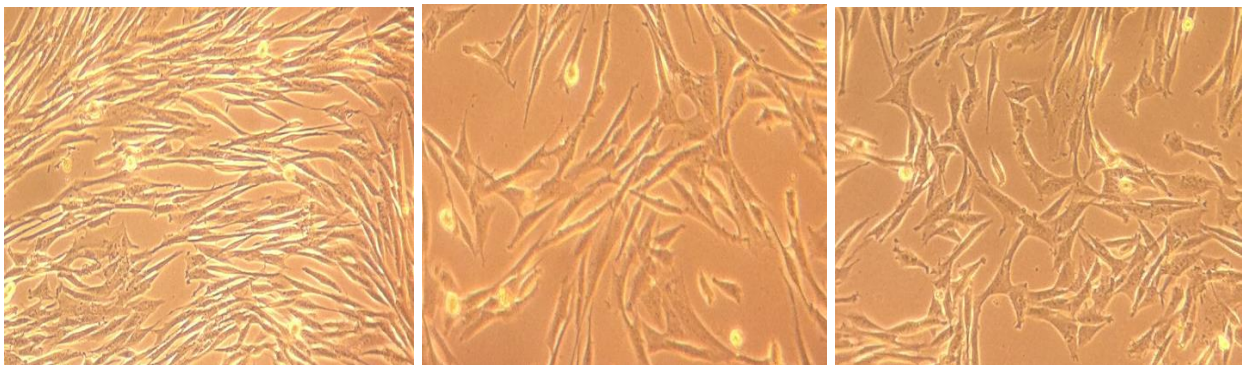
Таблиця 3.3

**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 ( $\mu\text{m}^2$ )	154,44 $\pm$ 6,23	156,22 $\pm$ 4,42	142,44 $\pm$ 5,05	123,11 $\pm$ 10,51*
Площа клітини ( $\mu\text{m}^2$ )	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 на 12-ту добу культивування стовбурових клітин культури кісткового мозку утворювався повільніше по мірі збільшення кількості пасажів (рис. 3.3). 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. 3.3. 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 ( $r = -0,70$ ;  $p < 0,05$ ).

**3.1.2. 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 стовбурових клітин культур червоного кісткового мозку собаки за різних пасажів за фазами клітинного циклу (табл. 3.4).

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 3.4*

**Розподіл мезенхімних стовбурових клітин культури кісткового мозку різних пасажів культивування за фазами клітинного циклу,**

**$M \pm m, n = 5, \%$**

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

*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  $G_0/G_1$  фазі в отриманих нами культурах МСК становив  $70,67 \pm 2,70$  % на другому пасажі культивування

На 7-му пасажі культивування МСК також всі клітини культури були

диплоїдні. Кількість клітин проліферативного пулу  $G_2/M+S$  достовірно зменшується і становить  $20,33 \pm 1,27$  % ( $p < 0,001$ ). Фаза пресинтетичного періоду  $G_0/G_1$  характеризується збільшенням кількості клітин до  $79,67 \pm 0,84$  % ( $p < 0,01$ ). 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. 3.5, за 72 години культивування у середовищі без додавання сироватки, стійкість клітин до апоптозу була досить висока. Однак, кількість апоптотичних клітин, визначених за появою гиподіплоїдного 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 3.5

**Кількість апоптотичних клітин в культурах МСК червоного кісткового мозку миші різних пасажей залежно від умов культивування,  
M ± 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 <sup>^</sup>	7,10±1,12 <sup>^</sup>
Безсироваткове середовище	14,0±1,74 <sup>***</sup>	19,0±0,58 <sup>***</sup>	20,67± 1,55 <sup>***^</sup>	22,67± 1,55 <sup>***^</sup>

*Примітки: \* –  $p < 0,05$ , \*\* –  $p < 0,01$ , \*\*\* –  $p < 0,001$  порівняно з кількістю апоптотичних клітин за культивування з сироваткою відповідного пасажу; <sup>^</sup> –  $p < 0,05$ , <sup>^^</sup> –  $p < 0,01$ ; <sup>^^^</sup> –  $p < 0,001$  – 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  $87,13 \pm 4,08$  нг/мл, то на 12-му пасажі ми зареєстрували достовірне збільшення секреції –  $158,73 \pm 2,53$  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.

**3.1.3. 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. 3.4 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.

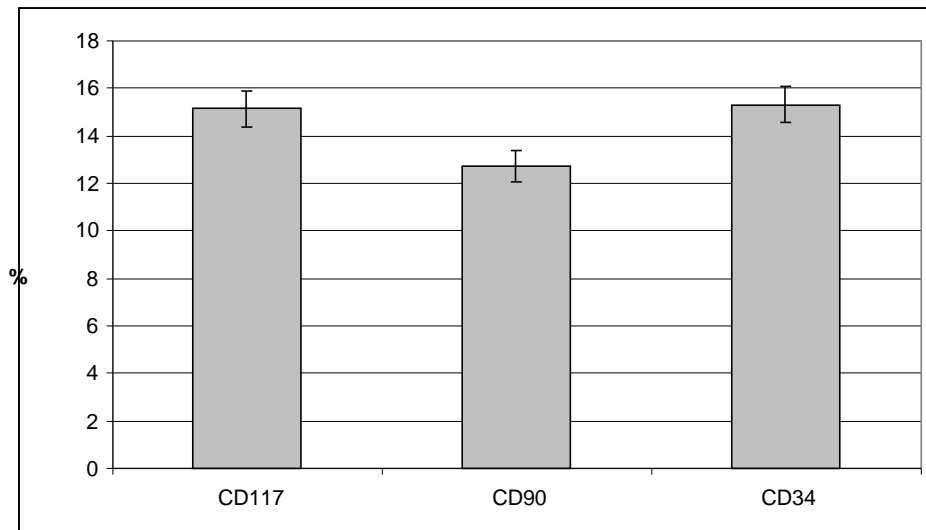


Рис. 3.4. Експресія антигенів CD34, CD90 і CD117 на мезенхімних стовбурових клітинах культури червоного кісткового мозку першого пасажу.

На четвертому пасажі культивуванні кількість CD34<sup>+</sup> та CD117<sup>+</sup> 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. 3.5, 3.6). Тоді, як кількість CD90<sup>+</sup> 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.

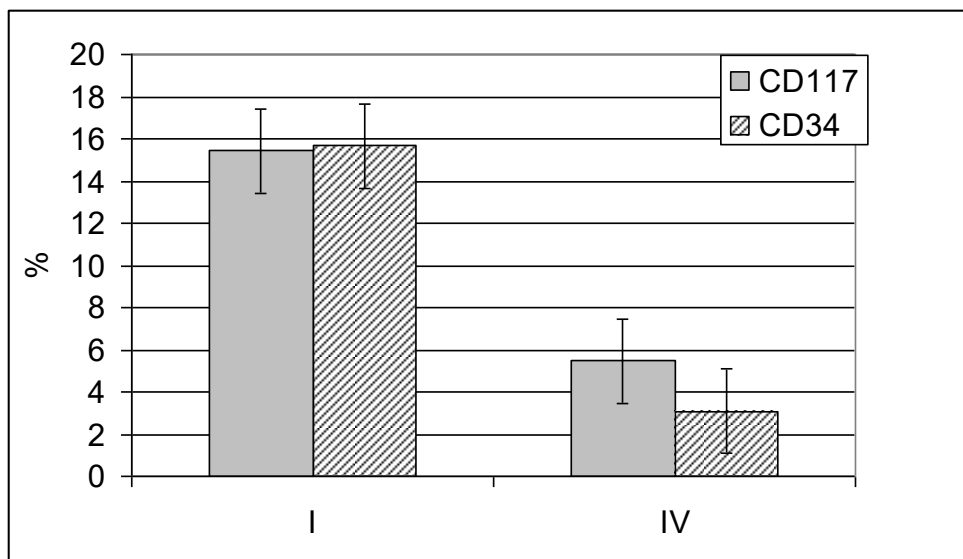


Рис. 3.5. Експресія антигенів CD34 і CD117 на МСК кісткового мозку мишей першого (I) та четвертого (IV) пасажів.

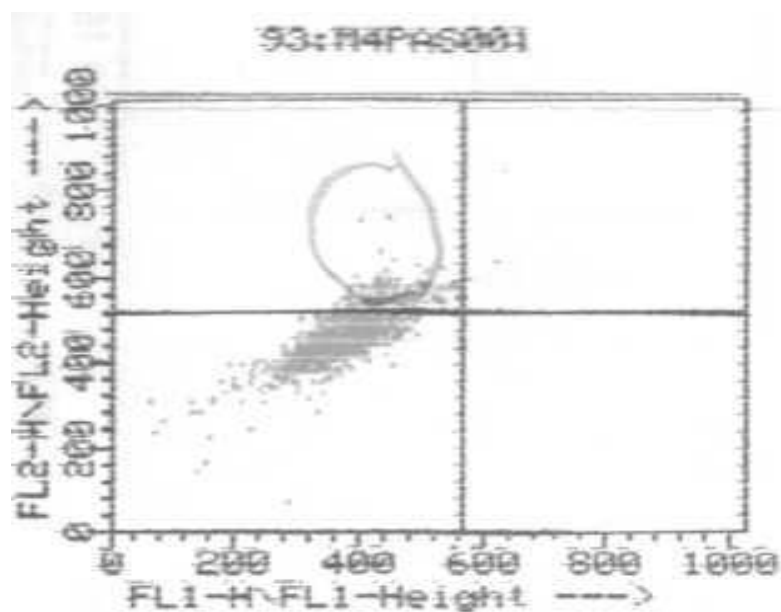


Рис. 3.6. Гістограма. CD117 (позитивні за PE) на МСК культури кісткового мозку мишей першого пасажу. Нижній лівий квадрант: % популяції клітин, негативних за флюорофорами FITS та PE; нижній правий квадрант: % популяції клітин, позитивних тільки за флюорофором FITS; верхній лівий квадрант: % популяції клітин, позитивних за флюорофором

PE; верхній правий квадрант: % популяції клітин, позитивних за флюорофорами FITS та PE.

**3.1.4. Жирнокислотний склад ліпідів стовбурових клітин культури червоного кісткового мозку.** Вміст жирних кислот визначали в СК культури кісткового мозку нервової тканини kota, жирової тканини собаки методом газорідинної хроматографії. Використовували клітини ранніх пасажів – 10-12 доби культивування.

Отримані мезенхімні стовбурові клітини культури червоного кісткового мозку kota досліджували на вміст жирних кислот. У спектрі жирних кислот МСК культури червоного кісткового мозку виявлено коротко-, середньо- та довголанцюгові жирні кислоти (рис. 3.7, табл. 3.5).

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 зростав 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 %.

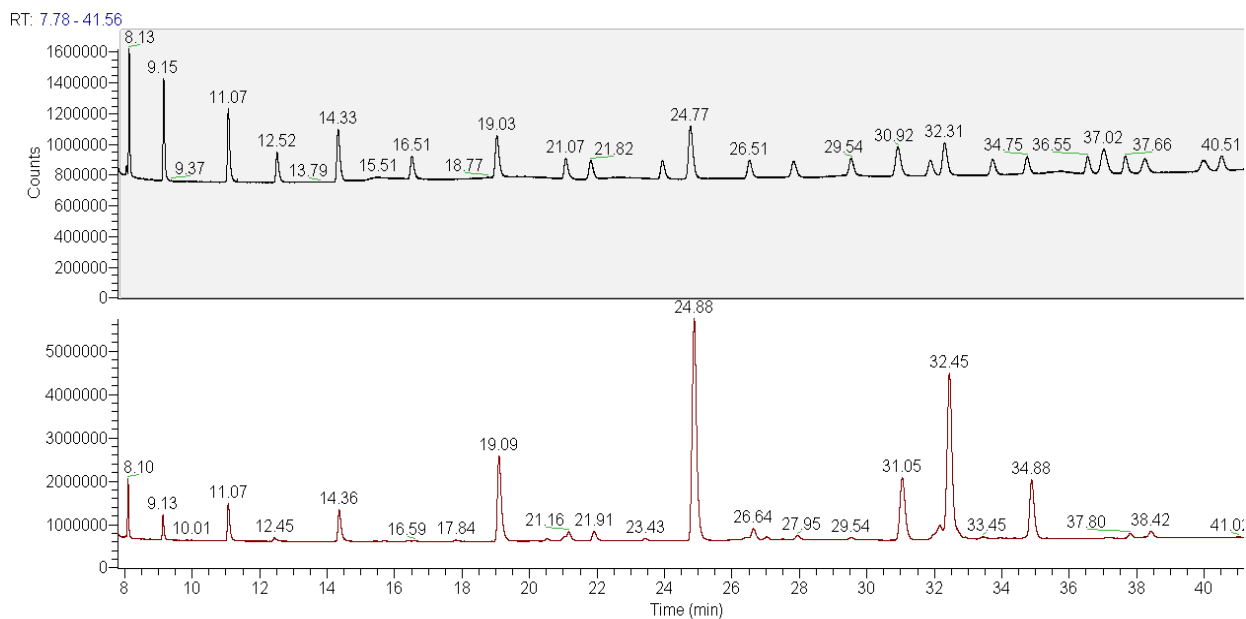


Рис. 3.7. Хроматограма жирнокислотного складу ліпідів стандарту (а – верхня – стандарт) та ліпідів МСК культури червоного кісткового мозку (б – нижня – проба).

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 3.5

**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 ± 0,02
Каприлова кислота (C8:0)	1,36 ± 0,01
Капринова кислота (C10:0)	2,90 ± 0,01
Лауринова кислота (C12:0)	3,20 ± 0,02
Міристинова кислота (C14:0)	10,92 ± 0,06
Пентадеканова кислота (C15:0)	1,27 ± 0,01
Пальмітинова кислота (C16:0)	32,46 ± 0,05
Пальмітолеїнова кислота (C16:1n9c)	1,58 ± 0,01
Стеаринова кислота (C18:0)	10,59 ± 0,07
Олеїнова кислота (C18:1n9c)	23,15 ± 0,05
Лінолева кислота (C18:2n6c)	8,51 ± 0,04
Цис-11-ейкозенова кислота (C20:1)	0,99 ± 0,01
Цис-11, 14-ейкозадієнова кислота (C20:2n6)	0,06 ± 0,01
Цис-8, 11, 14-ейкозатрієнова кислота (C20:3n6)	0,01 ± 0,00
Цис -11, 14, 17-ейкозатрієнова кислота (C20:3n3)	0,31 ± 0,01
Цис-5, 8, 11, 14-ейкозатетраєнова кислота (арахідонова) (C20:4n6)	0,12 ± 0,01
Цис-7, 10, 13, 16, 19-докозапентаєнова кислота (C22:5n3)	0,25 ± 0,02
Цис-4, 7, 10, 13, 16, 19-докозагесаєнова кислота (C22:6n3)	0,15 ± 0,01
ΣНЖК	64,88 ± 0,02
ΣННЖК	35,12 ± 0,02
НЖК /ННЖК	1,85
Σ Моноєнові НЖК	25,71±0,02
Σ Полієнові ННЖК	9,41±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 kota 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-ейкозадієнної, цис-8, 11, 14-ейкозатрієнної 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-ейкозатрієнної кислоти (0,01 %). Сумарна кількість насичених жирних кислот становила 64,88 %, ненасичених жирних кислот – 35,12 %. Моноєнові жирні кислоти склали 25,71%, а полієнові – 9,41 %. Індекс співвідношення поліненасичених жирних кислот  $n3$  до  $n6$  в мезенхімних стовбурових клітин культури кісткового мозку становить 0,08.

### **Висновки до підрозділу 3.1**

Підсумовуючи результати, отримані при виконанні даного підрозділу дисертаційного дослідження, можна зробити наступні висновки:

1. 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.

2. Зміни, що відбуваються 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.

3. 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.

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. Характеристика впливу алогенних мезенхімальних клітин кісткового мозку та жирової тканини на функціональний стан тимусу і селезінки мишей лінії C57Bl/6.**

**3.2.1. Характеристика впливу алогенних мезенхімальних клітин кісткового мозку та жирової тканини на функціональний стан імунних органів мишей лінії C57Bl/6.** Як видно з даних рис. 3.8 і рис. 3.9, системне

введення МСК з кісткового мозку приводило до більш виразної активації тимусу (збільшення вагового індексу і клітинності), ніж введення МСК з жирової тканини.

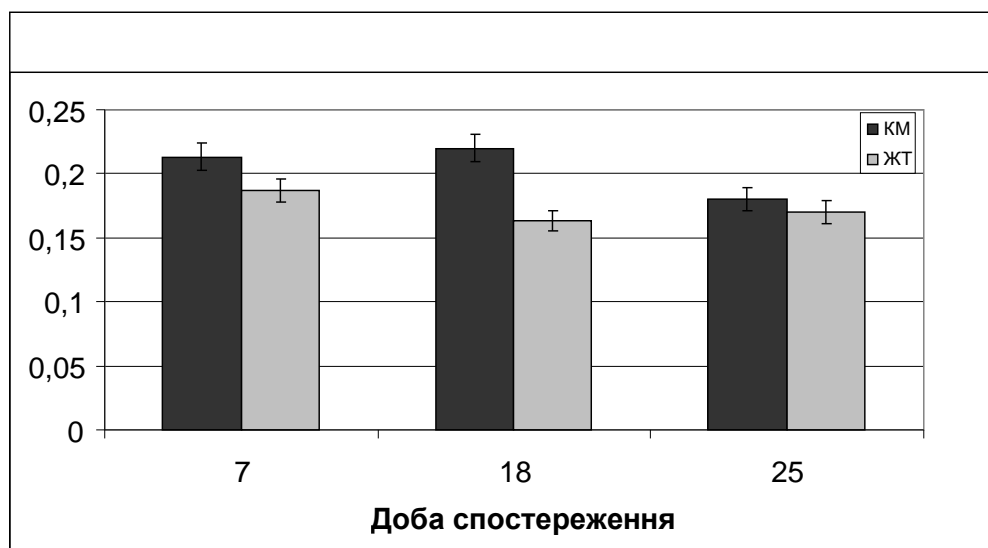


Рис. 3.8. Ваговий індекс тимусу в різні терміни спостереження за введення МСК культури червоного кісткового мозку та жирової тканини

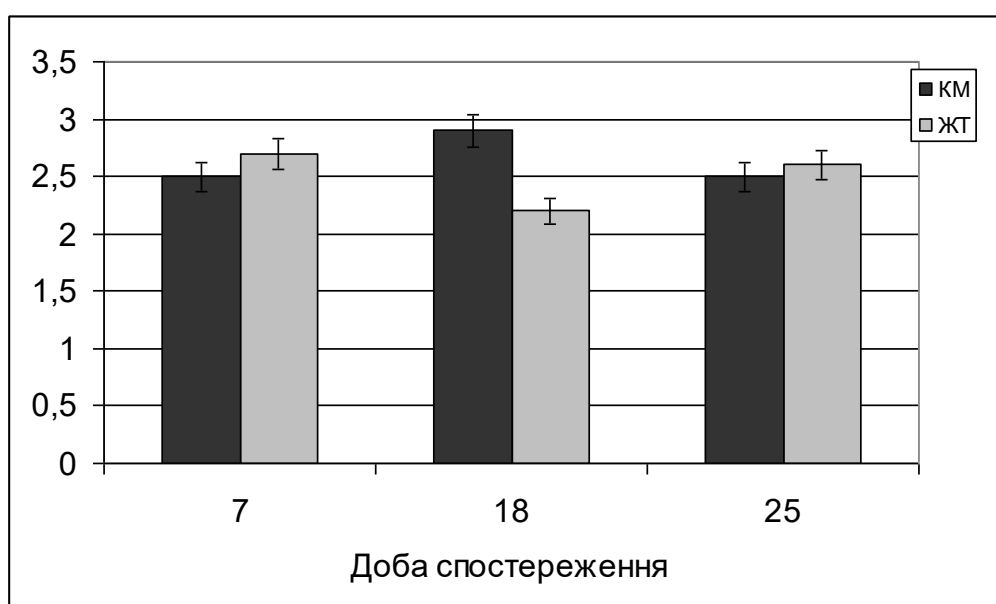


Рис. 3.9. Клітинність тимусу в різні терміни спостереження за введення МСК культури червоного кісткового мозку та жирової тканини

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.

Системне введення МСК культури жирової тканини приводило до більш виразної активації селезінки (збільшення вагового індексу), ніж введення МСК культури кісткового мозку (рис. 3.10, рис. 3.11).

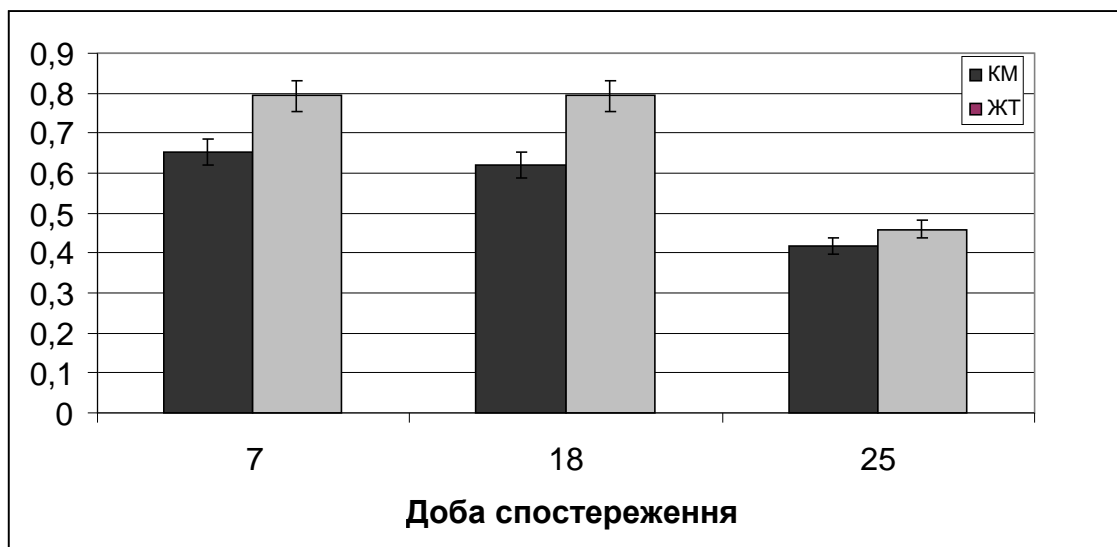


Рис. 3.10. Ваговий індекс селезінки в різні терміни спостереження за введення МСК культури червоного кісткового мозку та жирової тканини

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.

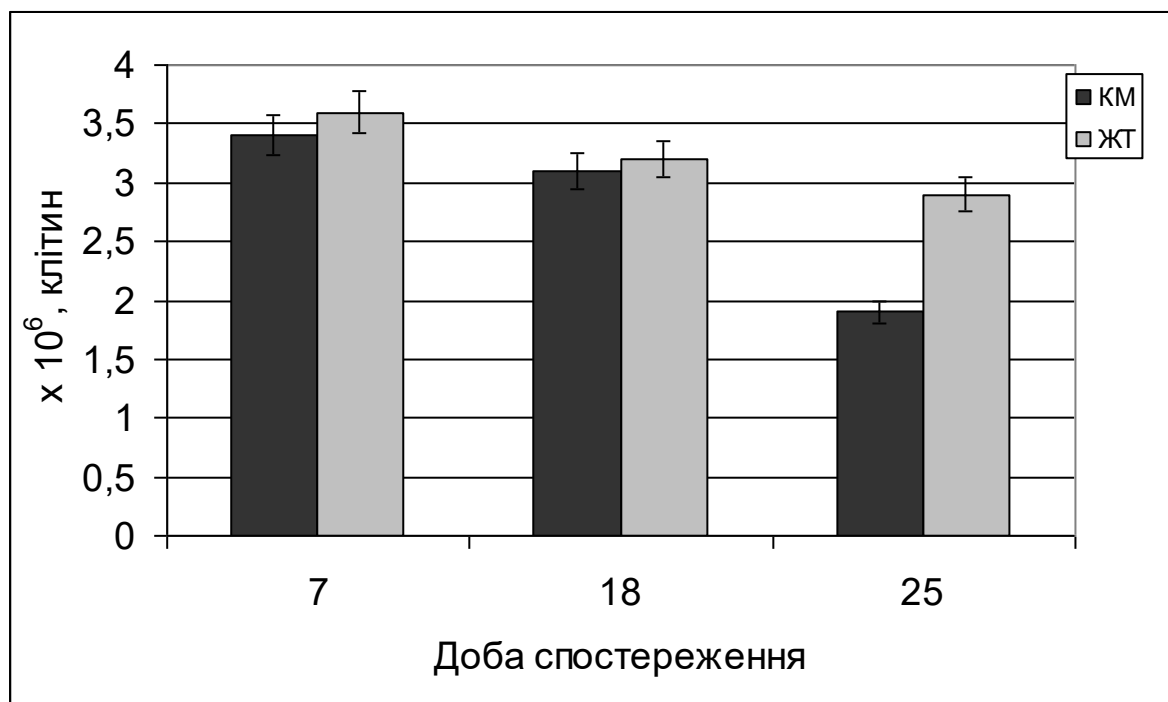


Рис. 3.11. Клітинність селезінки в різні терміни спостереження за введення МСК культури червоного кісткового мозку та жирової тканини.

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.

### Висновки до підрозділу 3.2

Підсумовуючи результати даного підрозділу, можна зробити наступні висновки:

1. Системне введення МСК культури кісткового мозку здоровим тваринам не призводить до індукції пухлинного росту, переноситься без

ускладнень. Це засвідчує про відсутність негативного впливу МСК на функціональні властивості паренхіматозних органів організму тварин-реципієнтів.

2. Системне введення МСК культури кісткового мозку впливає на стан органів імунної системи тварин. Внутрішньовенне введення мезенхімних стовбурових клітин культури та кісткового мозку на перших етапах призводить до короточасного збільшення відносного індексу маси, вмісту лімфоїдних клітин у тимусі та селезінці тварин-реципієнтів, які поступово відновлюються до норми або стан їх пригнічується.

### **3.3. Вплив трансплантації алогенних МСК на розвиток пухлин у мишей C57Bl/6.**

**3.3.1 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:

3. 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.

4. 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-Н<sub>2</sub>-оксидази моноцитів, макрофагів, а саме моноцитів/ макрофагів, що є необхідною умовою для їх подальшого диференціювання в М2 макрофаги.

5. 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: МКС 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 Мезенхімні стовбурові клітини та 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  $1 \times 10^6$  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  $87 \pm 5$  %.

Активний ріст інокульованої LLC спостерігався, починаючи з 8-ї доби пересадки пухлинних клітин (табл. 3.6). 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 3.6

**Показники ваги тварин та діаметру первинної пухлини в мишей  
С57В1/6 з трансплантованої карциномою легені Льюїс,  $M \pm m$ ,  $n = 24$**

Доба після трансплантації 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, який 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. 3.7, на 18-ту добу досліджень показники маси первинної пухлини у тварин за впливу МСК та тварин-пухлиноносіїв груп контролю достовірно відрізняються.

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 злякисності процесу в цілому, а також дає можливість

прогнозу перебігу останнього.

Таблиця 3.7

**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 ± 0,08	2,57 ± 0,21*^	1,75 ± 0,1
Загальний об'єм метастазів, мм <sup>3</sup>	10,28 ± 0,85	29,62 ± 6,50*^	9,68 ± 0,95

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

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. 3.7), 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 розвинення 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. 3.8).

Таблиця 3.8

**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 ± 8,26	40,67 ± 9,57	26,52 ± 5,43
Загальний об'єм метастазів, мм <sup>3</sup>	17,94 ± 6,59	41,52 ± 7,9* ^	16,43 ± 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-пухлиноносців 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. 3.9., рис. 3.12).

Таблиця 3.9

**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±2,3	19,8±1,4	6,3±1,3	3,7±0,9	1±0,2	0,6±0,1
LLC+МСК	47,50±1,2	28,3±1,3*	13,3±2,4*	8,3±1,3*	1,7±0,5*	0,9±0,1
LLC+0,89 % NaCl	71,4±2,1	18,2±0,4	6,0±1,4	3,1±1,2	0,8±0,2	0,5±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.

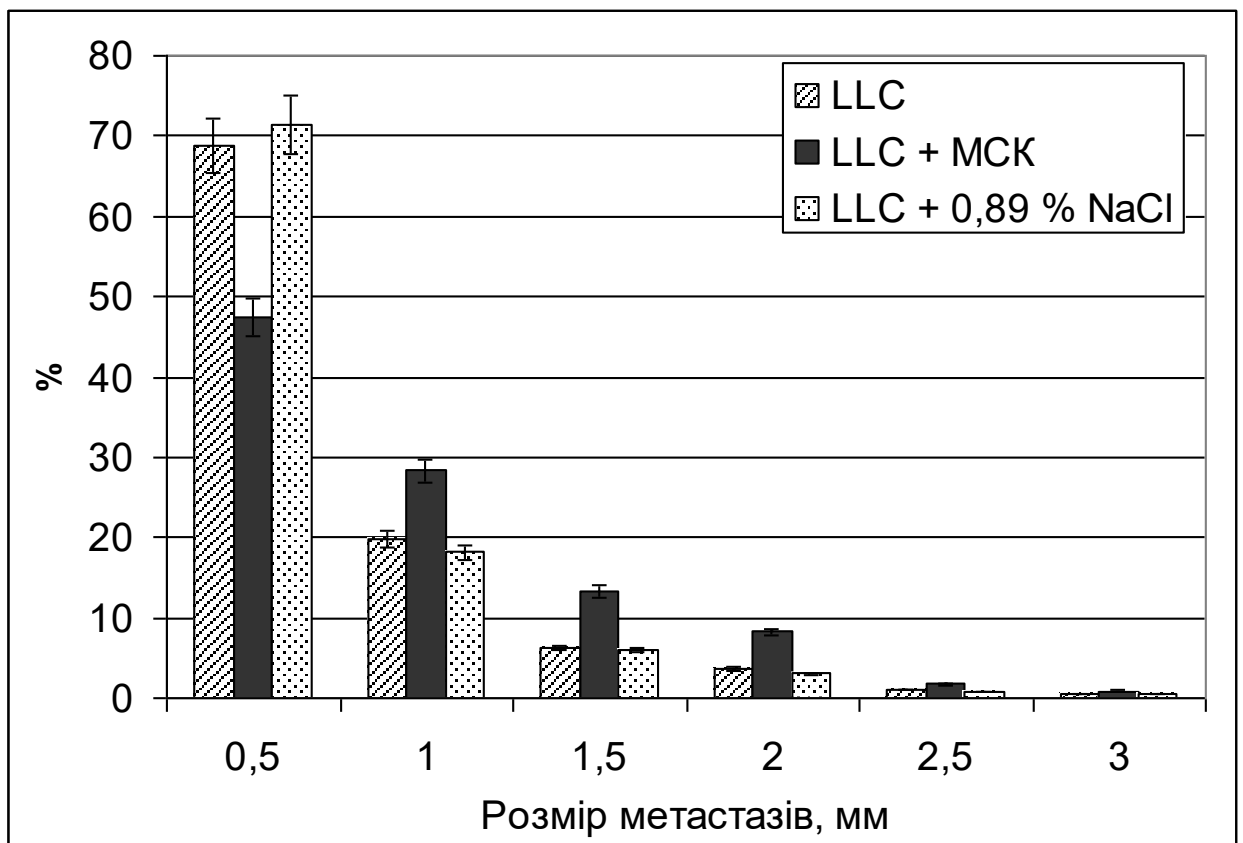


Рис. 3.12. Кількість метастазів за розмірами у мишей C57BL/6 з трансплантованої LLC на 24-ту добу дослідження в різних групах дослідних тварин.

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. 3.10).

Таблиця 3.10

**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. 3.13). 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.

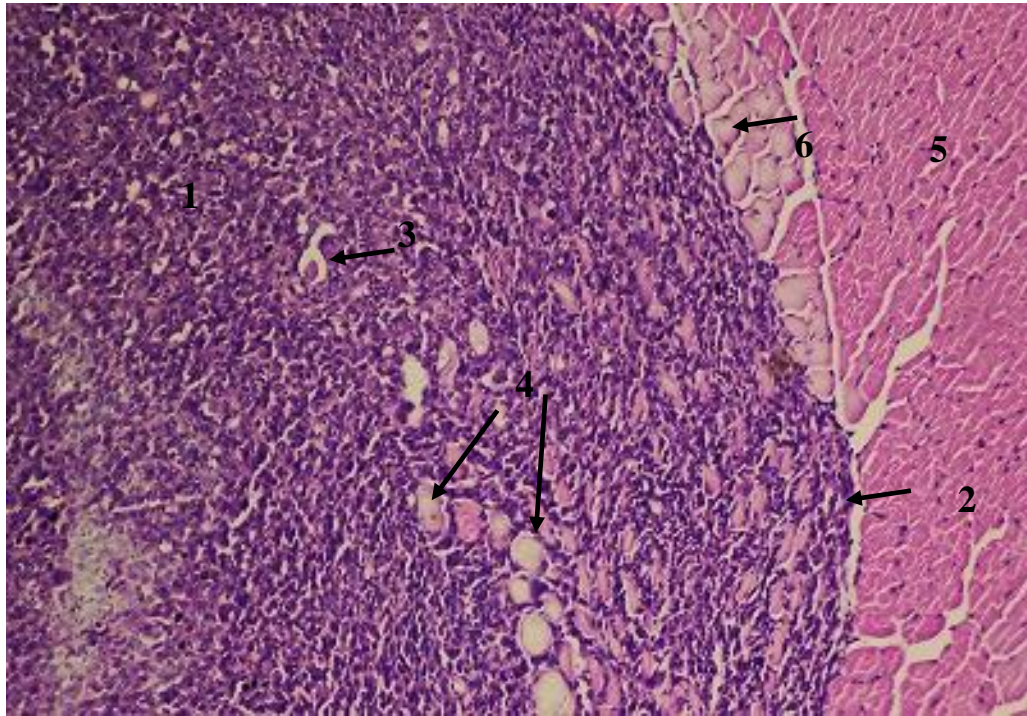


Рис. 3.13. М'яз миші з трансплантованою карциномою легені Льюїс на 18 добу. Гістопрепарат: 1 – клітини пухлини; 2 – межа пухлини; 3 – кровоносна судина; 4 – м'язові волокна в периферичній частині пухлини; 5 – незмінена м'язова тканина; 6 – слабо зафарбовані м'язові волокна. Фарбування гематоксиліном 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. 3.13).

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. 3.14).

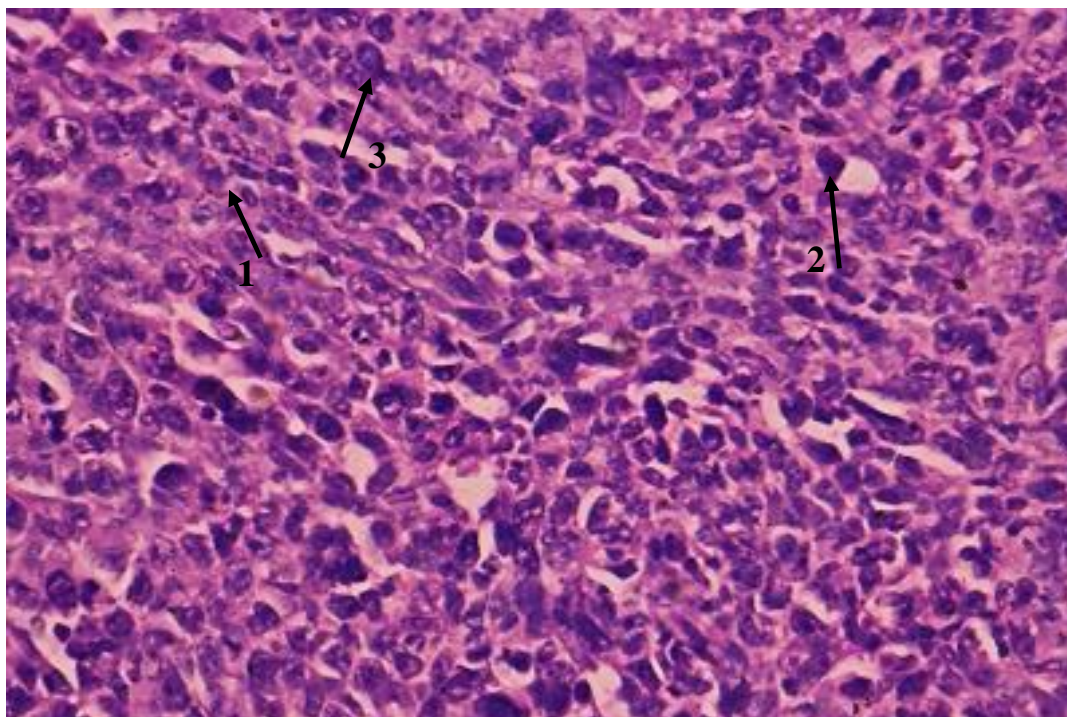


Рис. 3.14. Центральна частина пухлини на 18-ту добу трансплантації при застосуванні МСК. Гістопрепарат: 1 – оксифільна цитоплазма клітин; 2 – набряк ядра клітини пухлини; 3 – маргінація хроматину в ядрах клітин пухлини. Фарбування гематоксиліном Караці та еозином,  $\times 400$ .

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 ядерця. 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. 3.15).

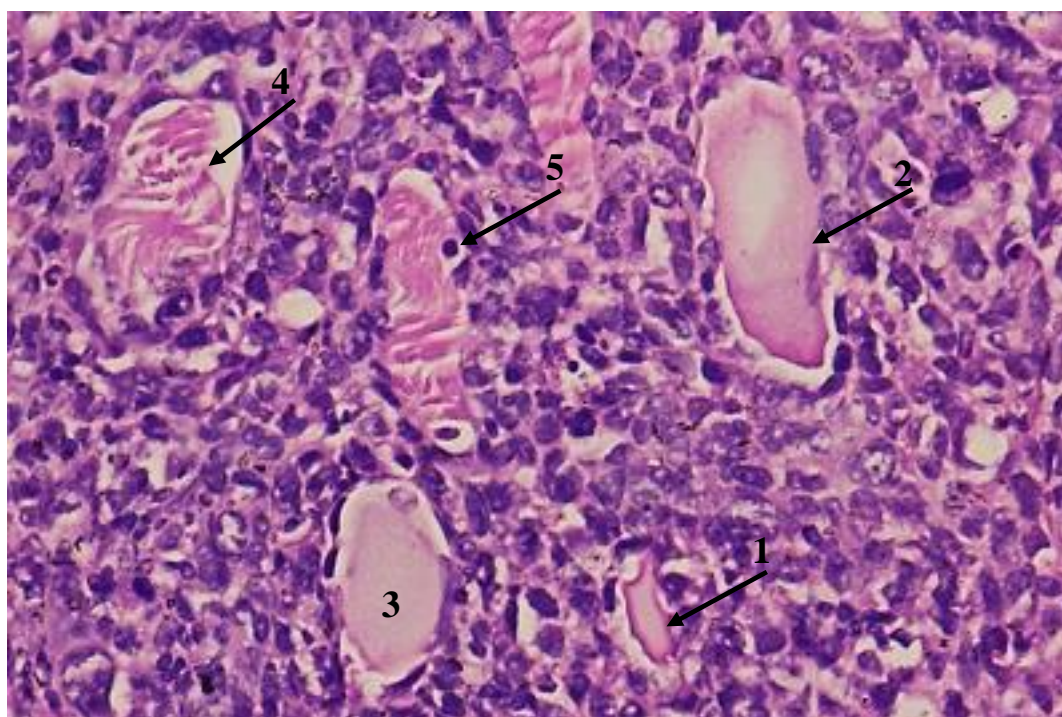


Рис. 3.15. Периферична частина пухлини на 18 добу. Гістопрепарат: 1 – атрофоване м'язове волокно; 2 – м'язове волокно з рівномірно зниженим вмістом міоглобіну; 3 – м'язове волокно з нерівномірно зниженим вмістом міоглобіну; 4 – фрагментація м'язового волокна; 5 – проникнення клітини

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. 3.16).

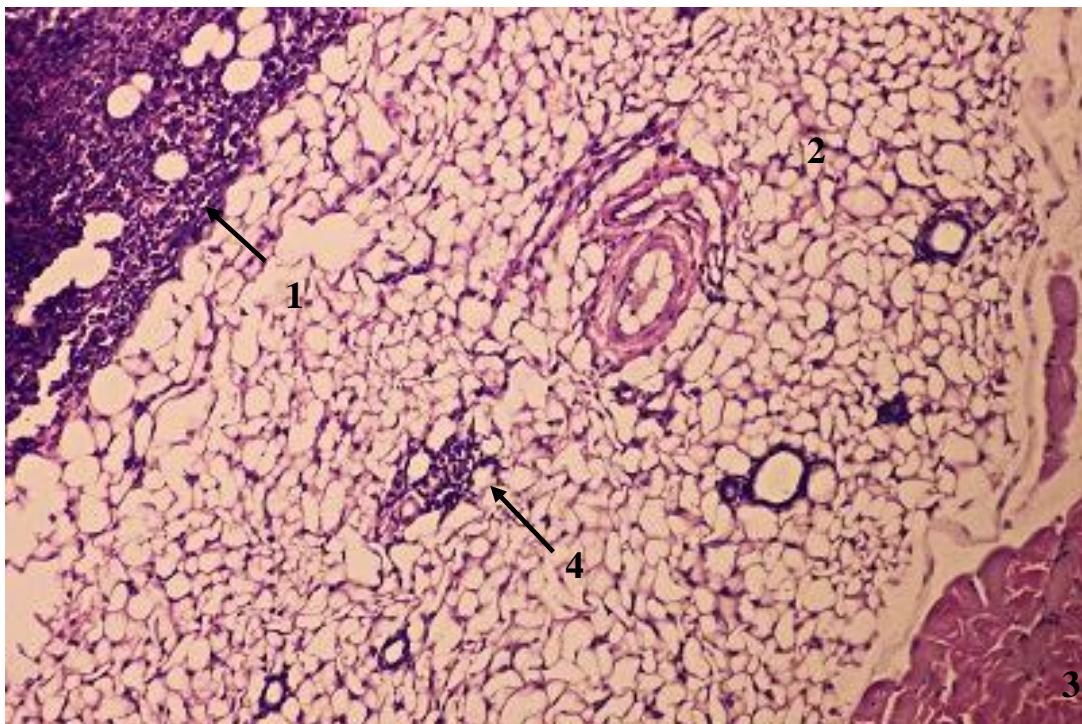


Рис. 3.16. Скелетний м'яз миші з трансплантованою карциномою легені Льюїс на 24-ту добу. Гістопрепарат: 1 – межа пухлини; 2 – міжм'язова пухка волокниста сполучна тканина; 3 – інтактний м'яз; 4 – вогнище пухлинних клітин. Фарбування гематоксиліном Караці та еозином,  $\times 50$ .

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. 3.17, 3.18).

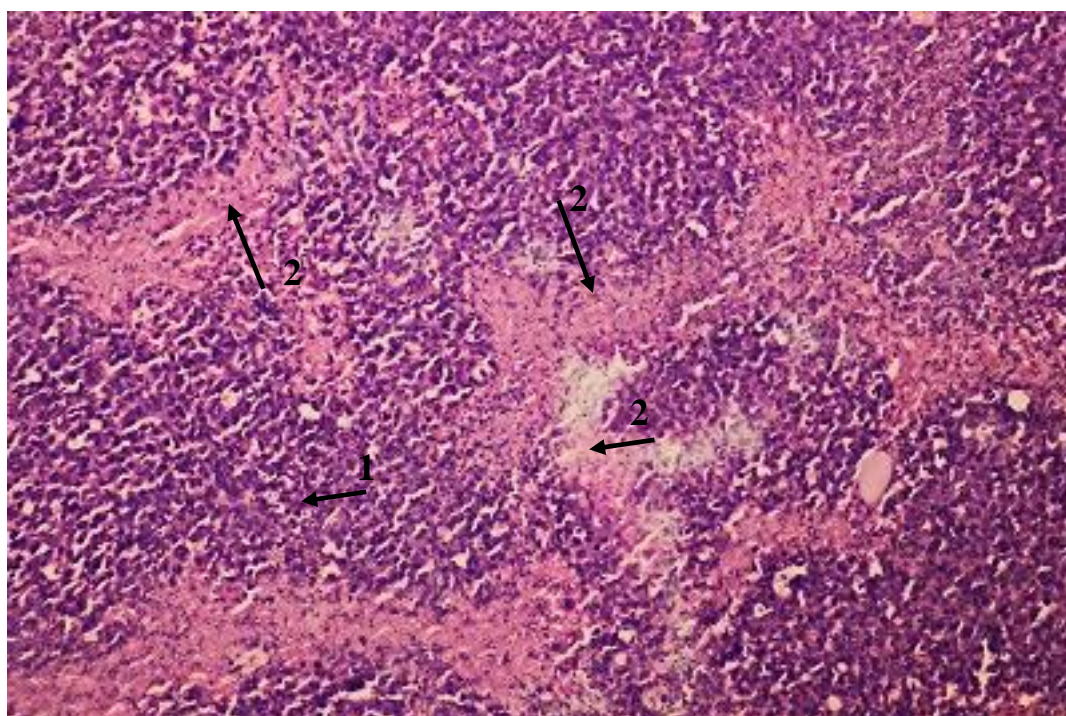


Рис. 3.17. Центральна частина пухлини на 24 добу. Гістопрепарат: 1 – розріджене розташування клітин пухлини; 2 – вогнище некрозу клітин пухлини. Фарбування гематоксиліном Караці та еозином,  $\times 100$ .

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. 3.17). 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.

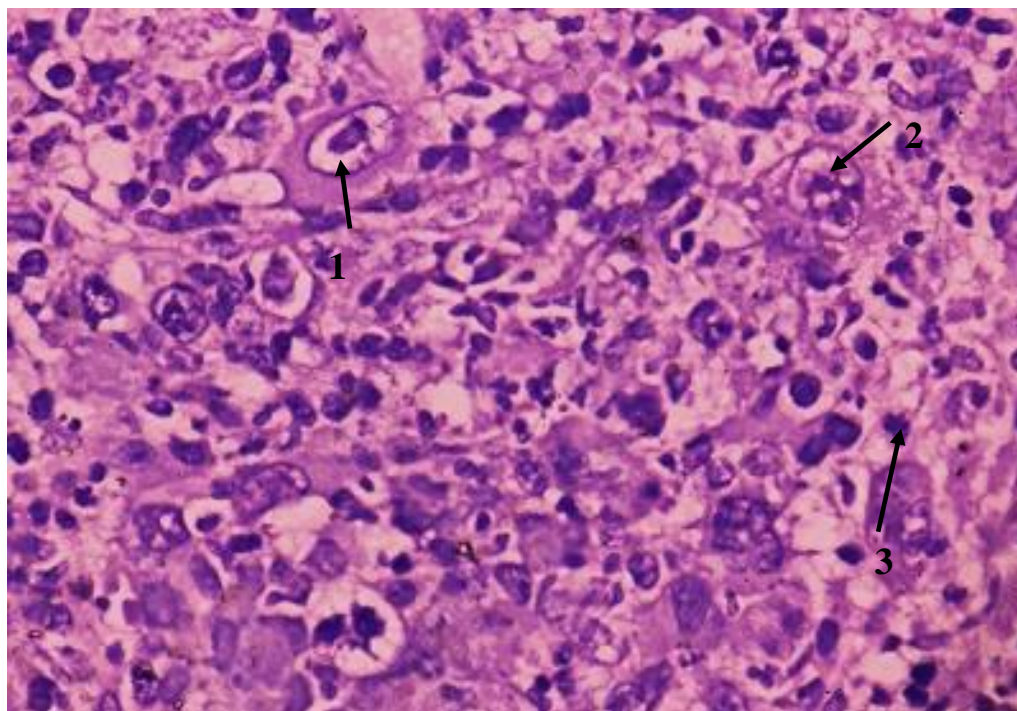


Рис. 3.18. Периферична частина пухлини на 24 добу. Гістопрепарат: 1 – набряк ядра клітин пухлини; 2 – вакуолізація цитоплазми клітин пухлини; 3 – ядра клітин пухлини в стані рексису. Фарбування гематоксиліном Караці та еозином,  $\times 400$ .

На периферії пухлини виявлялися численні незарощені клітинами ділянки, які за розмірами та формою відповідали інтактним м'язовим волокнам (рис. 3.19).

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. 3.20).

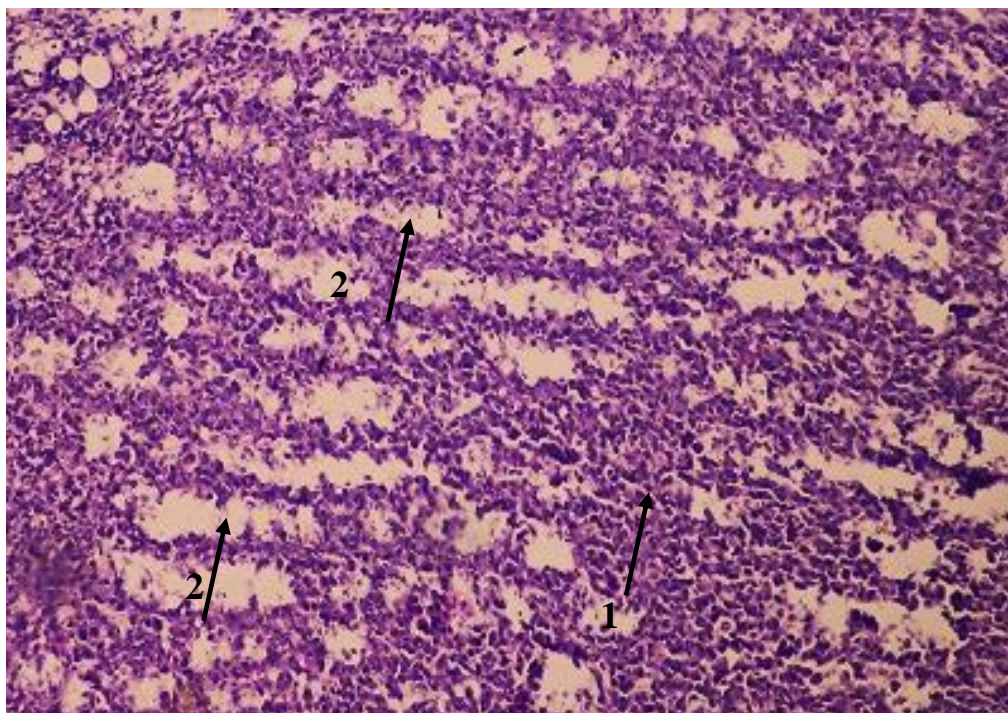


Рис. 3.19. Периферична частина пухлини на 24 добу. Гістопрепарат: 1 – клітини пухлини; 2 – незарощена клітинами пухлини ділянка лізованого м'язового волокна. Фарбування гематоксилином Караці та еозином,  $\times 100$ .

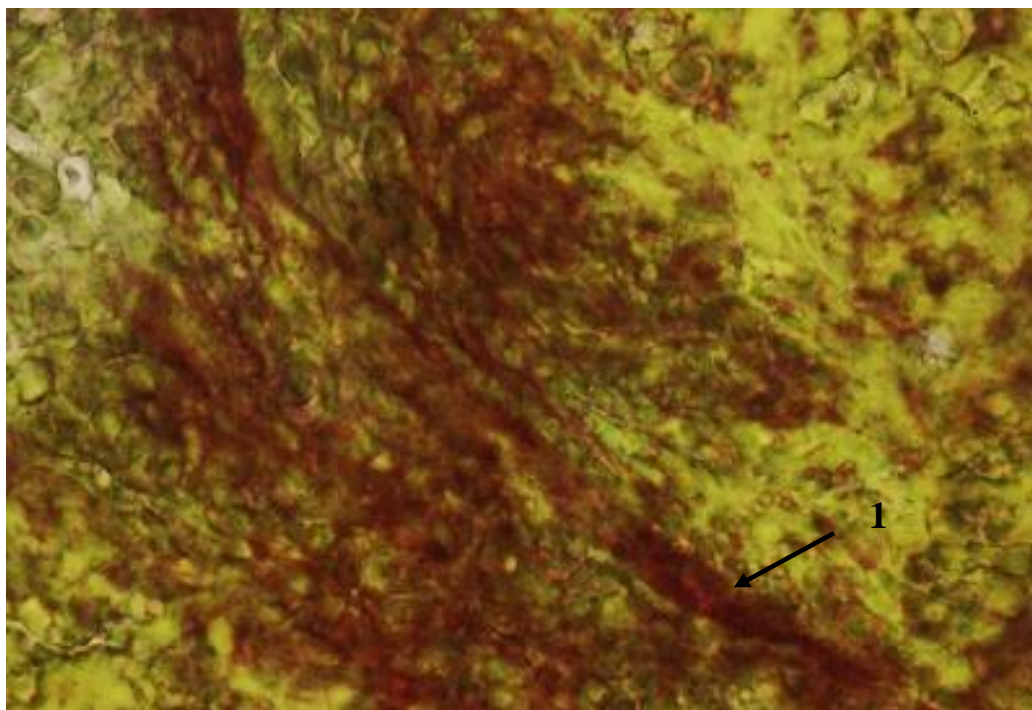


Рис. 3.20 Периферична частина пухлини на 24 добу. Гістопрепарат: 1 – пучки колагенових волокон між клітинами пухлини. Фарбування за Ван Гізон,  $\times 400$ .

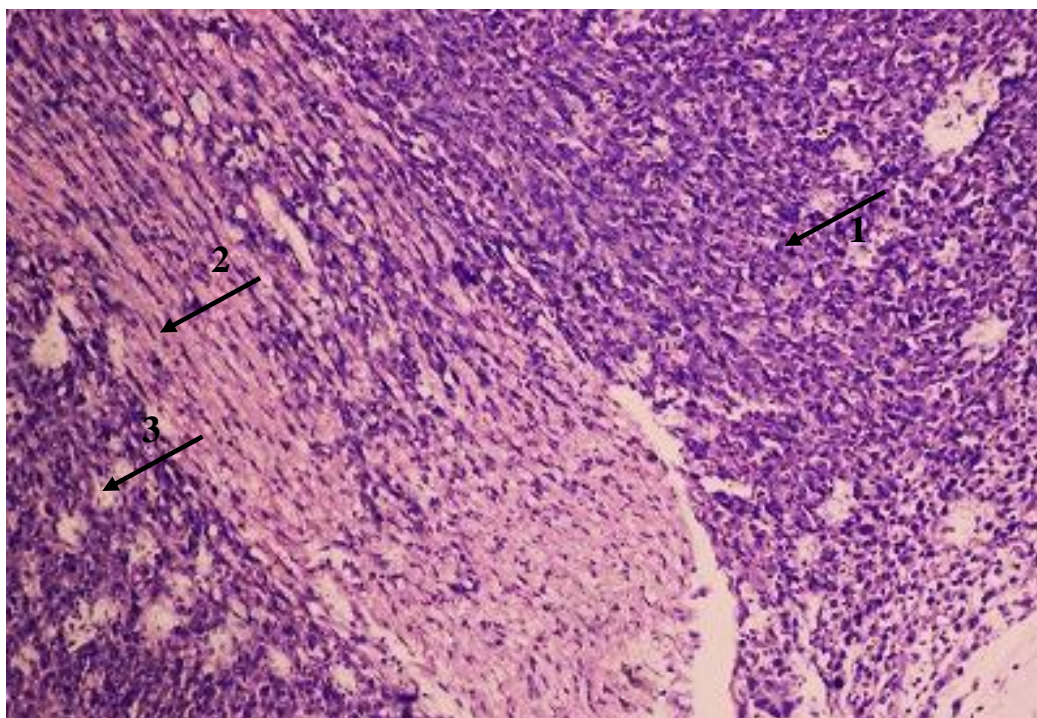


Рис. 3.21. Периферична частина пухлини на 24 добу. Гістопрепарат: 1 – клітини пухлини; 2 – пухка волокниста сполучна тканина; 3 – незарощені клітинами пухлини ділянки лізованих м'язових волокон. Фарбування гематоксиліном Караці та еозином,  $\times 50$ .

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. 3.22).

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. 3.23).

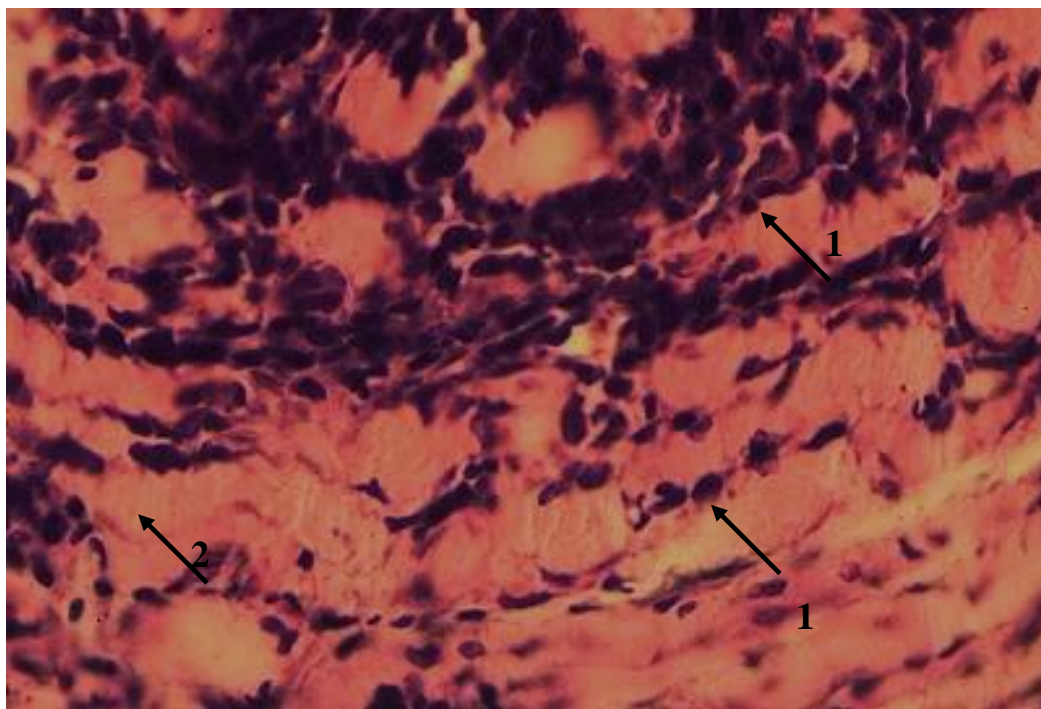


Рис. 3.22. Периферична частина пухлини на 24 добу. Гістопрепарат: 1 – клітини пухлини; 2 – м'язові волокна. Фарбування гематоксиліном Караці та еозином,  $\times 400$ .

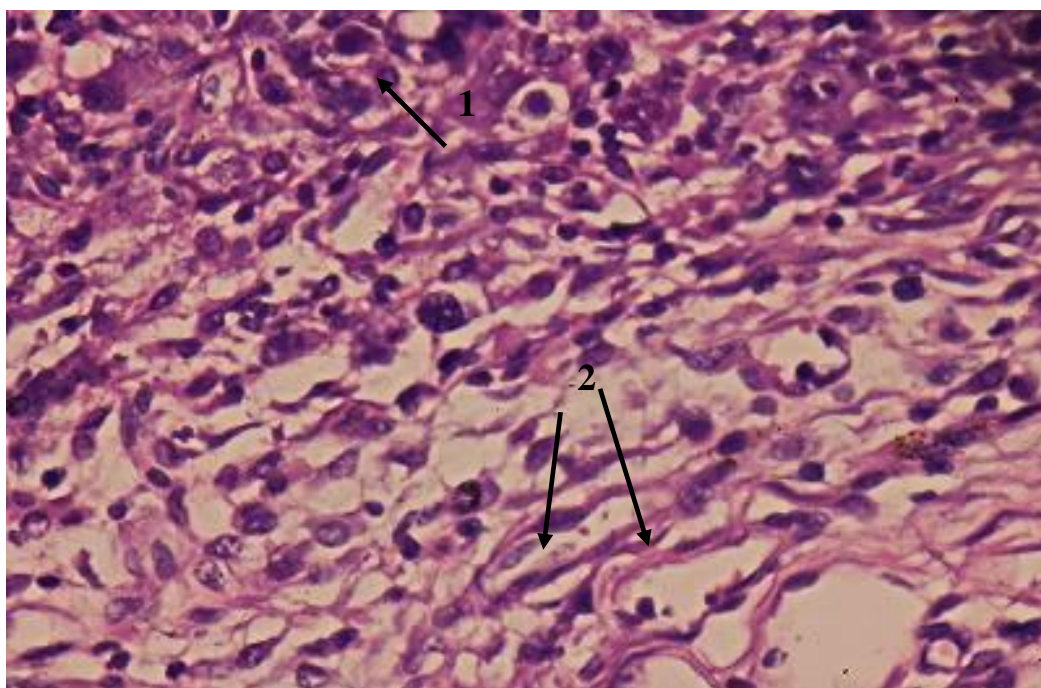


Рис. 3.23. Межа пухлини на 24 добу. Гістопрепарат: 1 – клітини пухлини; 2 – фібробласти. Фарбування гематоксиліном Караці та еозином,  $\times 400$ .

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 неуразених 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. 3.11).

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 3.11

**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. 3.24).

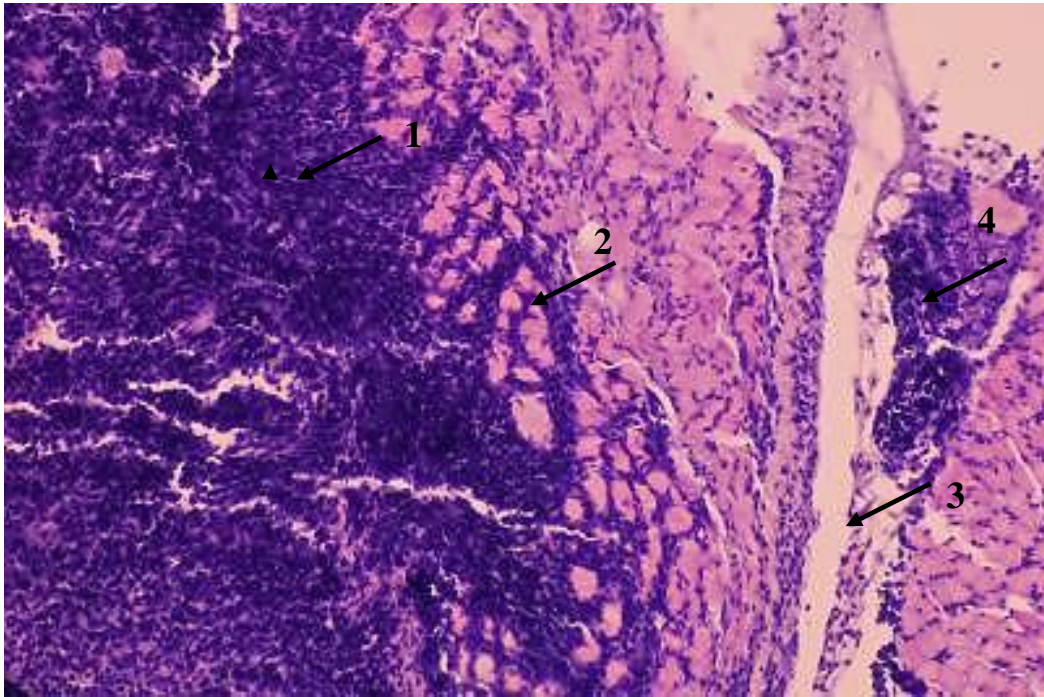


Рис. 3.24. Селетний м'яз миші з трансплантованою карциномою легені Льюїс на 18-ту добу при застосуванні МСК. Гістопрепарат: 1 – первинне вогнище пухлинного росту; 2 – проникнення пухлинних клітин між м'язовими волокнами; 3 – міжм'язова пухка волокниста сполучна тканина; 4 – дочірній осередок пухлинного 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. 3.25).

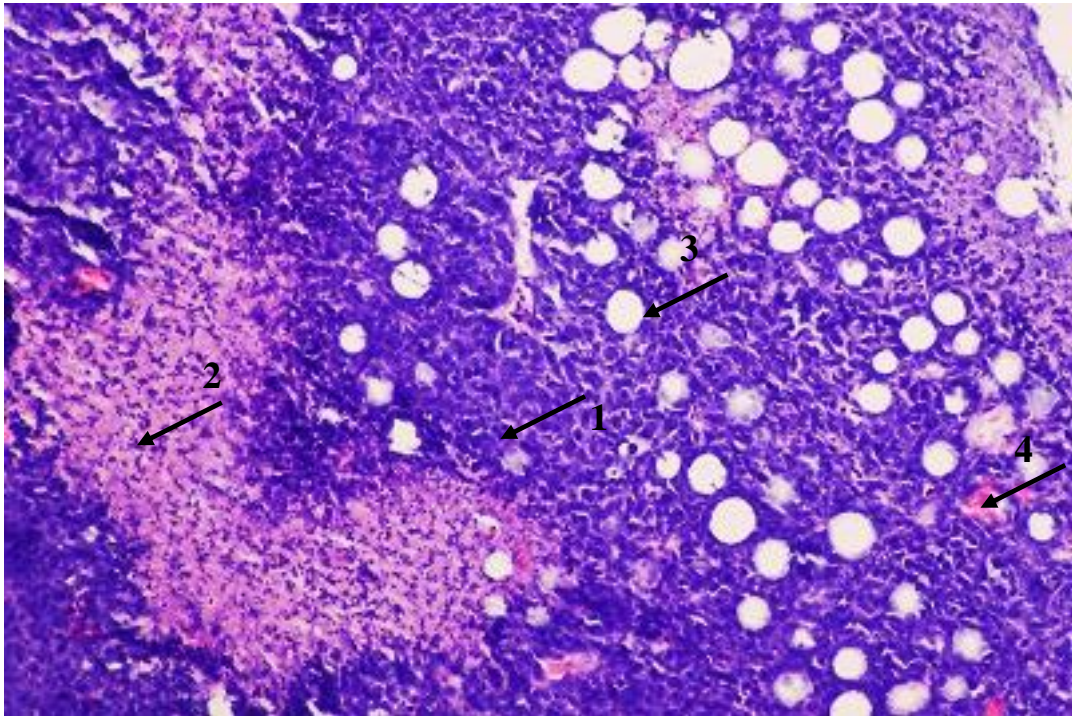


Рис. 3.25. Скелетний м'яз миші з трансплантованою карциномою легені Льюїс на 18 добу при застосуванні МСК. Гістопрепарат: 1 – клітини пухлини; 2 – вогнище некрозу клітин пухлини; 3 – лізовані м'язи; 4 – кровоносна судина. Фарбування гематоксиліном Караці та еозином,  $\times 50$ .

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. 3.26).

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 базофільна, 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.

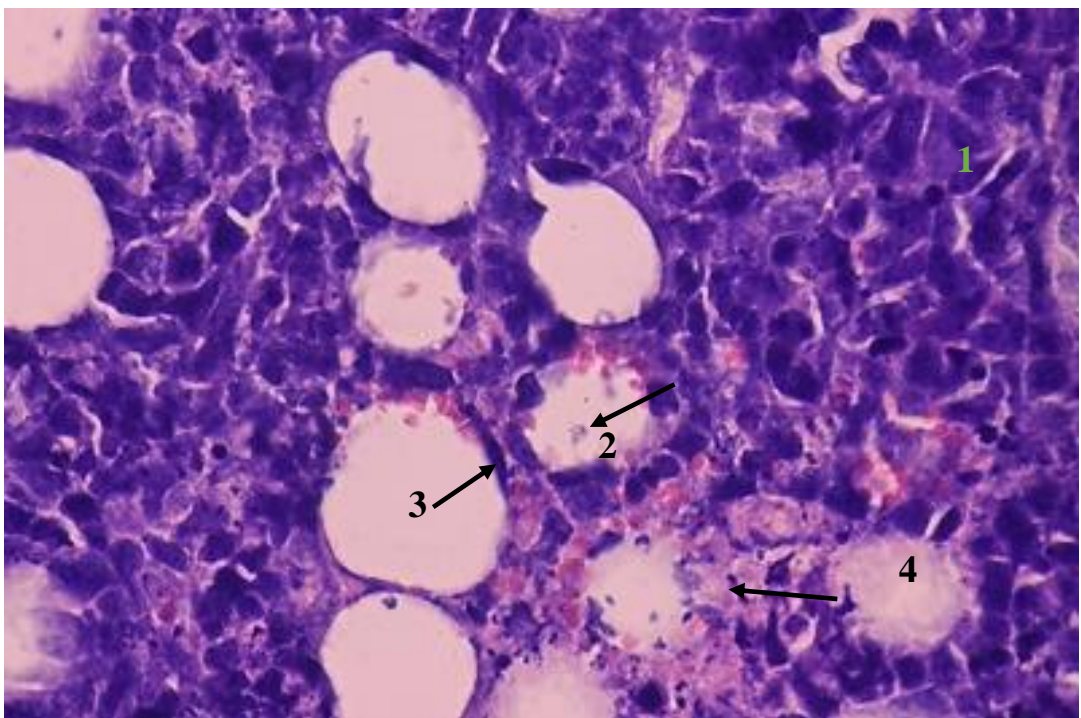


Рис. 3.26. Периферична частина пухлини на 18 добу при застосуванні МСК. Гістопрепарат: 1 – клітини пухлини; 2 – кровоносна судина капілярного типу; 3 – ендотеліоцит; 4 – осередок некрозу. Фарбування гематоксиліном Караці та еозином,  $\times 400$ .

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. 3.27).

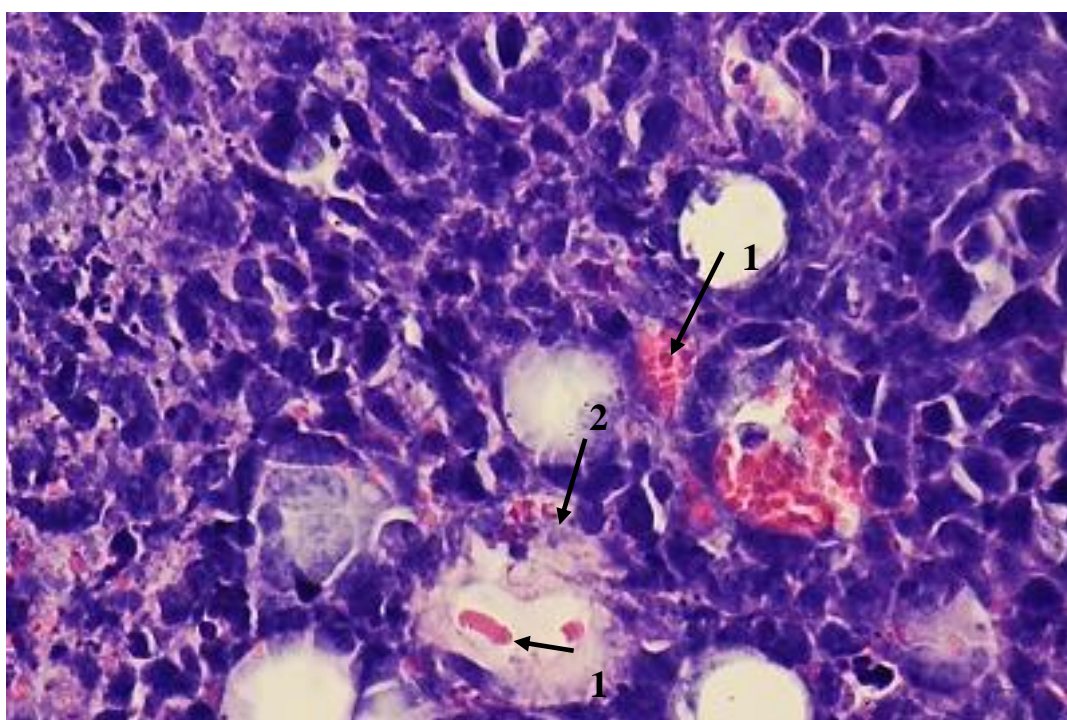


Рис. 3.27. Периферична частина пухлини на 18 добу при застосуванні МСК. Гістопрепарат: 1 – склеювання еритроцитів у просвіті кровоносної судини; 2 – часткова втрата гемоглобіну еритроцитами. Фарбування гематоксиліном Караці та еозином,  $\times 400$ .

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).

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. 3.28).

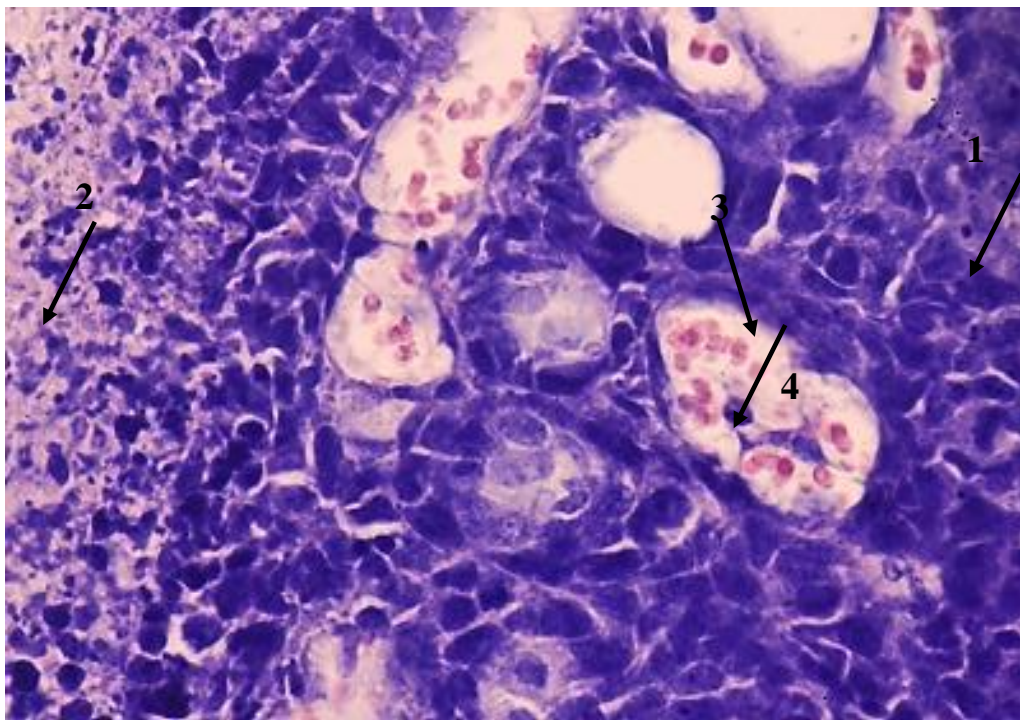


Рис. 3.28. Периферична частина пухлини на 18 добу при застосуванні МСК. Гістопрепарат: 1 – клітини пухлини; 2 – некроз клітин пухлини; 3 – кровоносна судина; 4 – клітина пухлини в просвіті кровоносної судини. Фарбування гематоксиліном Караці та еозином,  $\times 400$ .

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. 3.29). На нашу думку це свідчить про зростання ступеню злоякісності пухлини і її агресивності.

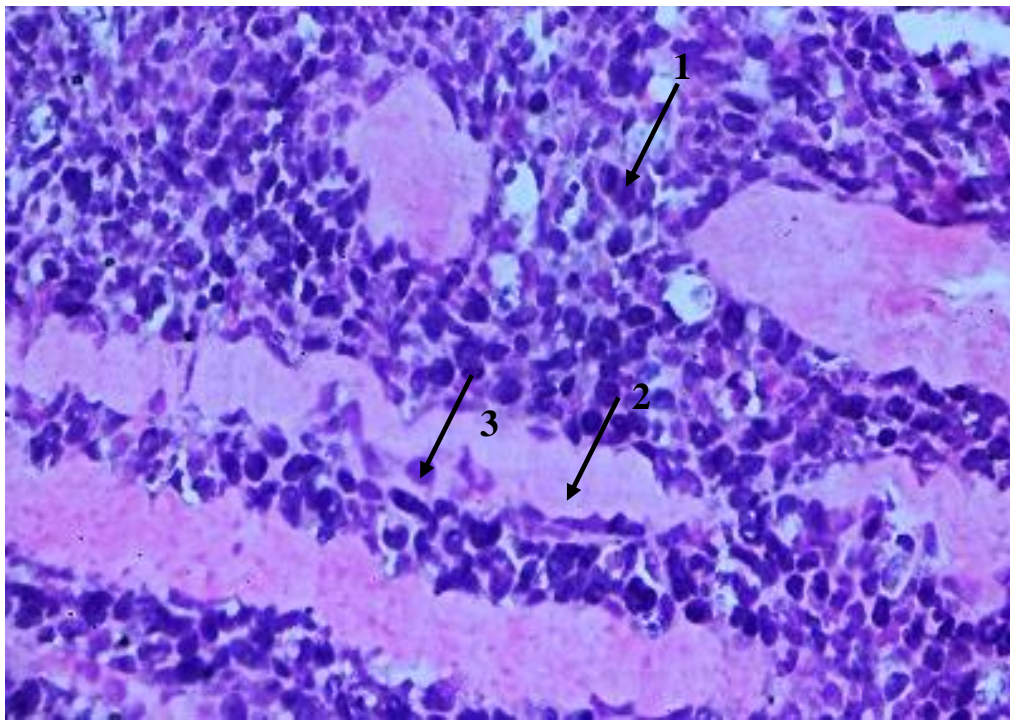


Рис. 3.29. Периферична частина пухлини на 18 добу при застосуванні МСК. Гістопрепарат: 1 – клітини пухлини; 2 – гіпохромне м'язове волокно; 3 – проникнення клітин пухлини в м'язове волокно. Фарбування гематоксиліном Караці та еозином,  $\times 400$ .

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. 3.30).

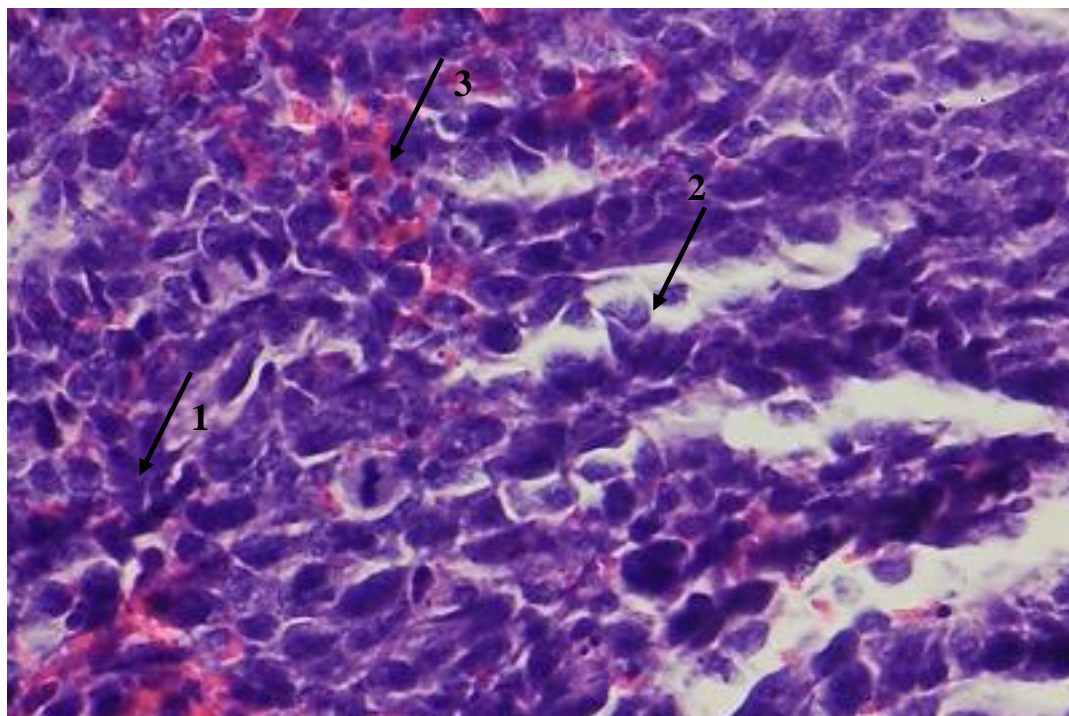


Рис. 3.30. Периферична частина пухлини на 18-ту добу при застосуванні МСК. Гістопрепарат: 1 – клітини пухлини; 2 – розростання клітин пухлини на місці м'язового волокна; 3 – склеєні еритроцити. Фарбування гематоксиліном Караці та еозином,  $\times 400$ .

Між клітинами пухлини в різних її ділянках виявлялись скупчення еритроцитів, які в усіх випадках були склеєними в досить великі агрегати (див. рис. 3.31).

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.

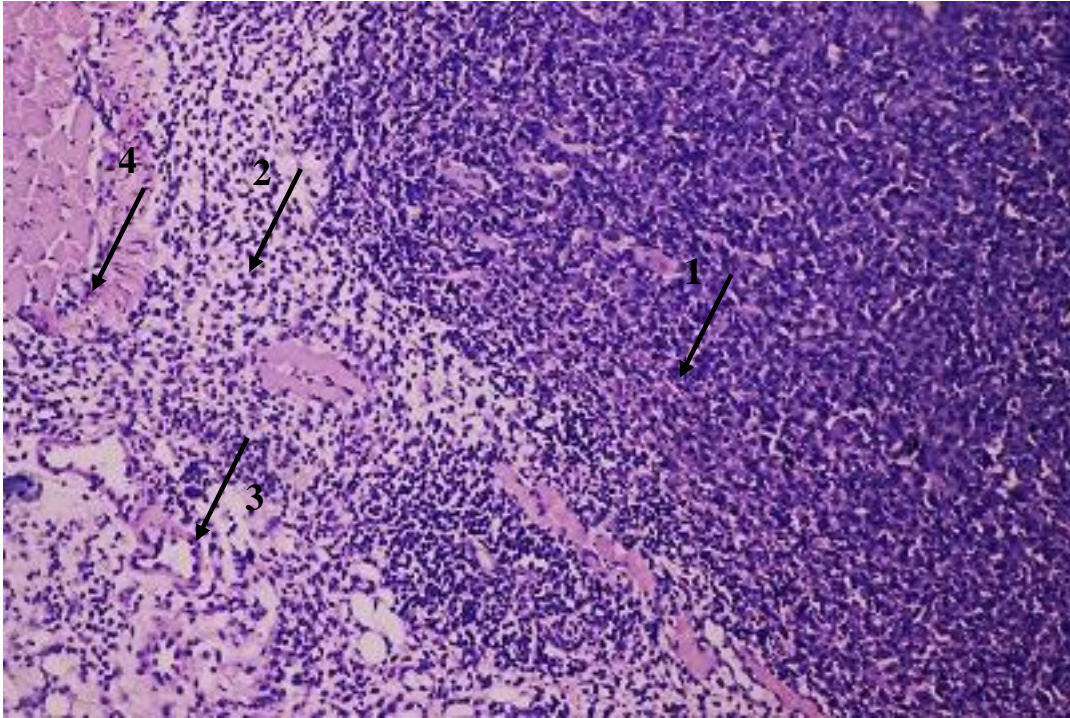


Рис. 3.31. Периферична частина пухлини на 24-ту добу при застосуванні МСК. Гістопрепарат: 1 – клітини пухлини; 2 – інфільтрація міжм'язової клітковини клітинами пухлини; 3 – клітини пухлини в просвіті вени; 4 – інфільтрація клітинами пухлини сусідньої частини м'яза. Фарбування гематоксиліном Караці та еозином,  $\times 50$ .

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. 3.32).

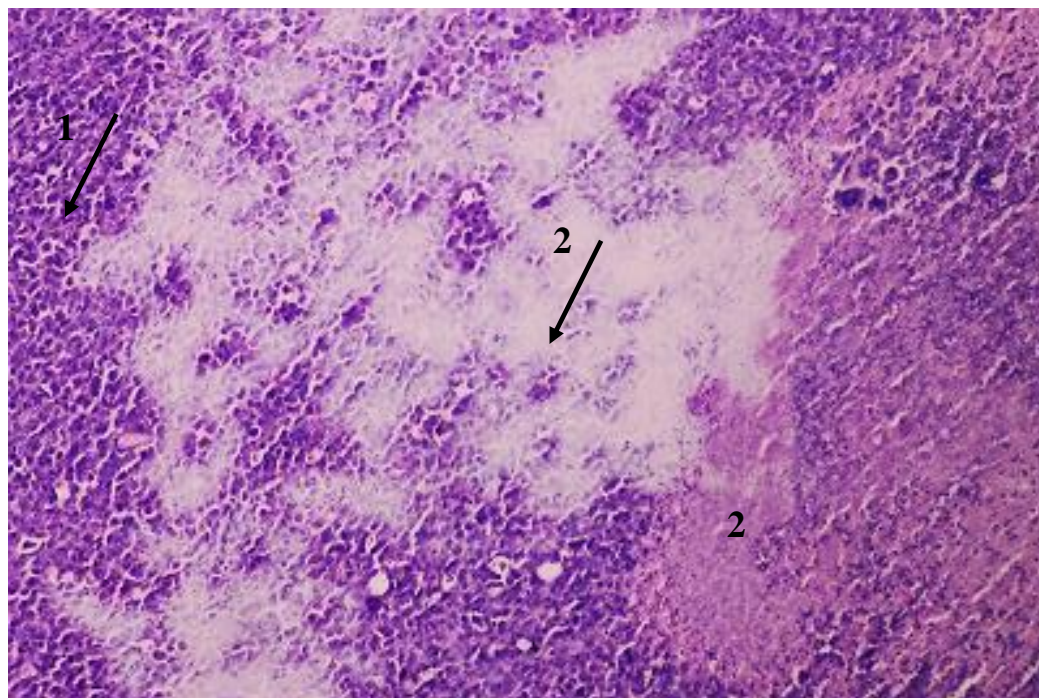


Рис. 3.32. Центральна частина пухлини на 24 добу при застосуванні МСК. Гістопрепарат: 1 – клітини пухлини; 2 – вогнище некрозу клітин пухлини. Фарбування гематоксиліном Караці та еозином,  $\times 100$ .

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.

У центральній частині пухлини виявлялись вогнища некрозу великих розмірів, які займали більше ніж поле зору при збільшенні мікроскопу  $\times 100$  (рис. 3.33, рис. 3.34).

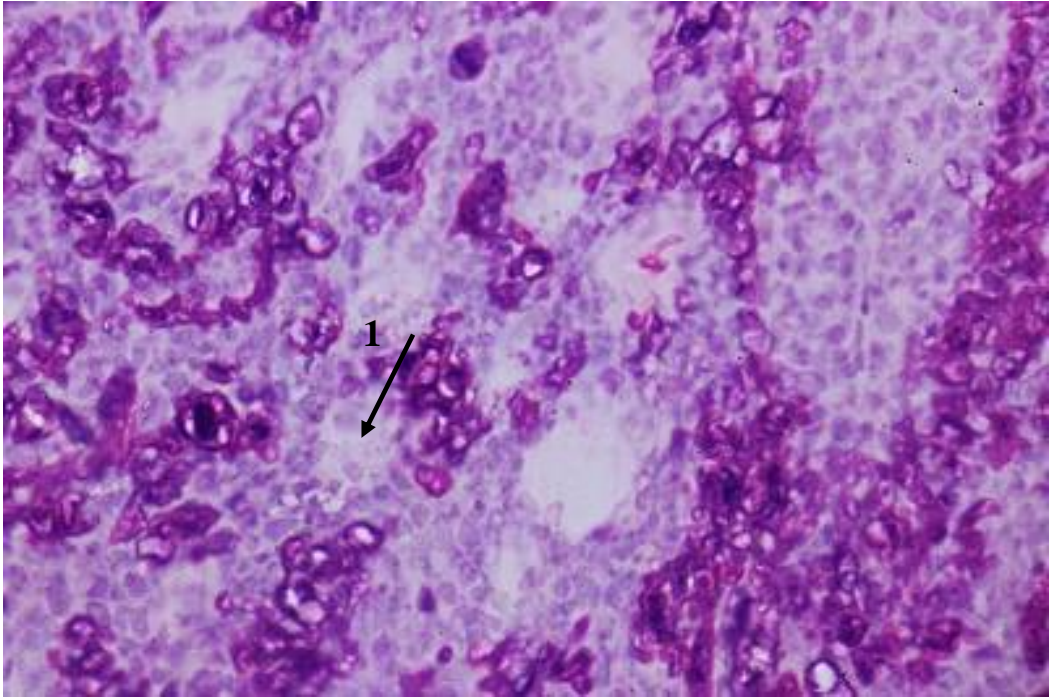


Рис. 3.33. Центральна частина пухлини на 24 добу при застосуванні МСК. Гістопрепарат: 1 - некротизовані клітини пухлини. Фарбування гематоксилином Караці та еозином,  $\times 400$ .

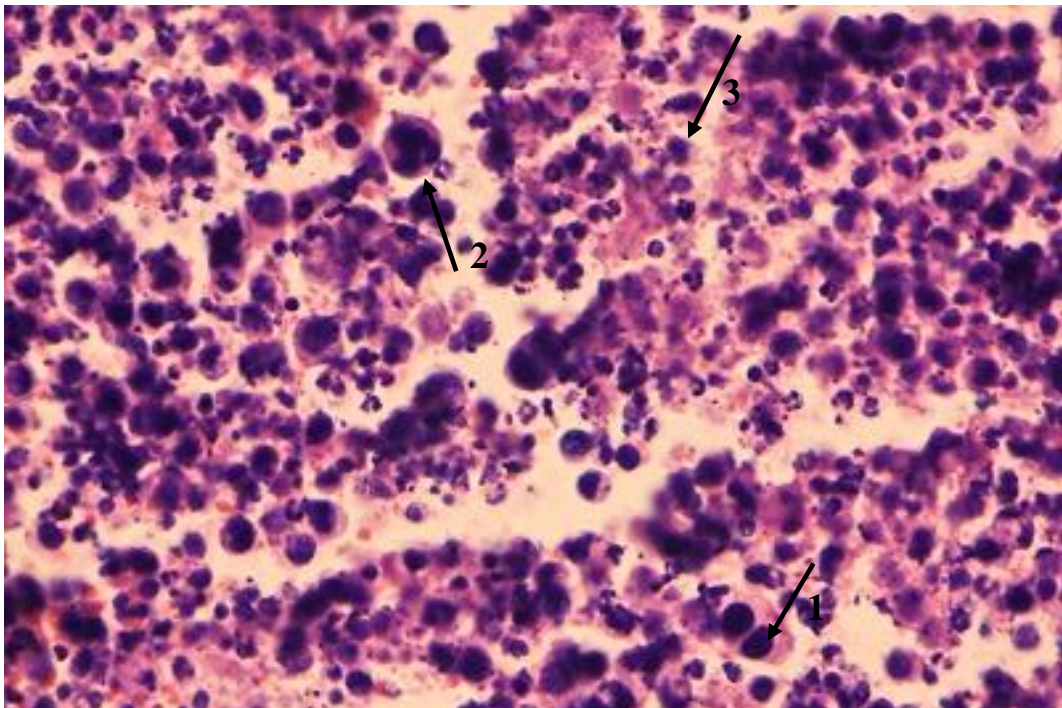


Рис. 3.34. Центральна частина пухлини на 24 добу при застосуванні МСК. Гістопрепарат: 1 – двоядерна клітина пухлини; 2 – багатоядерна клітина пухлини; 3 – некроз клітин пухлини з каріорексисом. Фарбування гематоксилином Караці та еозином,  $\times 400$ .

У таких ділянках також виявлялась досить значна кількість двох- та багатоядерних клітин, що свідчить про порушення їх поділу (рис. 3.79).

Місцями виявлялися скупчення еритроцитів, частина з яких була лізована (рис. 3.35, 3.36).

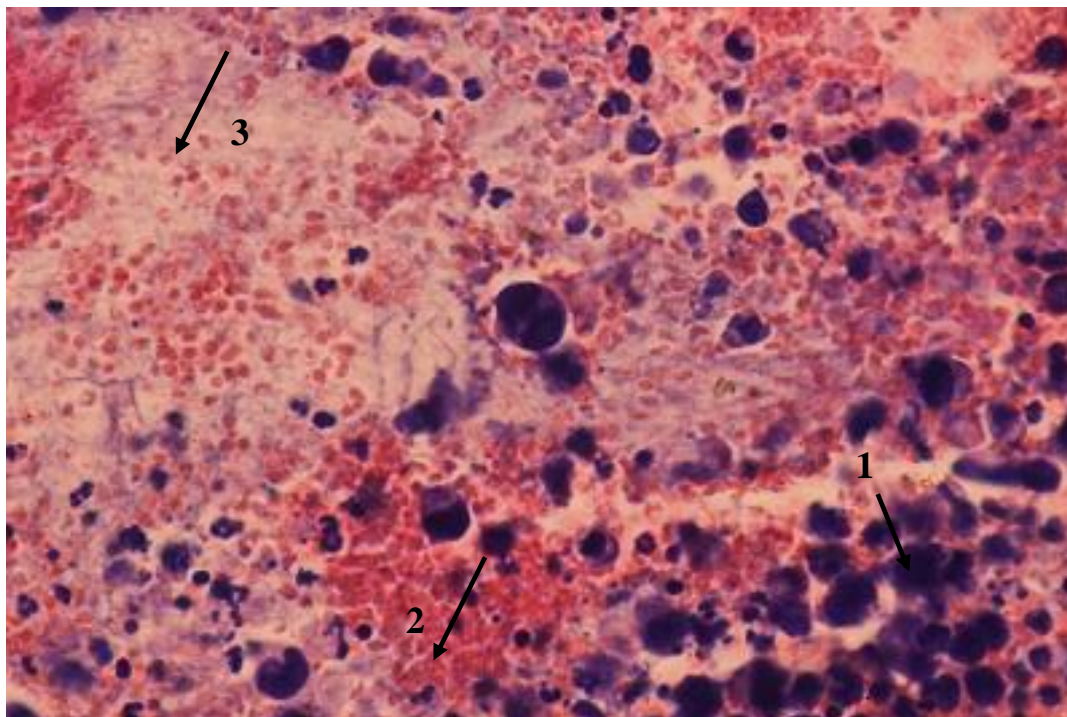


Рис. 3.35. Центральна частина пухлини на 24 день при застосуванні МСК. Гістопрепарат: 1 – клітини пухлини; 2 – еритроцити; 3 – вогнище некрозу. Фарбування гематоксиліном Караці та еозином,  $\times 400$ .

Ділянки некрозу пухлинних клітин розташовувались поблизу судин з наявністю еритроцитів. З цього можна зробити висновок, що некроз пухлинних клітин не пов'язаний безпосередньо з кисневим голодуванням.

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.

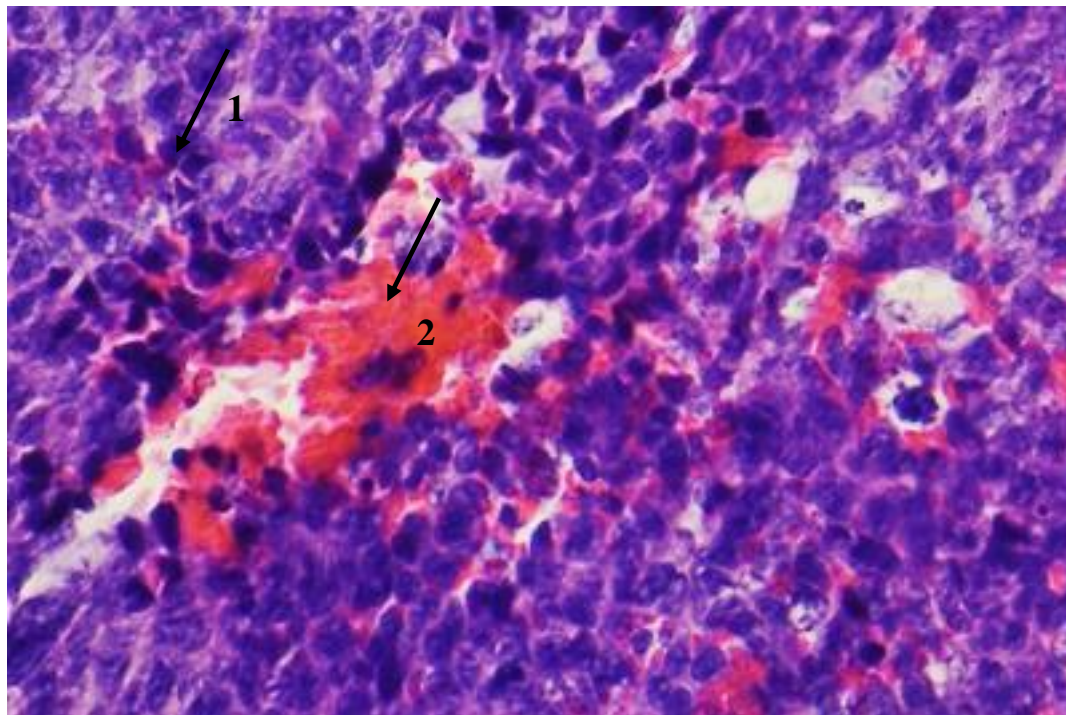


Рис. 3.36. Периферична частина пухлини на 24 добу при застосуванні МСК. Гістопрепарат: 1 – клітини пухлини; 2 – еритроцити. Фарбування гематоксиліном Караці та еозином,  $\times 400$ .

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. 3.37).

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. 3.38).

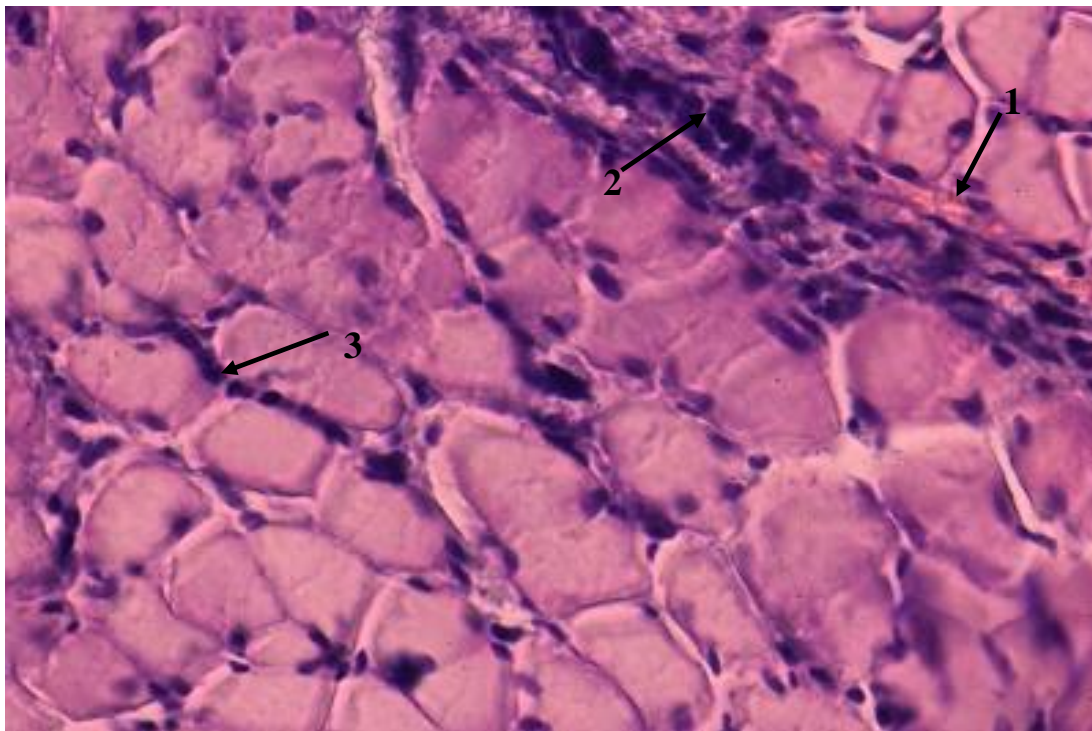


Рис. 3.37. М'яз миші з трансплантованою карциною легені Льюїс на 24 добу при застосуванні МСК. Гістопрепарат: 1 – кровоносний капіляр; 2 – пухлинні клітини по ходу кровоносного капіляру; 3 – пухлинні клітини між м'язовими волокнами. Фарбування гематоксилином Караці та еозином,  $\times 400$ .

Крім того, в цей термін спостережень у міжм'язовій клітковині утворювались невеликі за розмірами дочірні вогнища пухлинного росту – метастази (рис. 3.39). Це засвідчує, що пухлина в процесі своєї прогресії набувала властивості метастазувати в пухку волокнисту сполучну тканину.

У таблиці 3.12 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.

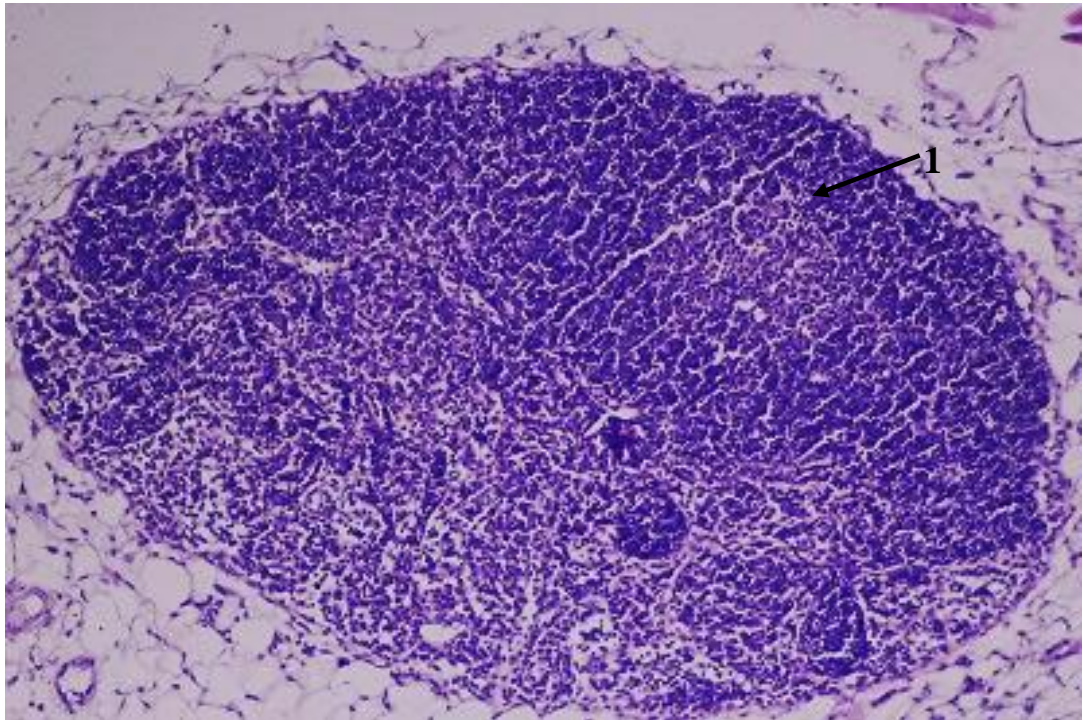


Рис. 3.39. М'яз миші з трансплантованою карциномою легені Льюїс на 24 добу при застосуванні МСК. Гістопрепарат: дочірнє вогнище пухлинного росту в міжм'язовій клітковині. Фарбування гематоксиліном Караці та еозином,  $\times 50$ .

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.

Таблиця 3.12

**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.

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 3.13, 3.14 підсумовано основні відмінності морфологічних особливостей клітин пухлини карциноми легені Льюїс залежно від впливу алогенних МСК на організм реципієнтів-пухлиноносіїв.

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 сладжу 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.

Таблиця 3.13

**Морфометричні показники первинної карциноми  
легені Льюїс за введення МСК на 18-ту та 24-ту добу дослідження,  
M±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.

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.

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 3.14

**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 первинної 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. 3.15).

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 3.15

**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 <sub>0</sub> /G <sub>1</sub>	G <sub>2</sub> /M	S	G <sub>2</sub> /M + S
контрольна група (LLC)					
Диплоїдні	40,80±0,80	76,65±3,45	16,13±1,28	7,22±2,23	23,35±3,4 5
Анеуплоїдні	59,20±0,80	43,82±2,89	10,58±0,05	45,59±2,90	56,17±2,9 0
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±3,4 2*

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<sub>2</sub>/M + S між тваринами дослідної і контрольної груп. За впливу МСК кількість клітин проліферативного пулу G<sub>2</sub>/M + S становить 68,02 ± 3,42 % проти 56,17 ± 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  $29,62 \pm 6,50$  мм<sup>3</sup> ( $p < 0,05$ ) 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 G<sub>2</sub>/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 ЧЕТВЕРТИЙ

### ХАРАКТЕРИСТИКА ПУХЛИННОГО ПРОЦЕСУ ЗА ВПЛИВУ АЛОГЕННИХ МЕЗЕНХІМНИХ СТОВБУРОВИХ КЛІТИН НА ПРИКЛАДІ КАРЦИНОМИ ЛЕГЕНІ ЛЬЮЇС

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 естрогену, а у підшкірній, навпаки, естрадіолу [208]. Silva et al. встановили, що вміст таких цитокінів, як ІЛ-6, колоніестимулюючий 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 kota» (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, Neo 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  $\beta$ -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  $\beta$ -катеніну з переважною локалізацією у ядрі на ранніх стадіях культивування. Це засвідчує про активний стан Wnt/ $\beta$ -катенін сигнального шляху трансдукції внутрішньоклітинного сигналу у МСК культури жирової тканини на ранніх стадіях культивування. Wnt/ $\beta$ -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/ $\beta$ -катенін сигнального шляху є стабілізація  $\beta$ -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/ $\beta$ -катенін сигнальний шлях зі зв'язування Frizzled рецепторів поверхневих мембран зовнішніми лігандами родини Wnt. За відсутності зв'язку між Frizzled і Wnt-лігандом  $\beta$ -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  $\beta$ -катенін і сприяє його деградації у протеосомах. Коли відбувається взаємодія рецепторів Frizzled і Wnt-лігандів, комплекс «деструкції» руйнується, фосфорилування  $\beta$ -катеніна не відбувається і він може виконувати свою функцію як коактиватора транскрипції.

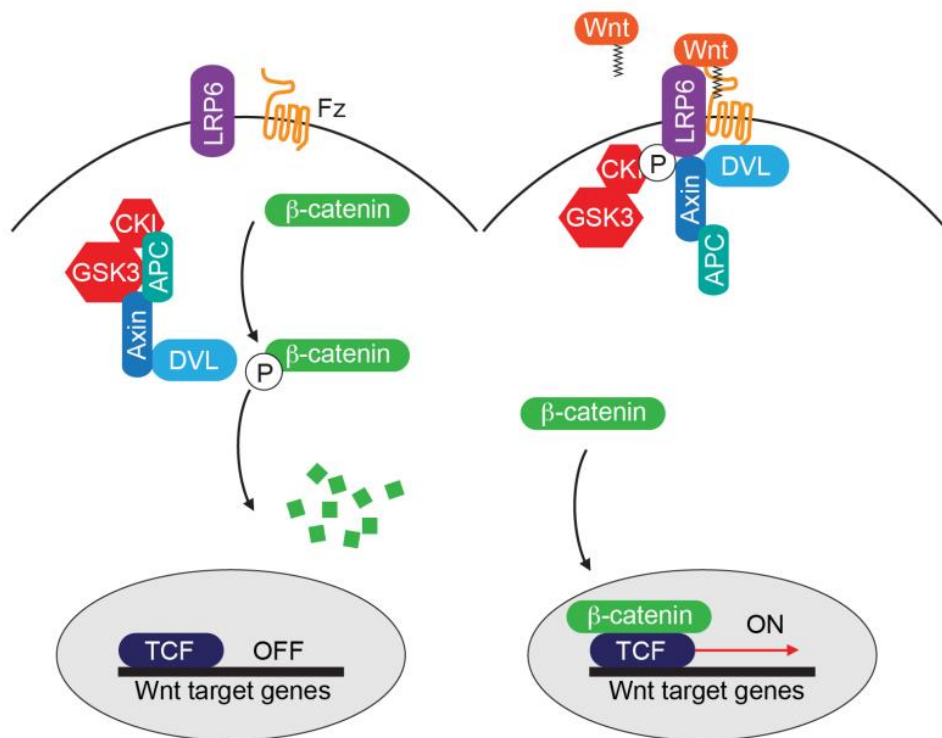


Рис. 4.1 Схеми Wnt/ $\beta$ -катенін сигнального шляху у нематоди *Caenorhabditis elegans* (за даними он-лайн підручника Wormbook.org; wntsignaling.html 10.1895/wormbook.1.7.1)

Висока активність Wnt/ $\beta$ -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-x1 і Bax 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-СoА десатурази (Stearoyl-CoA desaturase) (SCD) [173].

SCD у комплексі з нікотинамідаденіндинуклеотидом (NADH), цитохромом b<sub>5</sub> та флавопротеїном цитохром b<sub>5</sub> редуктазою індукує появу подвійного зв'язку у насичених жирних кислотах [356, 393]. Утворені олеїнова і пальмітолеїнова кислота – найбільш представлені моноєнові кислоти і є субстратами для синтезу різноманітних ліпідів, включаючи фосфоліпиди, 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/ $\beta$ -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 гепатоцеллюлярної карциноми гризунів показано, що  $\beta$ -катенін, як фактор транскрипції, підсилює експресію гена SCD, а продукти фермента SCD – мононенасичені жирні кислоти, в свою чергу, стабілізують  $\beta$ -катенін [419]. Ці дані також узгоджуються з отриманими нами результатами імуногістохімічного визначення експресії окремих антигенів, які засвідчують на користь активного стану Wnt/ $\beta$ -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 (C18:2n6c) відбувається утворення спочатку гама-лінолевої кислоти (C18:3n6c), потім дігомогама-лінолевої кислоти (C20:3n6c), арахідонової (C20:4n6c) і докозатетраєнової (C22:4n6c) 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 (C18:3n3c) перетворюється в докозапентаєнову (C22:5n3) і докозагексаєнову (C22:6n3) 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/ $\beta$ -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 трансплантували  $10^4$  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. Літлом 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: МСК 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 костимуляторних 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 ангиогенез, 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 мітохондрії, 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 періфокальними 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 E<sub>2</sub>, 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 4Т1) 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-1) 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 англійській 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 стромы, 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 Yeو 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 первинної 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 ангиогенезу. І тому можна стверджувати, що МСК впливають на більшу частину відомих механізмів стимуляції пухлинного росту.

## ВИСНОВКИ

У монографії наведено вирішення важливої науково-практичної проблеми, а саме проведено отримання стовбурових клітин культури червоного кісткового мозку, їх комплексне дослідження 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, 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.

1. 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.

2. Функціональний стан стовбурових клітин культури червоного кісткового мозку змінюються у процесі культивування, що засвідчує початок реплікативного старіння вже з 4 пасажу і характеризується наступним: на перших пасажах культивування клітини мають веретеноподібну форму з двома довгими виростами цитоплазми, площею ядра  $154,44 \pm 6,23$ , площею клітини  $749,34 \pm 21,16$ , яка на пізніх – змінюється на зірчасту з утворенням значної кількості виростів цитоплазми (подіїв), збільшенням площі клітин вже на 4 пасажі до  $853,78 \pm 36,71$  ( $p < 0,01$ ), на 12 – до  $2304,40 \pm 280,12 \mu\text{m}^2$  ( $p < 0,001$ ), за рахунок цитоплазми; біля ядра візуалізується комплекс Гольджі, що засвідчує активний стан проліферуючих клітин; знижується

життєздатність клітин на 7 пасажі до  $88,33 \pm 1,94$  % ( $p < 0,01$ ) та їх стійкість до апоптозу, індукованого культивуванням у середовищі без додавання сироватки ( $p < 0,01$ ); зменшується показник ядерно-цитоплазмового співвідношення і становить на 4 пасажі  $0,2262 \pm 0,0074$  ( $p < 0,01$ ), на 12 – до  $0,0608 \pm 0,0066$  ( $p < 0,001$ ) через збільшення площі цитоплазми клітини; збільшується вміст апоптичних клітин, що проявляли чутливість до безсироваткового культивування, на 7 та 12 пасажах культивування та становить  $20,67 \pm 1,55$  ( $p < 0,01$ ) та  $22,67 \pm 1,55$  % ( $p < 0,01$ ) відповідно. Підвищення чутливості клітин до апоптозу прямо корелює з індукованою відсутністю факторів росту  $r = 0,81$  ( $p < 0,01$ ).

3. 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.

4. 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.

5. Внутрішньовенне введення мезенхімних стовбурових клітин культур жирової тканини та кісткового мозку на перших етапах призводить до короточасного збільшення відносного індексу маси, вмісту лімфоїдних

клітин у тимусі та селезінці тварин-реципієнтів, які поступово відновлюються до норми; підвищення активності НАДФ-Н<sub>2</sub>-оксидази моноцитів, макрофагів.

6. 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  $29,62 \pm 6,50$  мм<sup>3</sup> ( $p < 0,05$ ) 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.

7. 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 G<sub>2</sub>/M та S –  $68,02 \pm 3,42$  % ( $p < 0,001$ ), що засвідчує більш злоякісний фенотип клітин первинної пухлини.

8. 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 каріолізісом. Вказані морфологічні зміни засвідчують активізацію онкопроцесу.

## ПРАКТИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ

1. 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.

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

3. 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.

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

## 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/6z 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 kota / 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 kota: 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 мононуклеарних 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. Стівбурові 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. Стівбурові 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 kota 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 / С. 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 / Н. К.

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. 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- $\epsilon$ -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 PGE<sub>2</sub>: 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- $\beta$  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  $\beta$ -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. Riffo-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- $\beta$  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  $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 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. (Honk 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. Altanero, 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- $\beta$  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., Saccani 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- $\gamma$ -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- $\beta$  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. Imsoonthrnruxsa, 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. Anderson, 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 PGE<sub>2</sub>-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 $\alpha$  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- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  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. Lafeber. *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. Veiseh, 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- $\kappa$ 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. Jarocho, 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. Rodrigues, 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 $\alpha$  / 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- $\beta$ : 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 $\alpha$ /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-resistance 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<sub>L</sub> / 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 E<sub>2</sub> 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 E<sub>2</sub> 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 EP<sub>2</sub> 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. Chatgialiloglu, 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<sup>+</sup>CCR5<sup>-</sup>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/ $\beta$ -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., Bjerkgvig 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<sup>+</sup> 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  $\beta$ . *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 BH<sub>3</sub> 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/ $\beta$ -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/ $\beta$ -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.

## АНОТАЦІЯ

**ВПЛИВ МЕЗЕНХІМНИХ СТОВБУРОВИХ КЛІТИН НА ПУХЛИННИЙ ПРОЦЕС НА МОДЕЛІ МЕТАСТАЗУЮЧОЇ КАРЦИНОМИ ЛЕГЕНІ ЛЬЮЇС: Монографія / Л. В. КЛАДНИЦЬКА, А. Й. МАЗУРКЕВИЧ, С. В. ВЕЛИЧКО, Р. Р. БОКОТЬКО, Т. Л. САВЧУК – К.: Видавничий центр НУБіП України, 2021. – 245 с. (Анотації українською, англійською та російською мовами).**

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

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

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

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

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

За результатами проведених досліджень встановлено, що за системного впливу алогенних мезенхімних стовбурових клітин у тварин-реципієнтів з експериментально змодельованою карциномою легені Льюїс збільшується маса первинної пухлини, загальний об'єм метастазів, відбувається швидший перехід пухлинного процесу до васкулярної стадії, що засвідчує його активізацію. Доведено причинно-наслідкову залежність трансплантації стовбурових клітин на загальний об'єм метастазів із показником сили впливу  $\eta^2x=0,74$  ( $p<0,05$ ). Встановлено порушення механізмів запрограмованої загибелі клітин первинної пухлини через зниження апоптозу; збільшення

кількості лімфоїдних клітин, асоційованих з пухлиною, які беруть участь у активації ангиогенезу в пухлинній тканині як продуценти фактору росту ендотелію судин; зміну генетичної стабільності клітин первинної пухлини мишей C57BL/6 з перещепленою метастатичною карциномою легені Льюїс за впливу стовбурових клітин, що характеризується збільшенням кількості анеуплоїдів у первинній пухлині, а також підвищенням їх умісту в фазах проліферативного пулу G<sub>2</sub>/M+S клітинного циклу, що засвідчує злякисніший фенотип клітин первинної пухлини.

**Ключові слова:** стовбурові клітини, пухлинний процес, миші.

## АННОТАЦІЯ

**Влияние мезенхимальных стволовых клеток на опухолевый процесс на модели метастазирующей карциномы легкого Льюис: Монография / Л. В. Кладницкая, А. Й. Мазуркевич, С. В. Величко, Р. Р. Бокотько, Т. Л. Савчук – К.: Издательский центр Национального университета биоресурсов и природопользования Украины, 2016. – 245 с. (Аннотации на украинском, английском и русском языках).**

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

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

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

Установлено, что стволовые клетки культуры красного костного мозга имеют различия по составу полиненасыщенных жирных кислот по сравнению

с такими жировой и нервной ткани. Доказано, что стволовые клетки культуры красного костного мозга, жировой и нервной ткани имеют общие черты спектра жирных кислот, что характерно для клеток с высоким пролиферативным потенциалом, резистентных к апоптозу; высокое соотношение мононенасыщенной олеиновой к насыщенной стеариновой кислоты (C18:1/C18:0), которое составляет 1,50–2,18 и характеризует активность фермента стеарил-коэнзим А-десатуразы и активное состояние Wnt/ $\beta$ -катенин сигнального пути; неспособность к увеличению цепи насыщенных жирных кислот.

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

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

**Ключевые слова:** стволовые клетки, опухолевый процесс, мышшь.

## ANNOTATION

**Influence of mesenchymal stem cells on the tumor process on the model of metastatic lungs Lewis carcinoma / Monograph: L. V. Kladytska, A. Y. Mazurkevich, S. V. Velychko, R. R. Bokotko, T. L. Savchuk. – K.: Publishing Center of National University of Live and Environmental Science of Ukraine, 2021. - 245 p. (Abstract in Ukrainian, English and Russian).**

The book is devoted to the decision of an important scientific and practical task – the study of morphological, immunophenotypic, functional characteristics of mesenchymal stem cells of different origin and evaluation of their systemic influence on the tumor process in recipient animals.

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

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

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

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

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

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

In recipient animals with transplanted Lewis lung carcinoma under systemic influence of allogeneic mesenchymal stem cells it were found disturbance of the mechanisms of programmed cell death of the primary tumor due to reduced apoptosis; an increase in the number of lymphoid cells associated with the tumor, which are involved in the activation of angiogenesis in tumor tissue as producers of vascular endothelial growth factor; alteration of genetic stability of primary tumor cells, characterized by an increase in the number of aneuploids in the primary tumor, as well as an their content among cells of proliferative  $G_2/M+S$  phases of cell cycle. All of the above indicates more malignant phenotype of primary tumor cells.

**Key words:** stem cells, tumor process, mouse.

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

**КЛАДНИЦЬКА Л. В., МАЗУРКЕВИЧ А. Й., ВЕЛИЧКО С. В. ,**  
**БОКОТЬКО Р. Р., САВЧУК Т. Л.**

---

**ВПЛИВ МЕЗЕНХІМНИХ СТОВБУРОВИХ**  
**КЛІТИН НА ПУХЛИННИЙ ПРОЦЕС НА**  
**МОДЕЛІ МЕТАСТАЗУЮЧОЇ КАРЦИНОМИ**  
**ЛЕГЕНІ ЛЬЮЇС**

**Монографія**

---

Видання здійснено за авторською редакцією.

Підписано до друку 18.11.2021. Формат 64x90/16. Ум. др. арк. 15,31.

Наклад 100 прим. Замовл. № \_\_\_\_\_