

КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ  
ІМЕНІ ТАРАСШЕВЧЕНКА  
НАВЧАЛЬНО-НАУКОВИЙ ІНСТИТУТ ВИСОКИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Завідувач кафедри молекулярної біотехнології  
та біоінформатики Нипорко О. Ю.  
Протокол №\_\_\_\_ засідання кафедри  
від “ \_\_\_\_ ” \_\_\_\_\_ 2022р.

**ВИВЧЕННЯ ДИНАМІКИ МОРФОЛОГІЧНИХ ЗМІН В КУЛЬТУРІ  
НЕРВОВИХ КЛІТИН ЗА ВПЛИВУ КОНДИЦІЙОВАНИХ  
СЕРЕДОВИЩ МУЛЬТИПОТЕНТНИХ МЕЗЕНХІМАЛЬНИХ  
СТРОМАЛЬНИХ КЛІТИН ЖИРОВОЇ ТКАНИНИ ЩУРА**

Випускна кваліфікаційна робота бакалавра  
студентки спеціальності  
091 Біологія  
ОП «Біологія (високі технології)»  
**Гриневич Катерини**

Науковий керівник від кафедри:  
доцент кафедри молекулярної  
біотехнології та біоінформатики  
к.б.н. **Самофалова Дарія**

Робота виконана в лабораторії культивування клітин відділу  
нейропатоморфології Державної установи «Інститут нейрохірургії ім. акад.  
А. П. Ромоданова Національної академії медичних наук України» під  
керівництвом д.б.н, с.н.с. **Л. Д. Любич**

Оцінка захисту роботи

---

## АНОТАЦІЯ

Гриневич К. Ю. Вивчення динаміки морфологічних змін в культурі нервових клітин за впливу кондиційованих середовищ мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин жирової тканини щура.– Випускна кваліфікаційна робота бакалавра за спеціальністю 091 Біологія ОП «Біологія (високі технології)».

*Об'єкт дослідження* – суспензії мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин (ММСК) жирової тканини (ЖТ) щура та їх кондиційовані середовища (КС); культури нервових клітин (E16) щура за умов впливу КС ММСК ЖТ.

*Мета роботи* – дослідити регенеративні властивості КС ММСК ЖТ дослідних тварин у культурі нервових клітин.

*Методи дослідження:* експлантаційна культура нервових клітин (E16) щура, прижиттєве спостереження за ростом культур у інвертованому мікроскопі з фотореєстрацією, імуноцитохімія, світлова мікроскопія.

КС отримували від 24-год культур ММСК ЖТ. У 5-7-добових культурах нервових клітин щура (E16) проводили механічну трансекцію та додавали живильне середовище ДМЕМ з 10 % фетальної телячої сироватки (стандартні культуральні умови, контроль) або 0,10 мг/мл (за кількістю протеїнів) КС ММСК ЖТ. Упродовж 4-добового культивування проводили мікроскопічні та морфометричні дослідження.

*Результати досліджень.* Встановлено, що за впливу біологічних факторів КС від 24-год культур ММСК ЖТ щура клітинний склад та розміри зони росту культури нервової тканини головного мозку щурів (E16) не змінюються, зберігається здатність клітин до мітотичного поділу. Після механічного перерізу у культурі нервових клітин за стандартних умов з 1-ї по 3-ю добу відбуваються процеси ендогенної регенерації, які зменшуються до 4-ї доби. Додавання КС ММСК ЖТ сприяє значущому посиленню ступеня і тривалості процесів ендогенної регенерації у культурі нервових клітин: у ділянці перерізу до 4-ї

доби зростає кількість мігруючих клітин (у 7 разів), щільність відростків клітин (у 12,5 рази); довжина зарощеної ділянки перерізу збільшується в 2,6 рази, досягаючи відповідно 23,7 % всієї довжини ділянки перерізу.

*Висновки.* КС від 24-год культур ММСК ЖТ щура стимулюють процеси ендогенної регенерації в культурі нервових клітин головного мозку щура з механічним перерізом моношару. Чинниками нейрорегенеративних ефектів ММСК ЖТ щура є, вочевидь, секретовані біологічно активні медіатори – складові КС.

**Ключові слова:** культура нервових клітин, мультипотентні мезенхімальні стромальні клітини, жирова тканина, кондиційоване середовище.

## З М І С Т

ВСТУП .....	5
РОЗДІЛ 1 ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....	6
1.1. Загальна характеристика МСК .....	6
1.2. Джерела МСК та типи МСК.....	9
1.3. Характеристика ММСК-ЖТ: фенотип (маркери), властивості, здатність до диференціації, імунобіологічні властивості .....	14
1.4. Методи отримання і культивування ММСК-ЖТ.....	18
1.5. Значення ММСК-ЖТ у регенеративній медицині .....	24
РОЗДІЛ 2 МЕТОДИ ТА МАТЕРІАЛИ ДОСЛІДЖЕННЯ.....	29
2.1. Отримання ММСК ЖТ та їх КС .....	29
2.2. Отримання культури нервових клітин (E16).....	30
2.3. Вивчення впливу КС ММСК ЖТ .....	31
2.4. Морфометричні дослідження.....	31
2.5. Статистичний аналіз .....	32
РОЗДІЛ 3 РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ .....	33
3.1. Відтворення експериментальної моделі культури нервових клітин.....	33
3.2. Характеристика культивованих моноклеарних клітин ЖТ щура.....	33
3.3. Вплив КС МСК ЖТ на культуру нервових клітин .....	35
ВИСНОВКИ.....	40
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	41
ДОДАТКИ.....	51

## ВСТУП

Мультипотентні мезенхімальні стромальні клітини (ММСК) жирової тканини (ЖТ) вважаються відносно доступними і безпечними для отримання з організму та, в деяких випадках, ці клітини мають кращий потенціал за ММСК з інших джерел. Тому ММСК-ЖТ використовують та досліджують у сфері медицини у зв'язку з їх регенераційним потенціалом. Показано, що ММСК-ЖТ сприяють регенерації тканин завдяки структурній підтримці тканини та диференціації *in vivo* у пошкодженій тканині і подальшої секреції факторів росту та інших паракринних продуктів, що індукує диференціацію в необхідний тип клітин.

В даній роботі досліджено вплив кондиційованих середовищ (КС) ММСК-ЖТ на зарощення ділянки перерізу моношару культур нервових клітин головного мозку щура. **Метою** є дослідження регенеративних властивостей КС ММСК-ЖТ дослідних тварин у культурі нервових клітин, а також свівставлення отриманих даних з літературними, що відкриває перспективи щодо можливого використання КС клітин при лікуванні захворювань ЦНС.

Відповідно до мети були поставлені наступні **завдання**:

1. Відпрацювати модель для дослідження регенеративного впливу ММСК ЖТ *in vitro*.
2. Дослідити вплив кондиційованого середовища ММСК ЖТ у культурі нервових клітин.
3. Провести морфометричне дослідження цитопрепаратів дослідних культур нервових клітин для об'єктивізації впливу КС ММСК ЖТ

## РОЗДІЛ 1

### ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

#### 1.1. Загальна характеристика МСК

Поняття «стовбутова клітина» означає окрему клітину або групу клітин-попередників, що володіють здатністю до самовідновлення і диференціювання в спеціалізовані тканини. В даний час стовбурові клітини залежно від походження ділять на три категорії: ембріональні, фетальні і дорослі стовбурові клітини.

Ембріональні стовбурові клітини - стовбурові клітини, виділені на ранніх етапах розвитку ембріонів (наприклад, на етапі бластоцисти або зі статевого зачатка 5-тижневих ембріонів) або тератокарциноми (пухлинної лінії) *in vitro* [С. Н. Нимер, 2009].

Ембріональні стовбурові клітини, в свою чергу, поділяють на:

- тотипотентні - клітини ембріонів та клітини незародкових оболонок до імплантації (11 день після запліднення), які здатні диференціюватися в повноцінний організм;
- поліпотентні - клітини ембріона з постімплантаційного періоду до 8 тижнів включно, що здатні диференціюватися в цілісний орган або тканинну структуру [С. Н. Нимер, 2009].

Фетальні стовбурові клітини – це клітини, які знаходяться в пуповинній крові, плаценті, здатні трансформуватися в різні типи клітин (мультипотентні клітини) [С. Н. Нимер, 2009].

Стовбурові клітини дорослої організму [С. Н. Нимер, 2009]:

- Гемопоетичні стовбурові, що знаходяться в кровотворних органах і самій крові, здатні давати початок, в основному, різним типам клітин, що відносяться до кровотворення.

- Мезенхімальні (або стромальні) стовбурові клітини, які знаходяться в кістковому мозку, жировій тканині та інших місцях, і володіють здатністю до диференціювання в остеобласти, хондроцити, теноцити, адипоцити, міобласти та фібробласти (можлива також диференціація і в інші типи клітин в умовах *in vitro*).

- Стовбурові клітини інших тканин (регіонарні), наприклад, шкіри, судин, нервової тканини та інших, які знаходяться в відповідних тканинах і диференціюються в клітини цих тканин.

Зосередимось на мезенхімальних стовбурових клітинах (МСК), одне з джерел яких є темою даної роботи.

МСК стали широко вивчатися в останні 30 років завдяки їх цікавій клітинній біології, широкому клінічному потенціалу та можливості використання в якості центрального будівельного матеріалу у швидко зростаючій галузі тканинної інженерії. Одними з їх особливостей є те, що МСК легко ростуть у посуді для культивування, мають власний потенціал диференціювання, якого немає в інших клітинах, і виробляють велику кількість корисних факторів росту та цитокінів.

Мезенхімальні стовбурові клітини спочатку були виявлені в стромі кісткового мозку, а потім знайдені і в інших органах, включаючи плаценту, пуповину, печінку і жирову тканину [А. Н. Лызиков, 2015]. Недавні дослідження показали, що МСК поширені по всьому організму, наприклад, в якості периваскулярних клітин (періцитів) є інтегральним клітинним компонентом ендотелію.

Кілька досліджень підтвердили поліпотентність цих клітин. За наявності адекватних подразників в організмі вони диференціюються на адипоцити (з утворенням цитоплазматичних вакуолей, що містять ліпіди), остеобласти (з відкладенням кристалів гідроксиапатиту), хондроцити (із синтезом матриксу хряща) та м'язові клітини (багаті міотрубками) [А. Н. Лызиков, 2015]. Цю диференціацію можна виявити за допомогою відповідного забарвлення клітин та реакцій імунохімії.

МСК також здатні експресувати гени ембріонального походження, молекули, що властиві контактам типу клітина-клітина, позаклітинному матриксу. Це, наприклад, інтерстиціальний колаген I типу, фібронектин, колаген типу IV та ламінін. МСК можуть також виділяти цитокіни, такі як інтерлейкін (IL) -7, IL-8, IL-11, фактор стовбурових клітин (SCF) та похідний стромі фактор-1 (SDF-1), який регулює самонаведення гемопоетичних стовбурових клітин у кістковий мозок [М. Крамера, 2007]. МСК зазвичай оновлюють стромальне мікросередовище, необхідне для гемопоезу. МСК здатні дуже ефективно підтримувати *in vitro* довготривалі гемопоетичні культури.

Поки що немає конкретних маркерів для розпізнавання МСК, проте існують загальні підходи. МСК можуть бути ідентифіковані за відсутністю експресії гемопоетичних (CD45 та CD34) та ендотеліальних (CD31 / PECAM-1) маркерів, а також за допомогою аналізу експресії комбінацій поверхневих молекул, таких як CD105 (SH2 або ендоглін), CD73 (SH3 і SH4), CD106 (VCAM-1), CD44 (рецептор гіалуронової кислоти), CD90 (Thy 1.1), CD29, STRO-1, CD54 (ICAM-1), CD13, CD47, CD146, CD49a, CD164 і CD. Також в МСК можуть бути виражені багато інших маркерів, а саме, молекули адгезії, хемокіни, рецептори цитокінів (навіть епітеліального походження), такі як рецептор епідермального фактора росту (EGFR або HER-1), і молекули, що беруть участь у імунній відповіді (МНС I і II класу, CD119 / інтерферон-g-рецептор) [М. Крамера, 2007].

Проте існують і складності для ідентифікації МСК за поверхневими маркерами. Наприклад, МСК людини, культивовані *in vitro* з кісткового мозку пацієнтів з гематологічними новоутвореннями, можуть гетерогенно експресувати деякі молекули, такі як CD105, CD90, CD184 та HLA-DR, і ця особливість обернено корелює з ангіогенезом кісткового мозку. Саме тому все ще важко порівняти точний фенотиповий характер клонованих *in vitro* МСК з тим, який реально виражений *in vivo* в тканинах. Тільки

функціональні дослідження *in vitro* та *in vivo* на тваринах можуть допомогти оцінити природу МСК [М. Крапера, 2007].

Ще однією особливістю МСК, яка пояснює їх широке застосування в клітинній терапії, є дуже низька імуногенність [С. Н. Нимер, 2009; М. Крапера, 2007], що забезпечує можливість пересадки клітин від практично будь-якого неспорідненого донора практично будь-якому реципієнту без використання імуносупресивної терапії. Крім того, МСК володіють імуносупресивними властивостями проти Т-клітин, що робить МСК ефективними терапевтичними агентами при лікуванні хворих з гостро вираженою реакцією відторгнення трансплантованої тканини через тканинну несумісність.

## **1.2. Джерела та типи МСК**

Найпоширенішими джерелами МСК у дорослої людини, які найдовше використовують, є кістковий мозок та фракція судинної стромы жирової тканини. Використання саме цих джерел МСК з тканин людини обумовлене тим, що вони є найбільш придатними для забору з організму, оскільки вони вважаються відновлюваними (кістковий мозок) або небажаними (жирові тканини).

Є також дві тканини, які не так давно почали використовуватись - це тканина пуповини і плацента, які є чудовими джерелами МСК людини, які отримуються при народженні дитини.

Рішення використовувати аутологічні МСК з кісткового мозку чи жирової тканини, або алогенні вихідної тканини для ізоляції МСК є фундаментальним клінічним рішенням, і обидва підходи продемонстрували успіх, приводячи до великої кількості отримуваних МСК.

Проте також важливо пам'ятати, що МСК відносно рідкісні в кістковому мозку, але вони можуть дуже ефективно проліферувати,

зберігаючи свої властивості стовбурових клітин *in vivo*. Наприклад, цільова доза (це приблизно 100–150 мільйонів МСК людини) може бути отримана з 25 мл кісткового мозку шляхом культивування клітин приблизно впродовж 3 тижнів, і ця кількість отриманих клітин буде мати об'єм близько 0,4-0,5 мл [M.F. Pittenger, 2019].

Але важливим є той факт, що у людей кількість МСК, які можна отримати з кісткового мозку, зменшується з віком. Прогресивна втрата потенціалу диференціації через старіння зазвичай відбувається приблизно через 40 подвоєнь цих клітин. Тому причиною зменшення кількості МСК кісткового мозку є численні травми кінцівок, що стимулює додатковий поділ клітин для регенерації або саме фізіологічне старіння. Саме через це необхідно шукати нові джерела МСК та враховувати вік пацієнта, а також історію його травм [M.F. Pittenger, 2019].

Другим за використанням джерелом МСК є жирова тканина, наприклад, підшкірний жир. В таких випадках говорять про стовбурові клітини, отримані з жирової тканини чи ММСК-ЖТ. Вперше ці клітини були ідентифіковані як МСК у жировій тканині людини в 2001 р. Протягом наступних років постійно пропагувалося використання цієї тканини як клітинного джерела для МСК, придатних для тканинної інженерії та регенеративної медицини. Їх можна було виділити в процесі ліпоаспірації (хірургічна техніка, яка дозволяє витягувати глибокий шар підшкірного жиру з місць, де він виглядає непривабливо), і після виділення вони виявляли остеогенну, адипогенну, міогенну та хондрогенну диференціацію *in vitro* [S. Arnhold, 2015].

Оскільки це багатий пул клітин, до якого легко дістатись, а також ці клітини можна отримати у великій кількості, вирощувати та ділити *in vitro* та готувати до інженерних підходів тканин, особливо для відновлення скелетних тканин, то не дивно, що в останні роки ця популяція клітин привертає велику увагу серед дослідників як у медицині, так і у ветеринарії.

Іншим джерелом МСК, що починає набирати популярність, є плацента. В ній виділяють цілий ряд клітин, а саме, амніотичні епітеліальні клітини людини, хоріонічні мезенхімальні стромальні клітини людини та хоріонічні трофобластичні клітини людини. Мезенхімальні стромальні / стовбурові клітини також були виділені з інших тканин плаценти, таких як ворсинки хоріона, материнська *decidua basalis* та з різних відділів пуповини. Важливою особливістю МСК з плацентарних тканин є те, що отримані з різних відділів клітини мають різні властивості. В першу чергу різні імуномодуючі властивості. Крім того, було показано, що регіони, з яких беруть клітини плаценти, впливають на такі властивості, як диференціація, ангиогенез та здатність інгібувати проліферацію Т-лімфоцитів, що потенційно може суттєво впливати на їх застосування в регенеративній медицині, а також у лікуванні запальних та аутоімунних розладів. Саме тому в сучасній медицині критичним аспектом є походження тканини та властива їй неоднорідність [A. Parait, 2020].

Окрім цих поширених джерел МСК, після широкого дослідження вони також були виділені майже з усіх тканин тіла, а не тільки кісткового мозку, жирової тканини та клітин плода. Це такі тканини та органи, як синовіальна оболонка, окістя, скелетні м'язи, легені, зуби, шкіра, також було знайдено в підшкірній тканині шкіри голови, лімфоїдній тканини, такій як лімфатичні вузли, селезінка та тимус дорослих людей та мишей. Деякі автори показали, що дуже невеликі популяції МСК циркулюють у периферичній крові. Таким чином, припускають, що мезенхімальна система практично присутня у всіх тканинах дорослої людини [M. Krause, 2007].

Подібно до інших стовбурових клітин, МСК присутні в різних тканинах протягом усього життя. Однак їх кількість корелює обернено зі станом здоров'я, а також з віком та походженням тканини. МСК відіграють дуже важливу роль у всіх зрілих тканинах, тому передбачається, що вони утворюють своєрідний пул клітин для відновлення тканин, який можна досить швидко мобілізувати під час травм та захворювань.

Також важливим є те, що МСК отримані з різних місць (не тільки з різних місць пуповини) мають певні особливості. Наприклад КУО (колоніє утворюючі одиниці) є вищими для МСК, отриманих з жирової тканини та дуже низькими для МСК, отриманих з пуповинної крові. Також відрізняється імунофенотип (нижча експресія CD106 у МСК, що походить з жирової тканини, та CD90 і CD105 у МСК, що походить від пуповинної крові), потенціал диференціації (знижений у МСК, отриманий із пуповинної крові), і експресія генів [М. Krampera, 2007].

Щодо шляхів диференціювання МСК - вони мають широкий потенціал і можуть утворювати велику кількість типів клітин. Але якщо здатність МСК до утворення жирових, кісткових та хрящових клітин не викликає сумнівів і досліджувалась вже давно, то здатність утворювати інші види клітин тільки досліджується *in vitro*.

Остеогенне диференціювання МСК передбачає здатність даних клітин «розвиватися» в остеобласти, що визначає перспективи застосування МСК для забезпечення репаративної регенерації кісткової тканини, в тому числі для лікування недосконалого остеогенезу. Важливо, що остеогенний потенціал МСК, отриманих з різних тканинних джерел, відрізняється. Зокрема, показані більш виражені остеогенні властивості МСК пуповини, в порівнянні з кістковим мозком. Для індукції остеогенного диференціювання МСК в культуральне середовище додають дексаметазон, аскорбінову кислоту та  $\beta$ -гліцерофосфат. Диференціація МСК в остеобласти підтверджується експресією лужної фосфатази та наявністю позаклітинних преципітатів солей кальцію [А. Parait, 2020].

Хондрогенне диференціювання МСК відкриває перспективи клінічного застосування клітин з метою відновлення хрящової тканини, перш за все суглобових хрящів. Цей тип диференціювання індукують *in vitro*, додаючи в культуральне середовище основний фактор росту фібробластів (bFGF) і TGF $\beta$ 3, або кістковий морфогенетичний білок-2 (BMP-2). Процеси хондрогенезу *in vitro* можуть бути підтверджені фарбуванням сафраніном О

або алціановим синім. Також можливе визначення за допомогою наявності глюкозоаміногліканів - основного компонента аморфної речовини хрящового міжклітинного матриксу. Моніторинг хондрогенезу в культурі проводиться за рівнем експресії генів: агрекана, фактора транскрипції Sox9 і колагену другого типу (Col2a1), методами кількісної ПЛР або імуногістохімії [Н.К. Шахпазян, 2012].

Кардіоміогенне диференціювання МСК відкриває перспективи використання клітин в регенеративній терапії серцево-судинних захворювань. Диференціація МСК в кардіоміоцити *in vitro* досягається шляхом обробки культури 5-азоцитидином. Морфологічним критерієм диференціювання є наявність в культурі «валиків» кардіоміоцитів, які спонтанно скорочуються. При цьому клітини також експресують гени GATA4, Nkx2,5, коннексін 43, тропоніни Т і І, кардіотрофін І [Н.К. Шахпазян, 2012].

Також відомо, що МСК можуть диференціюватись *in vitro* на клітини не мезодермального походження, такі як нейрони, клітини епітелію шкіри та кишечника, гепатоцити та пневмоцити. Не дивлячись на те, що МСК зазвичай мають низький рівень нейронних маркерів, вони можуть бути стимульовані до диференціювання в нейрони шляхом культивування з епідермальним чинником росту (EGF), фактором росту гепатоцитів (HGF), VEGF. Іншим набором індукторів для нейроноподібного диференціювання є суміш бутилат гідроксіанізол (BHA), хлориду калію, вальпроєвої кислоти, форсколіну, гідрокортизону та інсуліну. Маркерами раннього нейроноподібного диференціювання є експресія генів GFAP, NSE, Map2, NF-M, GAP-43 [Н.К. Шахпазян, 2012].

Виявлено, що як неонатальні, так і отримані з дорослих джерел МСК здатні диференціюватися в гепатоцит-подібні клітини. Саме через це досліджується можливість використання МСК у відновленні тканини печінки. Існують дані, що МСК за рахунок паракринного ефекту поліпшують трофіку гепатоцитів і знижують рівень апоптозу. *In vitro* МСК

диференціюються в гепатоцитоподібні клітини при обробці HGF, онкостатином M, нікотинамідом, bFGF, трансферрином. Ознаками диференціювання МСК у гепатоцити є продукція альбуміну, накопичення глікогену, секреція сечовини, поглинання ліпопротеїнів низької щільності і індукована фенобарбіталом активність цитохрому р450. Також спостерігається експресія цитокератинів 19 і 20 (СК19, СК20), тубуліну, мРНК генів FEM1B, PSMC2, дисульфід-ізомерази A3 (DPIA3) і GAPDH [Н.К. Шахпазян, 2012].

### **1.3. Характеристика ММСК-ЖТ (мультипотентні мезенхімальні стромальні клітини жирової тканини): фенотип (маркери), властивості, здатність до диференціації, імунобіологічні властивості**

Мультипотентні мезенхімальні стромальні клітини жирової тканини (ММСК-ЖТ) викликають великий інтерес з точки зору клінічного використання через їх високу доступність з мінімальною інвазивністю та відсутність суттєвих етичних обмежень при їх отриманні. Окрім того, що мезенхімальні стовбурові клітини з жирової тканини є більш гетерогенними, вони виявляють імуномодулюючі властивості та диференційну здатність, подібну до МСК, отриманих з кісткового мозку. Важливо також, що жирова тканина містить вищу щільність дорослих мезенхімальних стовбурових клітин, порівняно з кістковим мозком.

Складністю опису ММСК-ЖТ є те, що ці клітини демонструють відмінності в експресії генів, поверхневих епітопах, клоногенності, здатності диференціюватись та терапевтичному потенціалі залежно від джерела походження. Крім того, ці клітини експресують різні молекули відповідно до процедури виділення та культивування, а також експресія деяких молекул може змінюватися *in vitro* та *in vivo*. Тому перед клінічним застосуванням

необхідно подолати проблеми, пов'язані з виділенням, ідентифікацією та очищенням стовбурових клітин.

Результати недавніх гістологічних досліджень із використанням імунологічних методів забарвлення дозволяють припустити, що ММСК-ЖТ перебувають у (пери) судинному місці, де вони співіснують з перицитами та ендотеліальними клітинами. Тим не менше, точне розташування в судинній ніші (адвентиція, внутрішня інтина, субендотеліал) точно не визначено [P.C. Baer, 2014].

Як зазначалось, існують певні складності щодо визначення поверхневих маркерів ММСК-ЖТ. Було продемонстровано, що вони експресують класичні маркери МСК, такі як інтегрин CD29-бета-1, що бере участь у терапевтичному ангиогенезі, CD44-гіалуронової рецептор, що є вирішальним у розвитку неоекстраклітинного матриксу та бере участь у багатьох патологічних та фізіологічних явищах. Також була відсутня експресія HLA-DR та c-kit [B. Kocan, 2017].

Проте існують також інші поверхневі молекули, експресовані як ММСК-ЖТ, так і МСК з кісткового мозку, а саме, CD13, CD49e, CD54, CD63 та CD146. Крім того, культивовані стовбурові клітини жирової тканини демонструють експресію таких типових класичних поверхневих маркерів МСК кісткового мозку, як CD73, CD90, CD105, та відсутність експресії гемопоетичних (CD14, CD45) та ендотеліальних маркерів (CD31). Рівні цих молекул мало змінюються протягом періоду культури [B. Kocan, 2017].

Важливо, що у ММСК-ЖТ не спостерігалось експресії гемопоетичних маркерів, таких як CD3, CD11b, CD14, CD15, CD16, CD18 та CD41. Проте є і інші молекули, які не експресуються як ММСК-ЖТ, так і МСК з кісткового мозку, і які включають CD4, CD19, CD36 та CD79a [B. Kocan, 2017].

Як вже було зазначено раніше, імунофенотип ММСК-ЖТ має схильність до поступової зміни в культурі. Рівні маркерів, асоційованих із стромальними клітинами, включаючи CD13, CD29, CD44, CD63, CD73, CD90 та CD166, спочатку були низькими на клітинах SVF (первинно виділена з

жирової тканини неоднорідна фракція клітин, яка становить популяцію дорослих мезенхімальних стовбурових клітин та сторонніх клітини: клітин крові (еритроцити, моноцити), клітин гладких м'язів, ЕРС (клітини-попередники ендотелію), перицитів) і значно посилювались при послідовному пересіванні культури. ALDH, який використовується для ідентифікації гемопоетичних стовбурових клітин, був високим (понад 70%) лише до пасажу 4 і потім зменшувався [В. Kocan, 2017].

В літературі існують також суперечки щодо деяких поверхневих маркерів. Наприклад, CD106 був описаний у літературі і як виражений [А. Schäffler, 2007], так і як не експресований [М. J. Oedayrajsingh-Varma, 2006] стовбуровими клітинами, отриманими з жиру. Було продемонстровано, що природні ММСК-ЖТ належать до CD34 +, однак інші групи спостерігали, що лише близько 60% вихідних клітин SVF демонстрували експресію CD34, але відсоток позитивних клітин зменшувався при послідовному пересіванні культури [В. Kocan, 2017].

Окрім всього вище зазначеного, ММСК-ЖТ мають здатність виділяти різні важливі фактори, такі як TNF- $\alpha$  (фактор некрозу пухлини-альфа), TGF- $\beta$  (трансформуючий фактор росту-бета), VEGF, HGF (фактор росту гепатоцитів), і деякі інтерлейкіни. Ці дані є важливими з точки зору регенеративної медицини, оскільки було показано, що, ММСК-ЖТ в умовах гіпоксії виділяють значну кількість VEGF та HGF та індують загоєння ішемії задніх кінцівок мишей. Також VEGF та HGF збільшують хондрогенну та гепатогенну диференціацію ММСК-ЖТ *in vitro* відповідно. FGF, в свою чергу, сприяє і збільшує адипогенну та хондрогенну диференціацію *in vitro*, але блокує остеогенну диференціацію, тоді як EGF інгібує адипогенну диференціацію [Е. Semanova, 2018].

Також в дослідженнях було показано, що рівні таких важливих, з точки зору імунології, білків, як IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$  та IL-4, були дуже низькими у культурі ММСК-ЖТ, але при цьому клітинами підтримувався досить високий рівень IL-6. Такі показники є важливими в медичній сфері, оскільки

можуть зіграти важливу роль у підтримці імунomodуляції. Наприклад, TNF- $\alpha$  та IFN- $\gamma$  є прозапальними цитокінами, які індукують запальні реакції в клітинах та тканинах, що є важливим для збільшення експресії антигенів класу HLA I та II класу та для посилення активності T-лімфоцитів. IL-4 - це фактор росту та виживання лімфоцитів, який відіграє вирішальну роль у регуляції диференціації T-клітин під час імунної відповіді. А IL-6 бере участь у імунорегуляторному механізмі, опосередкованому MCK, через часткове пригнічення диференціації дендроцитів.

Високий рівень TGF- $\beta$ 1 спостерігається впродовж всього культивування клітин. Оскільки він є потужним плейотропним імуносупресивним та протизапальним цитокіном, критичним для імунної модуляції, це може зменшити запальні реакції, сприяючи пригніченню IL-1 $\beta$  та TNF- $\alpha$  та модулюючи проліферацію T-клітинних підтипів, таких як Th1, Th17 та Treg. В свою чергу, це може відігравати ключову роль у імуносупресії клітин [С.Н. Mun, 2019].

В дослідженнях було показано, що ММСК-ЖТ мають вищі проліферативні здатності, ніж МСК з кісткового мозку. Наприклад, час подвоєння популяції ММСК-ЖТ – близько 45,2 год на противагу 61,2 год для МСК з кісткового мозку. Однак необхідно враховувати те, що існує різниця у часі подвоєння ММСК-ЖТ, що походять з різних частин тіла: ММСК-ЖТ з області підшкірної жирової тканини проліферували швидше, ніж ті, що походили з області сальникової залози. На додаток до походження клітин, умови культивування та різні добавки до середовища також можуть впливати на час подвоєння ММСК-ЖТ. Існують дані, що ММСК-ЖТ мають коротший час подвоєння при умові культивування в середовищі з додаванням сироватки людини замість фетальної телячої сироватки.

Стосовно можливості до диференціації, ММСК-ЖТ мають можливість диференціюватись у остеогенні, адипогенні та хондрогенні лінії, що відповідає мінімальним критеріям МСК, встановленим Міжнародним товариством клітинної терапії. Шлях диференціації залежить від середовища,

але важливо пам'ятати, що середовище для диференціації МСК з жирових клітин відрізняється від МСК з інших джерел. Наприклад, в остеогенному протоколі диференціації ММСК-ЖТ, використовували дексаметазон,  $\beta$ -гліцерофосфат та аскорбінову кислоту як добавки до середовища. Ідентифікувати такі клітини можна за допомогою посиленої експресії лужної фосфатази. Адипогенна диференціація потребує високої клітинної щільності та подальшу зупинку росту на межі G0 / G1. Крім того, було показано, що FGF2, тiazолідиндіони, такі як троглітазон, піоглітазон, розиглітазон та 17- $\beta$ -естрадіол, індукують адипогенну диференціацію ММСК-ЖТ. Хондрогенна диференціація провокується шляхом додавання фактора росту та диференціації-5 (GDF5) та стимуляції FGF-2 або BMP-6 [H. Nass, 2011].

Крім того, повідомляється про диференціацію *in vitro* у кардіоміоцити [Y.S. Choi, 2010], ендотеліальні клітини [J.J. Mendez, 2014], нервові клітини [D. N. Urrutia, 2019] або клітини м'язів [I. Grabowska, 2019].

Наприклад, у дослідженні [D. N. Urrutia, 2019] показано, що МСК з таких джерел як жирова тканина, кістковий мозок та плацента можуть утворювати нервові клітини. Проте саме ММСК-ЖТ проліферують значно швидше за клітини з інших джерел, генеруючи нейроноподібні клітини, що експресують більш високі рівні нейронних маркерів. Більше того, ММСК-ЖТ виявляли електрофізіологічну реакцію після нейронної індукції, характерну для зрілих функціональних нейронів і основну для передачі сигналу в нервовій системі.

#### **1.4. Методи отримання і культивування ММСК-ЖТ**

Жирова тканина - це дуже складна тканина мезодермального походження. Вона складається з кількох типів клітин, включаючи зрілі адипоцити, преадипоцити, фібробласти, судинні клітини гладкої

мускулатури, ендотеліальні клітини, резидентні моноцити / макрофаги та лімфоцити [В. Косан, 2017].

За походженням розвитку жирову тканину можна класифікувати на дві основні категорії: коричневу та білу жирові тканини, ВАТ та WAT відповідно. Вони відрізняються тим, що WAT призначена для накопичення енергії, тоді як ВАТ розсіює енергію та виробляє тепло. Окрім цього, WAT є набагато більш розповсюдженою і більш біологічно значущою, тоді як ВАТ в основному функціонує в період новонародженості, хоча останні повідомлення показують, що ВАТ присутня і має функціональну роль у дорослих [В. Косан, 2017].

Місце знаходження білої жирової тканини не однорідне – її можна знайти в різних місцях, таких як внутрішньочеревна та підшкірна ділянки. Тому саме через це важливо бути уважним, оскільки місце може впливати на відмінності у потенціалі диференціації клітин. Наприклад, як зазначено раніше, показана дещо вища проліферація та здатність до адипогенної диференціації у клітин з підшкірної WAT порівняно з WAT з внутрішньочеревної області.

Основні внутрішньочеревні депо WAT розташовані навколо сальника та кишечника, а підшкірні депо є в області живота, сідниць та стегон. Однак WAT також знаходиться в інших регіонах, таких як ретроорбітальний простір, на обличчі та кінцівках. Крім того, депо WAT знаходяться в кістковому мозку, де займають простір, який більше не потрібен для гемопоєзу, і представляють резервуар енергії та джерело цитокінів для остеогенезу та гемопоєзу [С. F. Markarian, 2014]

Серед різних жирових зон особливий інтерес становлять підшкірні депо через їх поширеність, чисельність та поновлюваність. У черевній області є дві різні локалізації підшкірного жиру, а саме поверхнева жирова тканина (SAT) і глибока жирова тканина (DAT), і мезенхімальні стовбурові клітини з цих джерел можуть бути різними. Було показано, що ММСК-ЖТ з підшкірних областей демонструють дещо вищий остеогенний потенціал, на

що вказує більш високий рівень експресії генів остеогенних маркерів, порівняно з ММСК-ЖТ, отриманими з глибокої жирової тканини. Однак прикріплені клітини, виділені з SAT та DAT, демонстрували приблизно однакову здатність до проліферації та адипогенний потенціал. Було також виявлено, що SAT містив сполуку тканини з високим рівнем строму, а також більшу частку CD105-позитивних клітин, ніж DAT з того ж місця збирання. Більше того, виходячи із значно вищих рівнів експресії факторів транскрипції, пов'язаних зі стовбуровістю, вважалось, що клітини, виділені з SAT, виявляють підвищені властивості мультипотентності [L. Francis Sam, 2018].

Як вже було сказано, значення VAT як джерело МСК у дорослих не настільки велике. У новонароджених VAT знаходиться переважно між лопатками, а у дорослих розсіяний по тілу (плечі, шия, руки). Тому через малі VAT скупчення, вона майже не розглядається в дослідженнях в якості джерела стовбурових клітин [C. Patrick, 2012].

Отримання ММСК-ЖТ найчастіше здійснюється в ході процедури ліпосакції (ліпоаспірації) чи резекції. Дуже важливо, що на життєздатність, проліферативну здатність та характеристики росту ММСК-ЖТ впливає тип процедури збирання. Показано, що вихід клітин під час екстракції був у 1,8 рази більшим для клітин, що отримали в ході ліпоаспірації, і вони проліферували приблизно так само або дещо краще в культурі, ніж клітини, отримані в результаті резекції. Однак було показано, що ліпосакція за допомогою ультразвуку призводила до нижчої частоти проліферуючих ММСК-ЖТ, а також до збільшення тривалості подвоєння популяції, порівняно з резекцією [B. Kocan, 2017; M.P. Francis, 2010].

Окрім цього, на характеристики клітин впливають і особисті фізичні показники донора: вік, індекс маси тіла, стать, етнічна приналежність та історія хвороби (раніше існуючі захворювання, травми, зловживання нікотинном або алкоголем). Наприклад, індекс маси тіла негативно корелює з кількістю стромальних клітин на грам та їх здатністю до диференціації.

Після отримання тканини наступним кроком є виділення клітин та їх очищення. Відповідно до рекомендацій, тканина при виведенні з неї МСК має бути оброблена в першу добу після вилучення біоматеріалу з організму, оскільки зберігання жирового субстрату в умовах кімнатної температури пов'язане зі зменшенням потенціалу клітин до виживання. Консервація ж тканини при температурі 4°C з плином часу суттєво не змінює кількості МСК, одержуваних з біологічного матеріалу [К. Cheng, 2011].

В основному, виділення клітин із тканини базується на процедурі із застосуванням ферментування. При класичній технології сутність базисної методики виділення клітин полягає, в першу чергу, у поділі біологічного субстрату за допомогою центрифугування матеріалу, виділеного з організму донора. При цьому відбувається розшарування на три шари (верхній - маслянистий, що містить гомогенат зі зрілих адипоцитів, що руйнуються в ході операції; середній - шар інтактної жирової тканини і нижній, що містить компоненти розчину, інфільтрованого в тканини пацієнта перед хірургічним втручанням, а також плазму і формені елементи крові). Сепарація шарів здійснюється на підставі використання ефекту дії сили тяжіння. В процесі очищення видаляють верхній і нижній шари [В. Kocan, 2017].

Важливим є те, що фізичні ефекти центрифугування також можуть впливати на життєздатність і кількість клітин, які використовуються в підсумку для культивування. Наприклад, при швидкості центрифугування, які перевищують 3000×g, можливі пошкодження клітин [М. Kurita, 2008].

Наступним кроком жировий шар, що залишився після центрифугування, промивається стерильним розчином фосфатного буфера з додаванням антибактеріальних і протимікотичних засобів для зниження ймовірності мікробної контамінації біологічного матеріалу та виключення можливості тканинних (неклітинних) забруднень сформованого біологічного матеріалу. Після промивання отримана жирова тканина оброблюється ферментом колагеназою типу I з метою вивільнення компонентів стромальної судинної фракції (SVF).

Окрім колагенази I також можуть використовуватись і інші типи даного ферменту, наприклад, II тип. Також можливе використання нейтральних протеаз – діспази, пепсину, трипсину і термолізину. Одне з досліджень показало, що, незважаючи на те, що розщеплені трипсином та оброблені колагеназою ММСК-ЖТ мають подібну адипогенну диференціацію та проліферативну здатність, потенціал остеогенної диференціації клітин, оброблених трипсином, є семикратно вищим [С. Ф. Markarian, 2014].

Проте, незважаючи на широке використання вищезазначених ферментів, методи ферментативного травлення мають багато недоліків. В першу чергу, застосування ферментів може змінити або порушити життєздатність клітин та їх поверхневі антигени, що, в свою чергу, може зменшити регенераційний потенціал ММСК-ЖТ. Також залишаються питання стосовно того, чи може залишкова активність ферментів впливати на безпеку та життєздатність культури.

Важливим і суперечливим також є питання про терміни ферментативного впливу. Існують певні варіації – від 1 години [С. J. Kirkpatrick, 1985] до 2 годин при 37°C [V. Zachar, 2011].

Використання ферментування дозволяє виділяти клітини без значних матеріальних витрат, проте існує проблема стерильності. Саме тому в наш час іде розробка автоматизованого виділення. Сьогодні клітини можна виділити за допомогою спеціальних автоматизованих пристроїв, наприклад SmartLipo™, MicroAire Surgical Instruments, AdiStem™ Small/Large Kit and Adi Light та ряду інших [Н.С. Романенков, 2016].

Наступним етапом є культивування. Для цього отримані SVF інкубують у середовищі протягом ночі при температурі 37° С в атмосфері з 5% CO<sub>2</sub> після серії промивань та етапів центрифугування. Після інкубації ретельно промивають PBS для видалення залишкових, неадгезивних еритроцитів. Отримані в процесі цього клітини вважаються ММСК-ЖТ.

Через те, що ММСК-ЖТ демонструють прилипання до поверхні, щільність висіву здається однією з основних критичних умов, що впливають на їх біологічні функції. Менша щільність висіву пов'язана із підтримкою високої швидкості ділення. Послідовні пасажі можуть впливати на якість культивованих МСК, викликаючи прогресуюче старіння, уповільнену швидкість проліферації та втрату клітинами багатопотенційності.

Отже, виявлення кореляції між щільністю посіву та оптимальною проліферацією клітин, а також відповідним обмеженням кількості подвоєння популяції корисно як в лабораторних дослідженнях, так і в клінічних застосуваннях, оскільки це дозволяє отримати необхідні в ході дослідження результати.

Необхідно зазначити, що сьогодні не існує унікального та стандартизованого протоколу культивування ММСК-ЖТ. Існує безліч змінних, що погіршують стан культивованих недиференційованих клітин (або склад їх субпопуляцій): початкова щільність покриття та злиття, покриття посуду та жорсткість субстрату, склад основних середовищ культури клітин, добавки до культури клітин (бичача сироватка, сироватка людини, лізат тромбоцитів або фактори росту), додавання антибіотиків, надходження кисню (гіпоксія) та іншого [В. Косан, 2017].

Одним із широко вживаних протоколів культивування недиференційованих ММСК-ЖТ є використання середовища росту К-НАС, але з нижчим рівнем кальцію (0,09 мМ), оскільки саме середовище К-НАС з низьким вмістом кальцію може запобігти диференціації та продовженню тривалості життя ММСК-ЖТ. Ще однією важливою особливістю середовища К-НАС є його доповнення антиоксидантами НАС та Asc-2P. НАС - це проліки цистеїну, що підсилюють вироблення глутатіоніну. Додаткові добавки з цими двома хімічними речовинами можуть змінити умови клітинного окислювально-відновного стану та збільшити потенціал та тривалість життя стовбурових клітин. Показано, що культивування в таких умовах дозволяє клітинам зберігатися протягом 20 і більше пасажів, не

втрачаючи своїх мезенхімальних маркерів стовбурових клітин [В. Косан, 2017].

### **1.5. Значення ММСК-ЖТ у регенеративній медицині**

Як зазначено вище, ММСК-ЖТ є більш доступними і безпечними для отримання з організму та, в деяких випадках, ці клітини мають кращий потенціал за МСК з інших джерел. Тому не дивно, що ММСК-ЖТ використовують та досліджують у сфері медицини у зв'язку з регенераційним потенціалом.

Наприклад, ММСК-ЖТ використовується в області ортопедії після дрібного перелому, зараження кісток, остеонекрозу або резекції пухлини [D. Spasovski, 2018; Y. Yoshida, 2019; S. Lendeckel, 2004; G.K. Sándor, 2014; T. Thesleff, 2014]. Наступними перспективними напрямками використання ММСК-ЖТ є регенерація хрящів [D. Spasovski, 2018; M. ter Huurne, 2012], лікування інфаркту міокарда [A.M. Omar, 2019; H.J. Joо, 2017; J. Vobi, 2017; Y. He, 2019], регенерація печінки [Y. Ge, 2018; Z. Jiao, 2019; M. Yamato, 2019] та інші напрямки.

Важливим відкриттям було те, що ММСК-ЖТ можуть диференціюватись у нейрони, ендотеліальні клітини та Шваннівські клітини [R. Piovesana, 2019] і демонструють вищий рівень експресії нейронних маркерів та швидший рівень проліферації, ніж інші стовбурові клітини. Тому перспективи їх використання в регенерації частин нервової системи не залишають сумнівів [S. Wu, 2021].

Існують кілька сучасних робіт щодо використання ММСК-ЖТ в лікуванні порушень ЦНС. Наприклад, первинна гостра травма виникає головним чином від безпосередньої зовнішньої сили, яка діє на мозок, тоді як вторинна травма виникає з часом через каскад біохімічної активації, що призводить до нейрозапалення та нейродегенерації. В свою чергу таке

запалення та дегенерація є також основним механізмом, пов'язаним з гострою та хронічною фазами. Сучасна терапія черепно-мозкових травм зосереджена насамперед на придушенні вторинної фази і ММСК-ЖТ може допомогти в цьому. Наприклад, було показано, що ММСК-ЖТ може збільшувати кількість протизапальної мікроглії. Крім цього, екзосоми, отримані з ММСК-ЖТ, можуть пригнічувати активацію мікроглії, знижуючи регуляцію ядерного фактора каппа-В та шляху активованої мітогеном протеїнкінази (МАРК), а також можуть зменшувати цитотоксичність, пов'язану з активованою мікроглією. Така відповідь є надзвичайно важливою через те, що дегенерація нейронів та пошкодження кровоносних судин після травматичної рани можуть спричинити запалення з подальшою втратою нейронів та олігодендроцитів. Тому такий контроль запальної реакції після травми може мати потенціал як терапевтичний варіант [С. Ху, 2020].

Існують також клінічні дослідження щодо лікування травми хребта за допомогою ММСК-ЖТ. Наприклад, звіт про результати першого пролікованого пацієнта, 53-річного чоловіка з травмою хребта. Він був пролікований з використанням його власних ММСК-ЖТ через 11 місяців після травми. Пацієнт добре переносив процедуру і не зазнавав жодних серйозних побічних явищ. Клінічні ознаки ефективності спостерігались через 3, 6, 12 та 18 місяців після ін'єкції як в руховій, так і в сенсорній сферах [М. Bydon, 2020].

Якщо говорити про відновлення травми периферичного нерву, то донедавна використання ММСК-ЖТ залишалося проблемою, незважаючи на успіхи в хірургічному та медичному лікуванні цієї виснажливої хвороби. В останні роки з'являється все більше даних про ефективність такого лікування, хоча є складною клінічною проблемою. Наприклад, було показано, що периневральна трансплантація собачих ММСК-ЖТ прискорила функціональне відновлення моторики, оцінене за допомогою аналізу функціонального індексу сідничного нерву через два тижні після аксонотмезису, та покращила електрофізіологічне відновлення через три

тижні після роздавлювання [D. N. Rodriguez Sanchez, 2019]. В іншій роботі використовували ультразвукове наведення зі зняттям кліпси для введення ММСК-ЖТ дистально від вогнища ураження і виявили прискорену регенерацію сідничного нерва після пошкодження [M. Tremp, 2018].

Попередні дослідження, спрямовані на відновлення функції сідничного нерву після його пошкодження, використовували штучні нервові канали та каркаси, що містять ММСК-ЖТ, або доставляли ММСК-ЖТ безпосередньо в місце ураження. Нервові лусочки можуть допомогти подолати розрив периферичного нерву, особливо в поєднанні з ММСК-ЖТ, шляхом відновлення та регенерації пошкоджених тканин [Y. C. Li, 2014; J. M. Lasso, 2015; H. Luo, 2015]. Для відновлення нервів можна також використовувати різні синтетичні катетери. Доставка ММСК-ЖТ з полоксамерним гідрогелем у направляючих на основі полікапролактону показала відростання та відновлення аксона у сідничних нервах щурів через шість тижнів після його перетину. Результати qPCR показали, що включення ММСК-ЖТ сприяє експресії факторів, які сприяють реіннервації м'язової тканини [K. O. Allbright, 2018].

Також є роботи, що стосуються неврологічних розладів, таких як бічний аміотрофічний склероз [G. S. Jeon, 2016], хвороба Альцгеймера [M. Lee, 2018], хвороба Хантінгтона [G.D. Colpo, 2019] та хвороба Паркінсона [K. Chi, 2018], де ефективність лікування ММСК-ЖТ підтверджена у деяких тварин і на клітинних моделях.

Наприклад, відомо, що хвороба Альцгеймера викликана скупченнями амілоїду- $\beta$  та утворенням його бляшок. В одному з досліджень на моделі мишей було показано, що використання ММСК-ЖТ в якості лікування хворих тварин призводить до зменшення скупчень бляшок та підвищення рівню ферменту, який руйнує амілоїд- $\beta$ . В результаті симптоми захворювання стали більш м'якими [X. Hu, 2015]. В іншому експерименті було показано, що ММСК-ЖТ здатні підвищувати секрецію протизапальних

факторів, посилюючи експресію  $\beta$ -руйнуючих ферментів та підвищуючи рівень відповіді в когнітивних тестах та тестах на пам'ять [Т. Ма, 2013].

Окрім цього, ММСК-ЖТ має величезний потенціал для лікування хвороби Паркінсона та пропонує нам нову стратегію для поліпшення функції нервової та опорно-рухової тканини для пацієнтів із даною хворобою. Відомо, що основними патологічними ознаками хвороби Паркінсона є прогресуюча втрата нейронів, які виробляють нейромедіатор дофамін, в чорній речовині головного мозку. На експериментальних моделях тваринах з хворобою Паркінсона було показано, що використання ММСК-ЖТ допомагає регулювати секрецію розчинних факторів росту, включаючи протизапальні фактори та BDNF (який є важливим нейротропним фактором, що може сприяти диференціації стовбурових клітин та поліпшувати мікросередовище) [М. К. McCoу, 2008]. Проте також було встановлено, що функція регенеративних дофамінергічних нейронів, індукованих ММСК-ЖТ, не може повністю замінити функцію втрачених дофамінергічних нейронів [А. Schwerk, 2018]. Тому дослідження в даному напрямку продовжуються.

Цікавим питанням є механізм нейрорегенеративного впливу ММСК-ЖТ. Було показано, що ММСК-ЖТ встановлюють регенерацію тканини шляхом структурної підтримки тканини та диференціації *in vivo* у пошкодженій тканині та подальшої секреції факторів росту та інших паракринних продуктів навколишньою тканиною, що індукує диференціацію в необхідний тип клітини.

Важливою є паракринна функція, що бере участь у нейрорегенерації, і залежить від розчинних факторів росту, які індукують васкуляризацію, захищають тканини або пригнічують імунний захист хазяїна [Р. Zuk, 2013]. Підвищення експресії нейротрофічних факторів може сприяти проростанню аксонів і регенерації нервів, збільшенню м'язової маси органів-мішеней і, таким чином, прискоренню відновлення рухової функції [S. Marconi, 2012; Р. Zuk, 2013; D. F. Kalbermatten, 2011]. Вважається, що позитивні ефекти ММСК-ЖТ для регенерації периферичних нервів виникають насамперед

через секрецію різноманітних нейротрофічних факторів. BDNF, GDNF, циліарний нейротрофічний фактор (CNTF), bFGF, інсуліноподібний фактор росту 1 (IGF-1), фактор росту нервів (NGF), нейротрофін (NT)-3 і NT-4 експресувалися в ММСК-ЖТ *in vitro* та *in vivo* [D. Y. Kim, 2014; A. Wilkins, 2009].

Профілі експресії нейротрофічних факторів ММСК-ЖТ та МСК з кісткової тканини показали подібні характеристики експресії генів у двох групах [P. J. Kingham, 2014]. Обидва вони секретують декілька факторів росту, таких як інсуліноподібний фактор росту 1 (IGF-1), VEGF, FGF-2, PDGF та BDNF [A. Wilkins, 2009; M. Osugi, 2012]. Крім того, було показано, що після ін'єкції ММСК-ЖТ деякі клітини мігрують до місць пошкодження нерву, допомагаючи зменшити запалення та вивільняти фактори росту нервів для сприяння регенерації нервів [S. Marconi, 2012].

Нейротрофічний потенціал ММСК-ЖТ визначається анатомічними ділянками [R. Kaewkhaw, 2011; P. E. Engels, 2013], глибиною жирового шару [P. E. Engels, 2013; T. Mathias, 2015] та віком донора [C. Mantovani, 2012; S. Yoshihiro, 2012]. Як просто МСК, так і ММСК-ЖТ, стимульовані факторами росту, підвищували кровноносність каналів брилінового нерву. Таким чином, ММСК-ЖТ виробляє функціональні нейротрофічні та ангіогенні фактори, створюючи більш бажане мікросередовище для регенерації нервів [P. J. Kingham, 2014].

## РОЗДІЛ 2

### МЕТОДИ І МАТЕРІАЛИ ДОСЛІДЖЕННЯ

В роботі використані експериментальні тварини (аутбредні статевозрілі щури, самки) розведення віварію ДУ «ІНХ НАМН»). Усі роботи з експериментальними тваринами проводили з дотриманням законодавчих норм та вимог Закону України №3447 IV «Про захист тварин від жорстокого поводження», «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для дослідних та інших наукових цілей» (Страсбург, 1986), з урахуванням принципів біоетики та норм біологічної безпеки. Тварин утримували у стандартних умовах акредитованого віварію, знеболення та евтаназію проводили під ефірним наркозом.

#### 2.1. Отримання ММСК ЖТ та їх КС

ММСК виділяли з ЖТ експериментальних щурів (самки,  $n = 10$ ). Тварин наркотизували ефіром. Операційне поле обробляли 96 % етанолом. Стерильними ножицями розкривали черевинну порожнину і з пахової ділянки виділяли ЖТ. Фрагменти ЖТ промивали декілька разів в свіжих порціях розчину PBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline, Sigma) без  $\text{Ca}^{+2}$  та  $\text{Mg}^{+2}$ .

Для отримання ММСК фрагменти ЖТ в стерильних умовах подрібнювали мікроножицями, інкубували в 0,075 % розчині колагенази (тип I) впродовж 60 хв при  $37^{\circ}\text{C}$ , постійно помішуючи. Фермент інактивували додаванням (1:1) середовища ДМЕМ (Sigma) з 10 % фетальної телячої сироватки (ФТС), клітини осаджували центрифугуванням 10 хв при 1000 об/хв. Рідку фазу з вмістом жирових клітин видаляли піпеткою Пастера, осад ресуспендували в ростовому середовищі (ДМЕМ + 10 % ФТС). Видаляли мононуклеарні клітини за допомогою центрифугування впродовж 30 хв при 1000 об/хв в градієнті щільності Histopaque

(Sigma). Отриману суспензію клітин відмивали двічі в ростовому середовищі (по 10 хв при 1000 об/хв).

Кількість та життєздатність отриманих клітин визначали в стандартному цитологічному тесті з 0,2 % водним розчином трипанового синього («Merch», Німеччина).

Отримані клітини висівали на дно пластикових чашок Петрі по  $5-9 \times 10^6$  клітин на чашку. Обережно, без кругових рухів розподіляли суспензію рівномірно по всій поверхні дна чашки Петрі. Культури утримували в CO<sub>2</sub>-інкубаторі (Nuve, Туреччина) в стандартних умовах (95 % вологості, 37° C). Після 24-год інкубування культур збирали КС ММСК, визначали концентрацію протеїнів за Лоурі, заморожували в пластикових пробірках для подальшого використання.

Культури клітин фіксували в 10 % нейтральному формаліні («Bіо-Optica», Італія) та проводили імуноцитохімічне дослідження на CD105 (ендогліл, мембранний глікопротеїн I типу, маркер ММСК) з використанням мишачих моноклональних антитіл ENG (CD105) («OriGene», США, 1:200). Візуалізацію імуноцитохімічної реакції проводили за допомогою набору «Immunoperoxidase secondary Detection System» («Millipore», США).

## **2.2. Отримання культури нервових клітин (E16)**

Джерелом матеріалу для отримання культур нервової тканини була кора головного мозку плодів експериментальних щурів 16 доби гестації. Вагітних самок щура наркотизували ефіром. Операційне поле обробляли 96 % етанолом. Стерильними ножицями розкривали черевинну порожнину і виймали обидва роги матки з плодами на стерильну серветку. Діставали з матки плоди. З голови кожного плода діставали головний мозок, мікроножицями знімали судинну оболонку. Кору головного мозку подрібнювали мікроножицями на фрагменти 1-2 мм<sup>3</sup>. Фрагменти кори експлантували по 10-12 одиниць на покривне скельце, що попередньо було вкрите спиртовим розчином поліетиленіміну (Sigma) для кращої адгезії. В культури

додавали ростове середовище стандартного складу (середовище ДМЕМ з 0,2 % глютаміну, 20 % ФТС, 800 мг% глюкози, 0,2 мл розчину інсулін+трансферин+селеніт). Культивування нервової тканини (E16) проводили в CO<sub>2</sub>-інкубаторі (Nuve, Туреччина) в стандартних умовах (95 % вологості, 37° С) в середовищі стандартного складу.

Прижиттєве спостереження з мікрофотореєстрацією проводили упродовж експерименту за допомогою інвертованого мікроскопа NIKON TS-100 (Японія).

### **2.3. Вивчення впливу КС ММСК ЖТ**

Після отримання конфлуентного шару у культурі нервових клітин проводили механічний розріз зони росту клітин металевим лезом. Клітини, що відкріплялись від поверхні, видаляли промиванням чашок Петрі середовищем ДМЕМ. До контрольних культур нервових клітин щура після розрізу зони росту додавали ДМЕМ з 10 % ФТС (стандартні умови культивування, контроль). До дослідних культур додавали 0,10 мг/мл (за кількістю протеїнів) КС ММСК ЖТ. Культури тримали в CO<sub>2</sub>-інкубаторі за стандартних умов. Наприкінці досліду (4-а доба) культури фіксували в 10%-ому нейтральному формаліні Bio-Optica (Італія).

Фенотипові особливості культивованих клітин вивчали на цитологічних препаратах після забарвлення гематоксиліном Караччі).

Мікроскопічне дослідження та фотореєстрацію цитологічних препаратів культур здійснювали на світлооптичному фотомікроскопі NIKON Eclipse E200 (Японія).

### **2.4. Морфометричні дослідження**

Кількісні дослідження проводили в 10 репрезентативних полях зору зі стандартною вимірювальною шкалою (об'єкт – мікромметр). Цифрові зображення

аналізували за допомогою програмного забезпечення ImageView (2020, Китай), визначаючи ширину ділянки перерізу, кількість мігруючих клітин, щільність відростків, довжину зарослої ділянки перерізу (див. Додатки 1, 2, 3).

## 2.5. Статистичний аналіз

Статистичну обробку отриманих даних проводили за допомогою програмного комплексу «Statistica 8.0» (StatSoft, Inc. (2007)). Застосовували непараметричні методи варіаційної статистики: рангово-дискримінантний аналіз (Kruskal-Wallis ANOVA-тест) для множинного порівняння та Mann-Whitney U-тест для попарного порівняння незалежних груп. Нормальність розподілу даних визначали за критерієм Шапіро-Вілка. Дані представлені у вигляді ( $M \pm m$ ), де  $M$  – середнє значення;  $m$  – стандартне відхилення від середнього значення; а також  $M$  (25 %; 75 %), де  $M$  – медіана, (25 %; 75 %) – міжквартильний діапазон між 25-м і 75-й процентилями. Відмінності вважали статистично значущими при  $p < 0,05$ .

## РОЗДІЛ 3

### РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

#### 3.1. Відтворення експериментальної моделі культури нервових клітин

При культивуванні кори головного мозку плодів щура (E16) на 7-у добу формувалася конфлуентний моношар (рис.3.1, а), після чого зону росту розсікали, створюючи ділянку перерізу (рис.3.1, б). Далі до контрольних культур нервових клітин щура після розрізу зони росту додавали DMEM з 10 % ФТС (стандартні умови культивування, контроль), до дослідних культур додавали 0,10 мг/мл (за кількістю протеїнів) КС ММСК ЖТ.

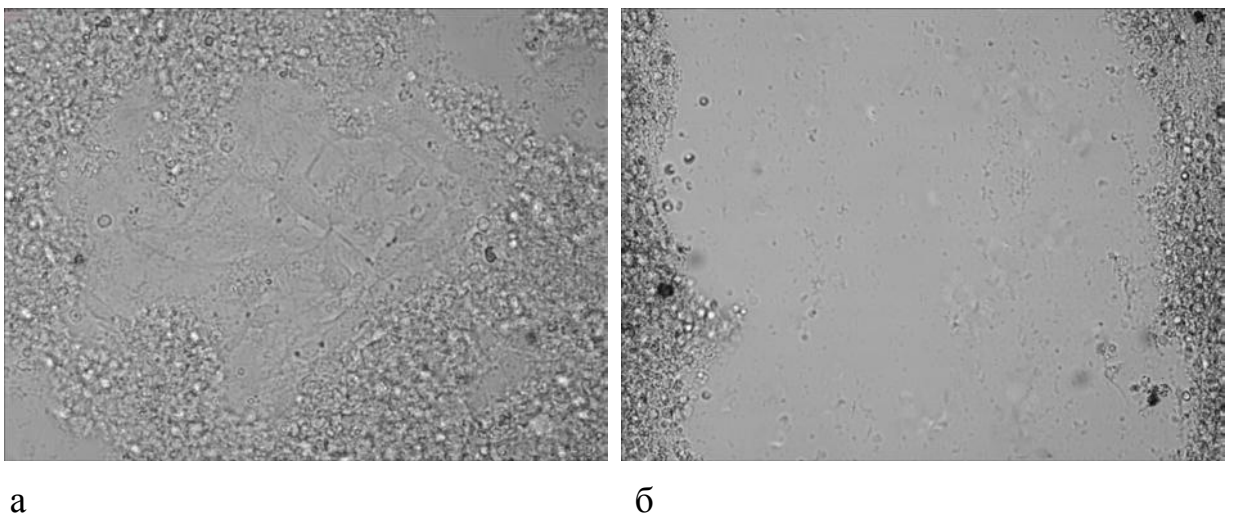


Рис.3.1. Мікрофотографії цитопрепаратів клітинних культур. Світлова мікроскопія, x400:

- а – незабарвлена культура нервових клітин щура (E16), зона росту, 7-а доба культивування;
- б – ділянка перерізу (вертикальні краї з лівого і правого боку) відразу після розсічення зони росту культури нервових клітин щура (E16), 7-а доба культивування.

#### 3.2. Характеристика культивованих мононуклеарних клітин ЖТ щура

За даними імуноцитохімічного дослідження, в 24-год культурах мононуклеарних клітин, виділених з ЖТ щура, кількість  $CD105^+$ -клітин (імунопозитивних на ендоглін, один із маркерів ММСК) становила  $(85,0 \pm 0,7) \%$  (рис.3.2). Виділені з ЖТ мононуклеарні клітини при висіванні на адгезивну поверхню пластикових чашок Петрі упродовж 24 год формували моношар клітин переважно фібробластоподібного фенотипу: великі клітини з еліпсоїдним сплющеним великим ядром, декількома відростками і філоподіями; дрібні фіброцити (веретеновидні з невеликим видовженим ядром) та жироподібні клітини з досить об'ємною цитоплазмою.

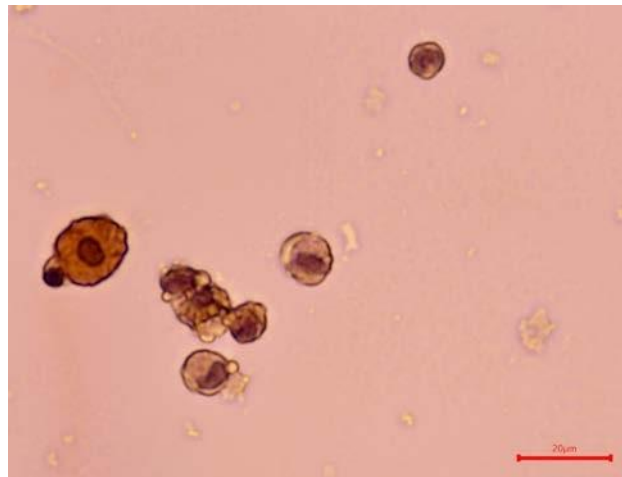


Рис.3.2. Мікрофотографія цитопрепарату 24-год культури мононуклеарних клітин ЖТ щура. Світлова мікроскопія.  $CD105^+$ -клітини, імуноцитохімічне забарвлення на ендоглін (коричневий колір).

Частина клітин формували клітинні агрегати сфероїдної форми, що є однією з характеристик стовбурових/прогеніторних клітин, з яких надалі, після прикріплення до поверхні, мігрували клітини з довгими відростками, формуючи зону росту. При подальшому культивуванні (у середовищі DMEM + 10% ФТС) відбувалось спонтанне диференціювання фібробластоподібних клітин з набуттям зірчастої форми і довгих гіллястих відростків, що формували мережу, а також моношарові розрощення фібробластоподібних клітин веретеновидної і полігональної форми. У комплексі з даними щодо експресії маркера  $CD105$ , здатність до формування

сфероїдних агрегатів та наступна диференціація і фібробластоподібна морфологія клітин після культивування на адгезивних пластикових чашках Петрі – усе це дозволило нам вважати, що виділені клітини містять переважно або великою мірою клітини зі стовбуровими і прогеніторними характеристиками, тобто ММСК. Таким чином, КС отримано з 24-год культур моноклеарних клітин ЖТ щура з переважанням CD105<sup>+</sup>-клітин, які, вочевидь, є ММСК.

### **3.3. Вплив КС МСК ЖТ на культуру нервових клітин**

Після розрізу зони росту та додавання до культур нервових клітин щура DMEM з 10 % ФТС (контрольні культури) або КС ММСК ЖТ (0,10 мг/мл, дослідні культури) спостерігали процеси ендогенної регенерації, динаміка яких різнилася залежно від культивацийних умов.

За стандартних умов у контрольних культурах упродовж 1-ї доби після перерізу моношару спостерігали проростання численних довгих розгалужених відростків клітин із країв розсіченого моношару у ділянку перерізу по всій його довжині та міграцію окремих клітин. Через 2 доби у ділянку перерізу мігрували поодинокі округлі та краплеподібні клітини з довгими відростками, а відростки клітин з моношару, що проросли перпендикулярно в напрямку протилежного краю ділянки перерізу, розгалужувалися, утворюючи мережу. На 3-ю добу в ділянці перерізу спостерігали поодинокі клітини з довгими відростками або невеликі їх комплекси, в окремих частинах залишались збереженими пророслі відростки; інші частини внаслідок редукції відростків та дегенерації клітин зазнавали спустошення, що посилювалось на 4-у добу (рис.3.3, а,в).

Морфометричне дослідження засвідчило, що кількість мігруючих у ділянку перерізу клітин з 1-ї по 3-ю добу культивування суттєво не змінювалась, надалі зменшуючись на 4-у добу (табл.3.1). З 1-ї по 3-ю добу культивування за рахунок проростання і розгалуження щільність відростків у ділянці перерізу зростала (у 2,4 рази,  $p = 0,022$ ), але різко меншала з 3-ї по 4-у добу спостереження (у 5,4 рази,  $p >$

0,05, U-критерій Манна-Уїтні). Середня довжина зарослої ділянки перерізу на 4-у добу спостереження становила 9,2 % її повної довжини.

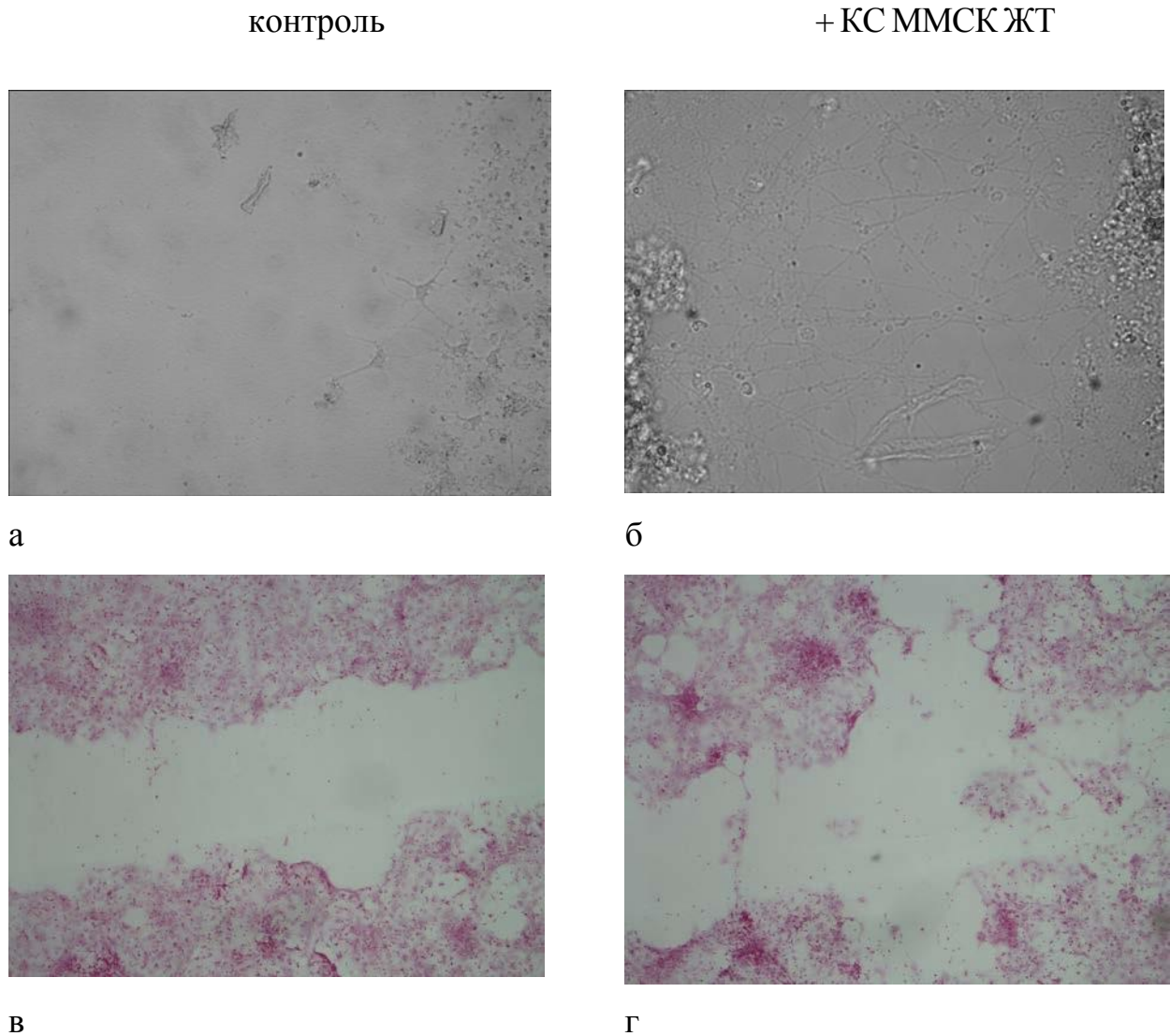


Рис.3.3. Мікрофотографії цитопрепаратів культур нервових клітин щура (E16), ділянка перерізу, 11-а доба культивування, 4-а доба після трансекції моношару.

Світлова мікроскопія, x400, незабарвлена культура (а, б) та забарвлення гематоксилином-еозином (в, г). Редукція відростків і дегенерація клітин в ділянці перерізу (а,в, контрольні культури), утворення щільної мережі відростків і міграція клітин в ділянку перерізу (б), диференціація виселених клітин, заростання ділянки перерізу (г) у дослідних культурах.

Таблиця 3.1 - Показники зарощення зони трансекції у культурі нервових клітин за різних дослідних умов

№	Умови досліджу	Строк спостереження, доба	Кількість мігруючих клітин	Щільність відростків	Довжина зарощеної ділянки	P (U-критерій Манна-Уїтні)
			М (25%; 75%)	М (25%; 75%)	% від загальної довжини ділянки перерізу	
1	контроль, n = 10	1-а	39,0 (27,0; 49,0)	35,5 (24,0; 53,0) * <sub>1</sub> & <sub>3</sub>	-	* <sub>1</sub> - p1,5 = 0,048 * <sub>2</sub> - p4,8 = 0,006  & <sub>1</sub> - p5,8 = 0,001 & <sub>2</sub> - p6,8 = 0,002 & <sub>3</sub> - p1,3 = 0,022 & <sub>4</sub> - p5,7 = 0,008 & <sub>5</sub> - p5,8 = 0,004
2		2-а	29,0 (21,0; 73,0)	41,0 (18,0; 96,0)	-	
3		3-а	45,0 (36,0; 78,0)	85,0 (23,0; 108,0) & <sub>3</sub>	-	
4		4-а	25,5 (8,0; 157,0)	15,5 (3,5; 43,5) * <sub>2</sub>	9,2	
5	+ КС ММСК ЖТ, n = 10	1-а	32,0 (25,0; 56,0) & <sub>1</sub>	54,0 (46,0; 72,0) * <sub>1</sub> & <sub>4</sub> & <sub>5</sub>	-	
6		2-а	56,0 (32,0; 82,0) & <sub>2</sub>	129,0 (21,0; 248,0)	-	
7		3-а	64,0 (38,0; 89,0)	237,0 (197,0; 355,0) & <sub>4</sub>	-	
8		4-а	175,0 (147,0; 207,0) & <sub>1</sub> & <sub>2</sub>	194,0 (92,0; 204,0) * <sub>2</sub> & <sub>5</sub>	23,7	

Примітка: М (25%; 75%), де М - медіана; (;) - інтерквартильний діапазон;  
\* - відмінності статистично значущі у порівнянні з контролем;  
& - відмінності статистично значущі між показниками в межах групи у різні терміни спостереження.

Таким чином, після механічного перерізу в культурі нервових клітин за стандартних умов з 1-ї по 3-ю добу відбувались процеси ендогенної регенерації, які, однак, зменшувались до 4-ї доби спостереження.

Додавання до стандартного культурального середовища КС ММСК ЖТ сприяло значному зростанню ступеня та тривалості процесів ендогенної регенерації в культурі нервових клітин. Упродовж 1-2-ї доби за впливу КС ММСК ЖТ ділянка перерізу інтенсивніше заповнювалась відростками, спрямованими перпендикулярно і вздовж країв моношару, а також округлими клітинами без відростків або з одним коротким відростком та комплексами таких клітин. Через 3 доби за впливу КС ММСК ЖТ в окремих ділянках відбувалось повне «зшивання» обох країв розрізаного моношару клітинними відростками, які своїми розгалуженнями утворювали щільну сітку; спостерігали міграцію малодиференційованих округлих клітин на значну відстань від краю моношару з утворенням груп. Через 4 доби за впливу КС ММСК ЖТ проростання відростків у ділянці перерізу продовжувалось з утворенням мережі (рис.3.3, б), виявляли як малодиференційовані клітини, так і клітини гліального фенотипу трикутної та зірчастої форми з відростками та їх невеликі комплекси, окремі частини ділянки розрізу повністю заповнювались відростками та клітинами (рис.3.3, г).

За впливу КС ММСК ЖТ кількість клітин, що мігрували з моношару в ділянку перерізу, зростала з 1-ї до 4-ї доби спостереження у 5,5 разів ( $p = 0,001$ , U-критерій Манна-Уїтні), перевищуючи контрольні показники у 7 разів. Щільність клітинних відростків у ділянці перерізу за впливу КС ММСК ЖТ збільшувалась на 3-4-у добу спостереження у 3-4 рази ( $p = 0,004$ ,  $p = 0,008$ ), значуще перевищуючи показники контрольних культур за стандартних умов на 1-у ( $p = 0,048$ ) та 4-у добу спостереження (у 12,5 рази,  $p = 0,006$ , U-критерій Манна-Уїтні). Середня довжина зарослої частини ділянки перерізу за впливу КС ММСК ЖТ становила 23,7 % загальної довжини ділянки перерізу, тобто при додаванні КС ММСК ЖТ відносна (%) довжина зарослої частини збільшилась, порівняно з контрольними умовами, у 2,6 рази.

Проведені дослідження засвідчили стимулюючий вплив КС від 24-год культур ММСК ЖТ на зарощення ділянки перерізу моношару культур нервових клітин головного мозку щура. За відсутності таких додаткових стимулів у контрольних культурах без додавання КС ММСК ЖТ ендogenous регенеративні процеси згортались, починаючи з 3 доби культивування. Виявлений активуючий щодо ендogenous регенерації вплив КС від 24-год культур ММСК ЖТ щура, вочевидь, має в своїй основі ефекти біологічно активних агентів (нейротрофічних і ростових факторів, цитокінів, позаклітинних везикул), що входять до складу КС досліджуваних клітин.

Як зазначено вище, КС були отримані від 24-год культур клітин з переважанням CD105<sup>+</sup>-клітин (вочевидь, ММСК ЖТ).

Отримані дані, загалом, відповідають відомим даним (Kocan et al, 2017; Willis et al, 2020; Xu et al, 2020). Згідно з різними даними, ММСК ЖТ здатні експресувати і продукувати велику кількість сигнальних молекул (IL-1 • , IL-1 • , IL-2, IL-4, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12, IL-13, IL-15, IL-17, IFN- • • • TGF- • 1, TGF- • 2, TNF- • , NGF, BDNF, GDNF, VEGF, IGF-1, GM-CSF, G-CSF, PDGF, FGF, EGF, HGF). Ці протеїни є ростовими та нейротрофічними факторами, морфогенами, модулюючими та регуляторними цитокінами, які залучаються у численні біологічні процеси (індивідуальний розвиток, клітинний метаболізм, проліферація, диференціація, виживання та / або апоптоз). Зазначені протеїни, з огляду на їх відомі властивості, з великою ймовірністю, є чинниками зареєстрованих активуючих нейрорегенеративних опосередкованих ефектів ММСК ЖТ в культурі нервових клітин, що через паракринну передачу сигналів стимулюють процеси клітинної міграції та диференціювання і в кінцевому підсумку сприяють зарощенню ділянки перерізу.

Таким чином, наші дані сприяють підтвердженню концепції, яка пояснює покращення функціонального відновлення при модельованих ураженнях ЦНС опосередкованим паракринним впливом трансплантованих СК/ПК, та відкривають перспективи щодо можливого використання КС клітин при лікуванні захворювань

ЦНС.

## ВИСНОВКИ

1. Відпрацьовано модель для дослідження регенеративного впливу ММСК ЖТ *in vitro* – модель механічного перерізу культури нервових клітин. У 24-год культурах мононуклеарних клітин, виділених з ЖТ щура, кількість CD105 + -клітин (імунопозитивних на ендоглін, один із маркерів ММСК) становить  $(85,0 \pm 0,7) \%$  (які, вочевидь, є ММСК).
2. КС від 24-год культур ММСК ЖТ стимулюють процеси ендогенної регенерації в культурі нервових клітин головного мозку щура з механічним перерізом моношару.
3. За даними морфометричного дослідження, за впливу КС ММСК ЖТ у ділянці перерізу до 4-ї доби спостереження зростає кількість мігруючих клітин (у 7 разів), щільність відростків клітин (у 12,5 рази) та довжина зарослої ділянки (у 2,6 рази).

## СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Катина М.Н., Гайфуллина Р.Ф., Хаятова З.Г., Эмене Ч.Ч., Ризванов А.А. Выделение, культивирование и дифференцировка мультипотентных мезенхимных стромальных клеток из жировой ткани крыс *Rattus norvegicus* и хомяков *Mesocricetus auratus*. Гены & Клетки. 2012;VII(3):82-87.
2. Лызиков А. Н., Осипов Б. Б., Скуратов А. Г. Стволовые клетки в регенеративной медицине: достижения и перспективы. Проблемы здоровья и экологии. 2015;3(45):4-8.
3. Нимер С. Н. Стволовые клетки (обзор литературы). Проблемы здоровья и экологии. 2009;1(19):46-51.
4. Романенков Н.С., Мовчан К.Н. Методики выделения мезенхимальных стволовых клеток из аутологичной жировой ткани. Современные проблемы науки и образования. 2016;2.
5. Шахпазян Н.К., Астрелина Т.А., Яковлева М.В. Мезенхимальные стволовые клетки из различных тканей человека: биологические свойства, оценка качества и безопасности для клинического применения. Гены & Клетки. 2012;1:23-33.
6. Arnhold S, Wensch S. Adipose tissue derived mesenchymal stem cells for musculoskeletal repair in veterinary medicine. Am J Stem Cells. 2015;4(1):1-12.
7. Baer PC. Adipose-derived mesenchymal stromal/stem cells: An update on their phenotype in vivo and in vitro. World J Stem Cells. 2014;6(3):256-265.
8. Bobi, J., Solanes, N., Fernández-Jiménez, R., Galán-Arriola, C., Dantas, A. P., Fernández-Friera, L., Gálvez-Montón, C., Rigol-Monzó, E., Agüero, J., Ramírez, J., Roqué, M., Bayés-Genís, A., Sánchez-González, J., García-Álvarez, A., Sabaté, M., Roura, S., Ibáñez, B., & Rigol, M. (2017). Intracoronary

Administration of Allogeneic Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells Improves Myocardial Perfusion But Not Left Ventricle Function, in a Translational Model of Acute Myocardial Infarction. *Journal of the American Heart Association*, 6(5), e005771.

9. Bydon, M., Dietz, A. B., Goncalves S. et al., “CELLTOP clinical trial: first report from a phase 1 trial of autologous adipose tissue-derived mesenchymal stem cells in the treatment of paralysis due to traumatic spinal cord injury,” *Mayo Clinic Proceedings*, vol. 95, no. 2, pp. 406–414, 2020.

10. C. F. Markarian, G. Z. Frey, M. D. Silveira et al., “Isolation of adipose-derived stem cells: a comparison among different methods,” *Biotechnology Letters*. 2014; 36(4):693–702.

11. Cheng K, Kuo T. Human adipose-derived stem cells: Isolation, characterization and current application in regeneration medicine. *Genomic Medicine, Biomarkers, and Health Sciences*. 2011;3(2);53-62.

12. Chi, K., Fu, R. H., Huang, Y. C., Chen, S. Y., Hsu, C. J., Lin, S. Z., Tu, C. T., Chang, L. H., Wu, P. A., & Liu, S. P. (2018). Adipose-derived Stem Cells Stimulated with n-Butylidenephthalide Exhibit Therapeutic Effects in a Mouse Model of Parkinson's Disease. *Cell transplantation*, 27(3), 456–470.

13. Choi YS, Disting GJ, Stubbs S, et al. Differentiation of human adipose-derived stem cells into beating cardiomyocytes. *J Cell Mol Med*. 2010;14(4):878-889.

14. Colpo, G. D., Furr Stimming, E., & Teixeira, A. L. (2019). Stem cells in animal models of Huntington disease: A systematic review. *Molecular and cellular neurosciences*, 95, 43–50.

15. Francis MP, Sachs PC, Elmore LW, Holt SE. Isolating adipose-derived mesenchymal stem cells from lipoaspirate blood and saline fraction. *Organogenesis*. 2010 Jan-Mar;6(1):11-4.

16. Francis Sam L., Duchi S. Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells in the Use of Cartilage Tissue Engineering: The Need for a Rapid Isolation Procedure. *Stem Cells*. 2018;9.

17. Ge, Y., Zhang, Q., Jiao, Z., Li, H., Bai, G., & Wang, H. (2018). Adipose-derived stem cells reduce liver oxidative stress and autophagy induced by ischemia-reperfusion and hepatectomy injury in swine. *Life sciences*, 214, 62–69.
18. Grabowska I, Zimowska M, Maciejewska K, et al. Adipose Tissue-Derived Stromal Cells in Matrigel Impacts the Regeneration of Severely Damaged Skeletal Muscles. *Int J Mol Sci*. 2019;20(13):3313.
19. Hass, R., Kasper, C., Böhm, S. et al. Different populations and sources of human mesenchymal stem cells (MSC): A comparison of adult and neonatal tissue-derived MSC. *Cell Commun Signal*. 2011; 9.
20. He, Y., Guo, Y., Xia, Y., Guo, Y., Wang, R., Zhang, F., Guo, L., Liu, Y., Yin, T., Gao, C., Gao, E., Li, C., Wang, S., Zhang, L., Yan, W., & Tao, L. (2019). Resistin promotes cardiac homing of mesenchymal stem cells and functional recovery after myocardial ischemia-reperfusion via the ERK1/2-MMP-9 pathway. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, 316(1), 233–244.
21. Hu, X., Leak, R. K., Shi, Y., Suenaga, J., Gao, Y., Zheng, P., & Chen, J. (2015). Microglial and macrophage polarization—new prospects for brain repair. *Nature reviews. Neurology*, 11(1), 56–64.
22. Jeon, G. S., Im, W., Shim, Y. M., Lee, M., Kim, M. J., Hong, Y. H., Seong, S. Y., Kim, M., & Sung, J. J. (2016). Neuroprotective Effect of Human Adipose Stem Cell-Derived Extract in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Neurochemical research*, 41(4), 913–923.
23. Jiao, Z., Ma, Y., Liu, X., Ge, Y., Zhang, Q., Liu, B., & Wang, H. (2019). Adipose-Derived Stem Cell Transplantation Attenuates Inflammation and Promotes Liver Regeneration after Ischemia-Reperfusion and Hemihepatectomy in Swine. *Stem cells international*, 2019, 2489584.
24. Joo, H. J., Kim, J. H., & Hong, S. J. (2017). Adipose Tissue-Derived Stem Cells for Myocardial Regeneration. *Korean circulation journal*, 47(2), 151–159. <https://doi.org/10.4070/kcj.2016.0207>

25. Kirkpatrick C.J. Comparative effects of trypsin, collagenase and mechanical harvesting on cell membrane lipids studied in monolayer-cultured endothelial cells and a green monkey kidney cell line. *Biochim. Biophys. Acta.* 1985;846(1):120-126.
26. Kocan B, Maziarz A, Tabarkiewicz J, Ochiya T, Banaś-Ząbczyk A. Trophic Activity and Phenotype of Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells as a Background of Their Regenerative Potential. *Stem Cells Int.* 2017;2017:1653254.
27. Krampera M, Franchini M, Pizzolo G, Aprili G. Mesenchymal stem cells: from biology to clinical use. *Blood Transfus.* 2007;5(3):120-129.
28. Kurita, M. Influences of centrifugation on cells and tissues in liposuction aspirates: optimized centrifugation for lipotransfer and cell isolation. *Plast. Reconstr. Surg.* 2008;121(3):1033-1041.
29. Lee, M., Ban, J. J., Yang, S., Im, W., & Kim, M. (2018). The exosome of adipose-derived stem cells reduces  $\beta$ -amyloid pathology and apoptosis of neuronal cells derived from the transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Brain research*, 1691, 87–93.
30. Lendeckel, S., Jödicke, A., Christophis, P., Heidinger, K., Wolff, J., Fraser, J. K., Hedrick, M. H., Berthold, L., & Howaldt, H. P. (2004). Autologous stem cells (adipose) and fibrin glue used to treat widespread traumatic calvarial defects: case report. *Journal of cranio-maxillo-facial surgery : official publication of the European Association for Cranio-Maxillo-Facial Surgery*, 32(6), 370–373.
31. Ma, T., Gong, K., Ao, Q., Yan, Y., Song, B., Huang, H., Zhang, X., & Gong, Y. (2013). Intracerebral transplantation of adipose-derived mesenchymal stem cells alternatively activates microglia and ameliorates neuropathological deficits in Alzheimer's disease mice. *Cell transplantation*, 22 Suppl 1, S113–S126.
32. McCoy, M. K., Martinez, T. N., Ruhn, K. A., Wrage, P. C., Keefer, E. W., Botterman, B. R., Tansey, K. E., & Tansey, M. G. (2008). Autologous transplants of Adipose-Derived Adult Stromal (ADAS) cells afford dopaminergic

neuroprotection in a model of Parkinson's disease. *Experimental neurology*, 210(1), 14–29. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2007.10.011>

33. Mendez JJ, Ghaedi M, Steinbacher D, Niklason LE. Epithelial cell differentiation of human mesenchymal stromal cells in decellularized lung scaffolds. *Tissue Eng Part A*. 2014;20(11-12):1735-1746.

34. Mun CH, Kang MI, Shin YD, Kim Y, Park YB. The Expression of Immunomodulation-Related Cytokines and Genes of Adipose- and Bone Marrow-Derived Human Mesenchymal Stromal Cells from Early to Late Passages. *Tissue Eng Regen Med*. 2019;16(1):103-105.

35. Oedayrajsingh-Varma M. J., van Ham S. M., Knippenberg M., et al. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cell yield and growth characteristics are affected by the tissue-harvesting procedure. *Cytotherapy*. 2006;8(2):166–177.

36. Omar AM, Meleis AE, Arfa SA, Zahran NM, Mehanna RA. Comparative Study of the Therapeutic Potential of Mesenchymal Stem Cells Derived from Adipose Tissue and Bone Marrow on Acute Myocardial Infarction Model. *Oman Med J*. 2019 Nov;34(6):534-543

37. Papait A, Vertua E, Magatti M, et al. Mesenchymal Stromal Cells from Fetal and Maternal Placenta Possess Key Similarities and Differences: Potential Implications for Their Applications in Regenerative Medicine. *Cells*. 2020;9(1):127.

38. Patrick C. Baer, Helmut Geiger, "Adipose-Derived Mesenchymal Stromal/Stem Cells: Tissue Localization, Characterization, and Heterogeneity", *Stem Cells International*, vol. 2012, Article ID 812693, 11 pages, 2012

39. Piovesana, R., Faroni, A., Magnaghi, V. et al. (2019). M2 receptors activation modulates cell growth, migration and differentiation of rat Schwann-like adipose-derived stem cells. *Cell Death Discov*. 5, 92

40. Pittenger MF, Discher DE, Péault BM, Phinney DG, Hare JM, Caplan AI. Mesenchymal stem cell perspective: cell biology to clinical progress. *NPJ Regen Med*. 2019;4:22.

41. Sándor, G. K., Numminen, J., Wolff, J., Thesleff, T., Miettinen, A., Tuovinen, V. J., Mannerström, B., Patrikoski, M., Seppänen, R., Miettinen, S., Rautiainen, M., & Öhman, J. (2014). Adipose stem cells used to reconstruct 13 cases with cranio-maxillofacial hard-tissue defects. *Stem cells translational medicine*, 3(4), 530–540.
42. Schäffler A., Büchler C. Concise review: adipose tissue-derived stromal cells—basic and clinical implications for novel cell-based therapies. *Stem Cells*. 2007;25(4):818–827.
43. Schwerk, A., Altschüler, J., Roch, M., Gossen, M., Winter, C., Berg, J., Kurtz, A., & Steiner, B. (2015). Human adipose-derived mesenchymal stromal cells increase endogenous neurogenesis in the rat subventricular zone acutely after 6-hydroxydopamine lesioning. *Cytotherapy*, 17(2), 199–214.
44. Semenova E, Chroscinska-Krawczyk M, Grudniak MP, Oldak T, Machaj EK. Clinical application of AD-MSCs – A review. *J Pre Clin Clin Res*.2018;12(3):100-105.
45. Spasovski, D., Spasovski, V., Baščarević, Z., Stojiljković, M., Vreća, M., Anđelković, M., & Pavlović, S. (2018). Intra-articular injection of autologous adipose-derived mesenchymal stem cells in the treatment of knee osteoarthritis. *The journal of gene medicine*, 20(1)
46. ter Huurne, M., Schelbergen, R., Blattes, R., Blom, A., de Munter, W., Grevers, L. C., Jeanson, J., Noël, D., Casteilla, L., Jorgensen, C., van den Berg, W., & van Lent, P. L. (2012). Antiinflammatory and chondroprotective effects of intraarticular injection of adipose-derived stem cells in experimental osteoarthritis. *Arthritis and rheumatism*, 64(11), 3604–3613.
47. Thesleff, T., Lehtimäki, K., Niskakangas, T., Huovinen, S., Mannerström, B., Miettinen, S., Seppänen-Kajjansinkko, R., & Öhman, J. (2017). Cranioplasty with Adipose-Derived Stem Cells, Beta-Tricalcium Phosphate Granules and Supporting Mesh: Six-Year Clinical Follow-Up Results. *Stem cells translational medicine*, 6(7), 1576–1582.

48. Urrutia DN, Caviedes P, Mardones R, Minguell JJ, Vega-Letter AM, Jofre CM. Comparative study of the neural differentiation capacity of mesenchymal stromal cells from different tissue sources: An approach for their use in neural regeneration therapies. *PLoS One*. 2019;14(3)
49. Vériter S, André W, Aouassar N, Poirel HA, Lafosse A, Docquier PL, Dufrane D. Human Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells in Cell Therapy: Safety and Feasibility in Different "Hospital Exemption" Clinical Applications. *PLoS One*. 2015 Oct 20;10(10):e0139566.
50. Xu, C., Diao, Y. F., Wang J. et al., "Intravenously infusing the secretome of adipose-derived mesenchymal stem cells ameliorates neuroinflammation and neurological functioning after traumatic brain injury," *Stem Cells and Development*, vol. 29, no. 4, pp. 222–234, 2020.
51. Yamato, M., Sakai, Y., Mochida, H., Kawaguchi, K., Takamura, M., Usui, S., Seki, A., Mizukoshi, E., Yamashita, T., Yamashita, T., Ishida, K., Nasti, A., Tuyen, H., Komura, T., Yoshida, K., Wada, T., Honda, M., & Kaneko, S. (2019). Adipose tissue-derived stem cells prevent fibrosis in murine steatohepatitis by suppressing IL-17-mediated inflammation. *Journal of gastroenterology and hepatology*, 34(8), 1432–1440.
52. Yin, H., Jiang, T., Deng, X., Yu, M., Xing, H., & Ren, X. (2018). A cellular spinal cord scaffold seeded with rat adipose-derived stem cells facilitates functional recovery via enhancing axon regeneration in spinal cord injured rats. *Molecular medicine reports*, 17(2), 2998–3004.
53. Yoshida, Y., Matsubara, H., Fang, X., Hayashi, K., Nomura, I., Ugaji, S., Hamada, T., & Tsuchiya, H. (2019). Adipose-derived stem cell sheets accelerate bone healing in rat femoral defects. *PloS one*, 14(3), e0214488.
54. Zachar V. Isolation and growth of adipose tissue-derived stem cells /V. Zachar. *Methods Mol. Biol.* 2011;698:37-49.
55. Zack-Williams, S. D., Butler, P. E., & Kalaskar, D. M. (2015). Current progress in use of adipose derived stem cells in peripheral nerve regeneration. *World journal of stem cells*, 7(1), 51–64.

56. Zhang, J., Liu, Y., Chen, Y., Yuan, L., Liu, H., Wang, J., Liu, Q., & Zhang, Y. (2020). Adipose-Derived Stem Cells: Current Applications and Future Directions in the Regeneration of Multiple Tissues. *Stem cells international*, 2020, 8810813.
57. Wu, S. H., Liao, Y. T., Hsueh, K. K., Huang, H. K., Chen, T. M., Chiang, E. R., Hsu, S. H., Tseng, T. C., & Wang, J. P. (2021). Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells From a Hypoxic Culture Improve Neuronal Differentiation and Nerve Repair. *Frontiers in cell and developmental biology*, 9, 658099.
58. Rodriguez Sanchez, D. N., et al. (2019). Canine adipose-derived mesenchymal stromal cells enhance neuroregeneration in a rat model of sciatic nerve crush injury. *Cell Transplantation*, 28(1), 47–54.
59. Tremp, M., et al. (2018). Regeneration of nerve crush injury using adipose-derived stem cells: A multimodal comparison. *Muscle and Nerve*, 58(4), 566–572.
60. Li, Y. C., et al. (2014). A neural stem/precursor cell monolayer for neural tissue engineering. *Biomaterials*, 35(4), 1192–1204.
61. Lasso, J. M., et al. (2015). Xenotransplantation of human adipose-derived stem cells in the regeneration of a rabbit peripheral nerve. *Journal of Plastic Reconstruction Aesthetics Surgery*, 68(12), e189–e197.
62. Luo, H., et al. (2015). Tissue-engineered nerve constructs under a microgravity system for peripheral nerve regeneration. *Tissue Engineering Part A*, 21(1–2), 267–276.
63. Allbright, K. O., et al. (2018). Delivery of adipose-derived stem cells in poloxamer hydrogel improves peripheral nerve regeneration. *Muscle and Nerve*, 58(2), 251–260.
64. Kim, D. Y., et al. (2014). In vivo effects of adipose-derived stem cells in inducing neuronal regeneration in Sprague-Dawley rats undergoing nerve defect bridged with polycaprolactone nanotubes. *Journal of Korean Medical Science*, 29, S183–S192.

65. Zuk, P. (2013). Adipose-derived stem cells in tissue regeneration: A review. *ISRN Stem Cells*, 2013, 1–35.
66. Kalbermatten, D. F., et al. (2011). Neurotrophic activity of human adipose stem cells isolated from deep and superficial layers of abdominal fat. *Cell Tissue Research*, 344(2), 251–260.
67. Wilkins, A., et al. (2009). Human bone marrow-derived mesenchymal stem cells secrete brain-derived neurotrophic factor which promotes neuronal survival in vitro. *Stem Cell Research*, 3(1), 63–70.
68. Kingham, P. J., et al. (2014). Stimulating the neurotrophic and angiogenic properties of human adipose-derived stem cells enhances nerve repair. *Stem Cells Development*, 23(7), 741–754.
69. Taghi, G. M., et al. (2012). Characterization of in vitro cultured bone marrow and adipose tissue-derived mesenchymal stem cells and their ability to express neurotrophic factors. *Cell Biology International*, 36(12), 1239–1249.
70. Osugi, M., et al. (2012). Conditioned media from mesenchymal stem cells enhanced bone regeneration in rat calvarial bone defects. *Tissue Engineering Part A*, 18(13–14), 1479–1489.
71. Kaewkhaw, R., Scutt, A. M., & Haycock, J. W. (2011). Anatomical site influences the differentiation of adipose-derived stem cells for Schwann-cell phenotype and function. *Glia*, 59(5), 734–749.
72. Engels, P. E., et al. (2013). Harvest site influences the growth properties of adipose derived stem cells. *Cytotechnology*, 65(3), 437–445.
73. Mathias, T., et al. (2015). The regeneration potential after human and autologous stem cell transplantation in a rat sciatic nerve injury model can be monitored by MRI. *Cell Transplantation*, 24(2), 203–211.
74. Mantovani, C., et al. (2012). Morphological, molecular and functional differences of adult bone marrow- and adipose-derived stem cells isolated from rats of different ages. *Experimental Cell Research*, 318(16), 2034–2048.

75. Yoshihiro, S., et al. (2012). Adipose-derived stem cells produce factors enhancing peripheral nerve regeneration: Influence of age and anatomic site of origin. *Stem Cells and Development*, 21(11), 1852–1862.
76. Kocan B, Maziarz A, Tabarkiewicz J et al (2017) Trophic Activity and Phenotype of Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells as a Background of Their Regenerative Potential. *Stem Cells Int* 2017:1653254 doi: 10.1155/2017/1653254
77. Willis CM, Nicaise AM, Hamel R et al (2020) Harnessing the Neural Stem Cell Secretome for Regenerative Neuroimmunology. *Front Cell Neurosci* 14:590960 doi:10.3389/fncel.2020.590960
78. Xu Ch, Diao YF, Wang J et al (2020) Intravenously infusing the secretome of adipose-derived mesenchymal stem cells ameliorates neuroinflammation and neurological functioning after traumatic brain injury. *Stem Cells and Development* 29:222–234 doi: 10.1089/scd.2019.0173

## Додаток 1. Приклад підрахунку мігруючих клітин

Logo

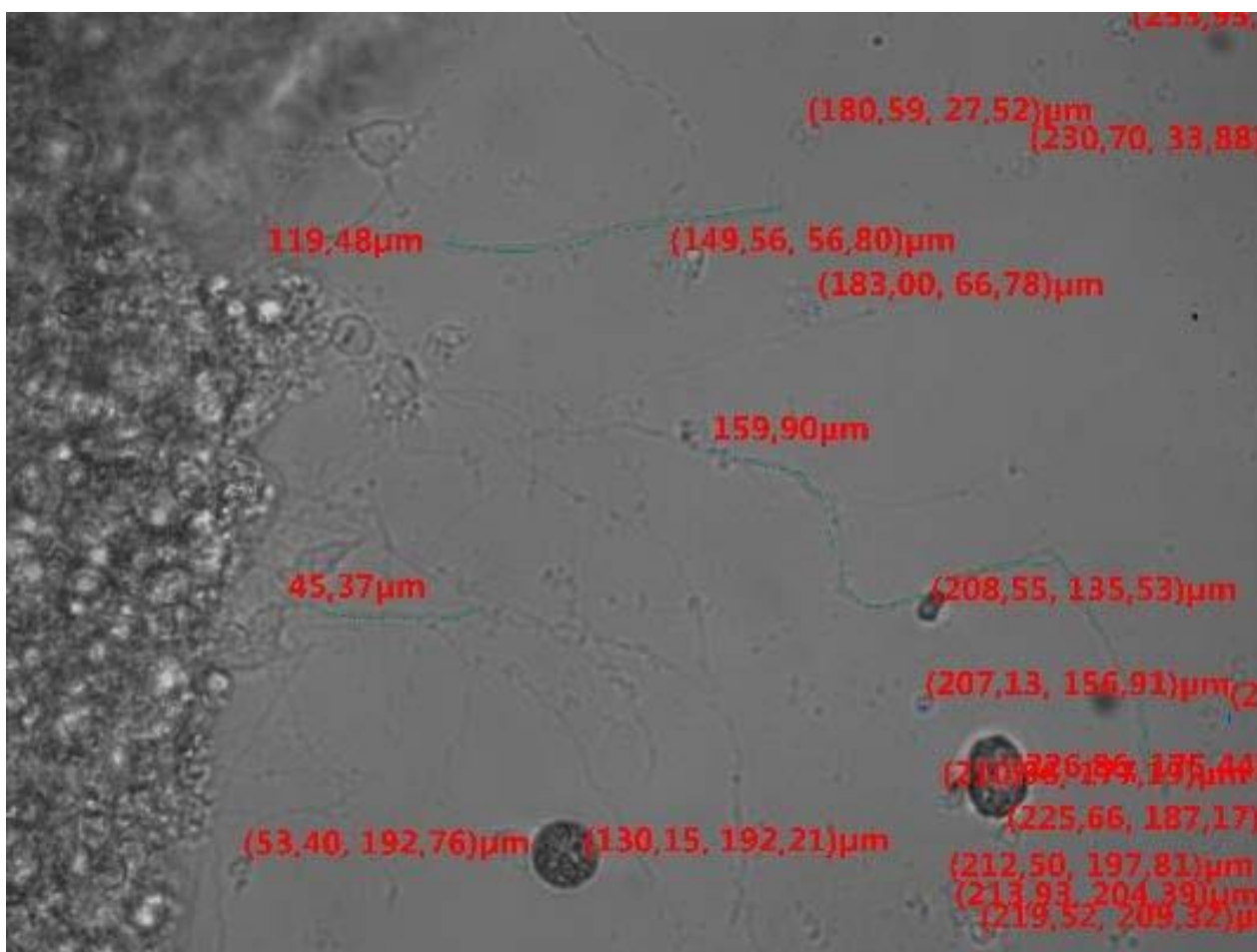
Imaging Solution  
Image Analysis Report

Date: 2022-05-16 10:46:36

Дослід №2. Культура нервових клітин, 7-а доба культивування, 24 год після розсічення моношару і додавання КС ММСК ЖТ.

Підрахунок клітин, що мігрували з моношару культури нервових клітин у зону перерізу

Result: 16.



## Measurement:

Індекс	Назва	Діаметр	Площа	Довжина	Відстань
1	Pt1				
2	Pt2				

3	Pt3				
4	Pt4				
5	Pt5				
6	Pt6				
7	Pt7				
8	Pt8				
9	Pt9				
10	Pt10				
11	Pt11				
12	Pt12				
13	Pt13				
14	Pt14				
15	Pt15				
16	Pt16				

Unit: Мікрометр

**Comments: У полі зору виявлено клітини, що мігрували з країв моношару культури нервових клітин у зону перерізу.**

## Додаток 2. Приклад підрахунку довжини відростків клітин

Logo

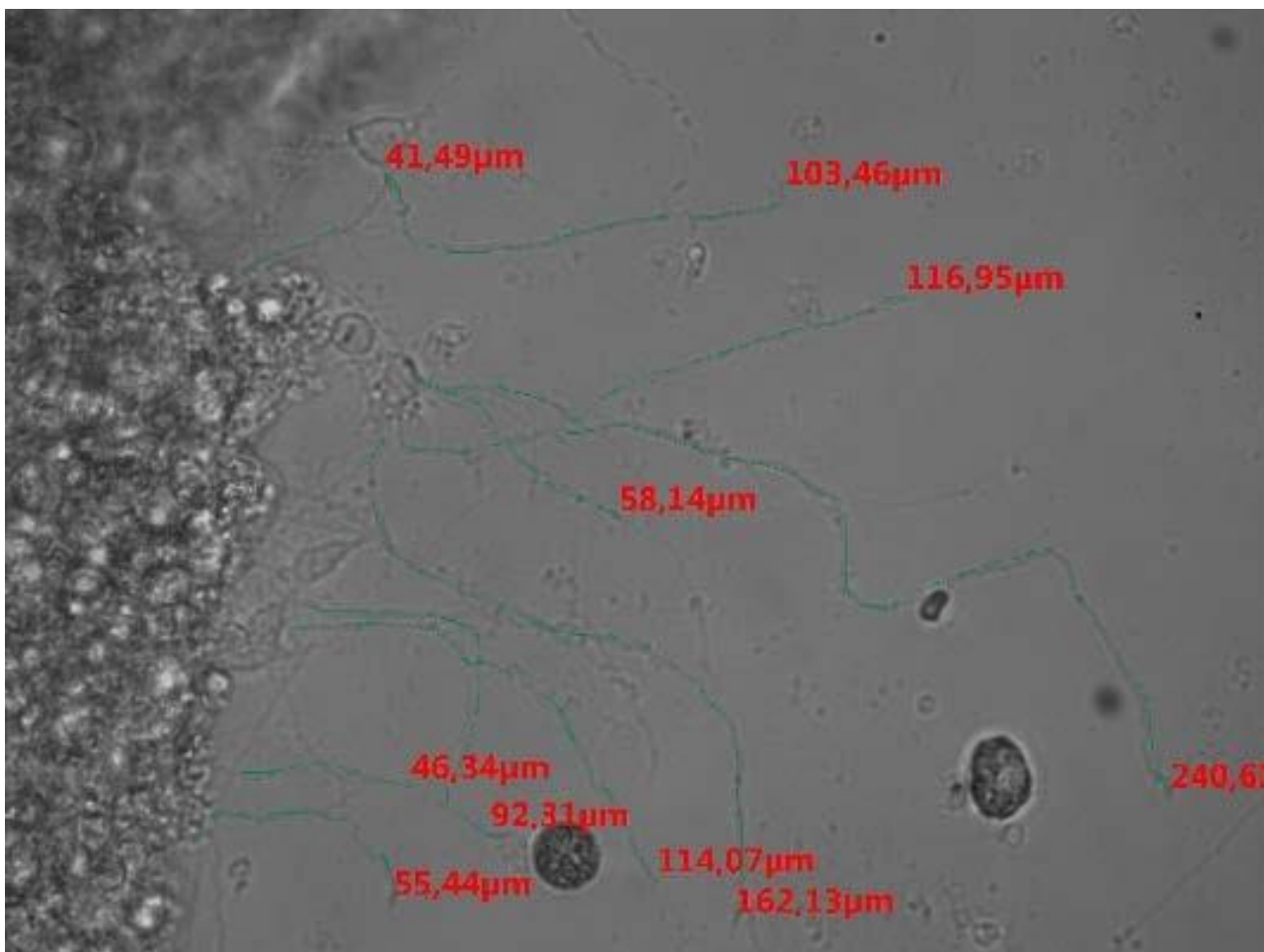
**Imaging Solution**  
**Image Analysis Report**

---

**Date: 2022-05-16 10:46:36**

**Дослід №2. Культура нервових клітин, 7-а доба культивування, 24 год після розсічення моношару і додавання КС ММСК ЖТ.**

**Вимірювання довжини відростків**



### Measurement:

Індекс	Назва	Діаметр	Площа	Довжина	Відстань
1	Cv1			114,07	
2	Cv2			55,44	
3	Cv3			103,46	
4	Cv4			41,49	
5	Cv5			240,61	
6	Cv6			116,95	
7	Cv7			92,31	
8	Cv8			162,13	
9	Cv9			46,34	
10	Cv10			58,14	

Unit: Мікрометр

**Comments:** У полі зору середня довжина відростків клітин складає (103,09 + 58,42)  $\mu\text{m}$ .

**Додаток 3. Приклад вимірювання ширини ділянки розсічення моношару  
культури нервових клітин**

Logo

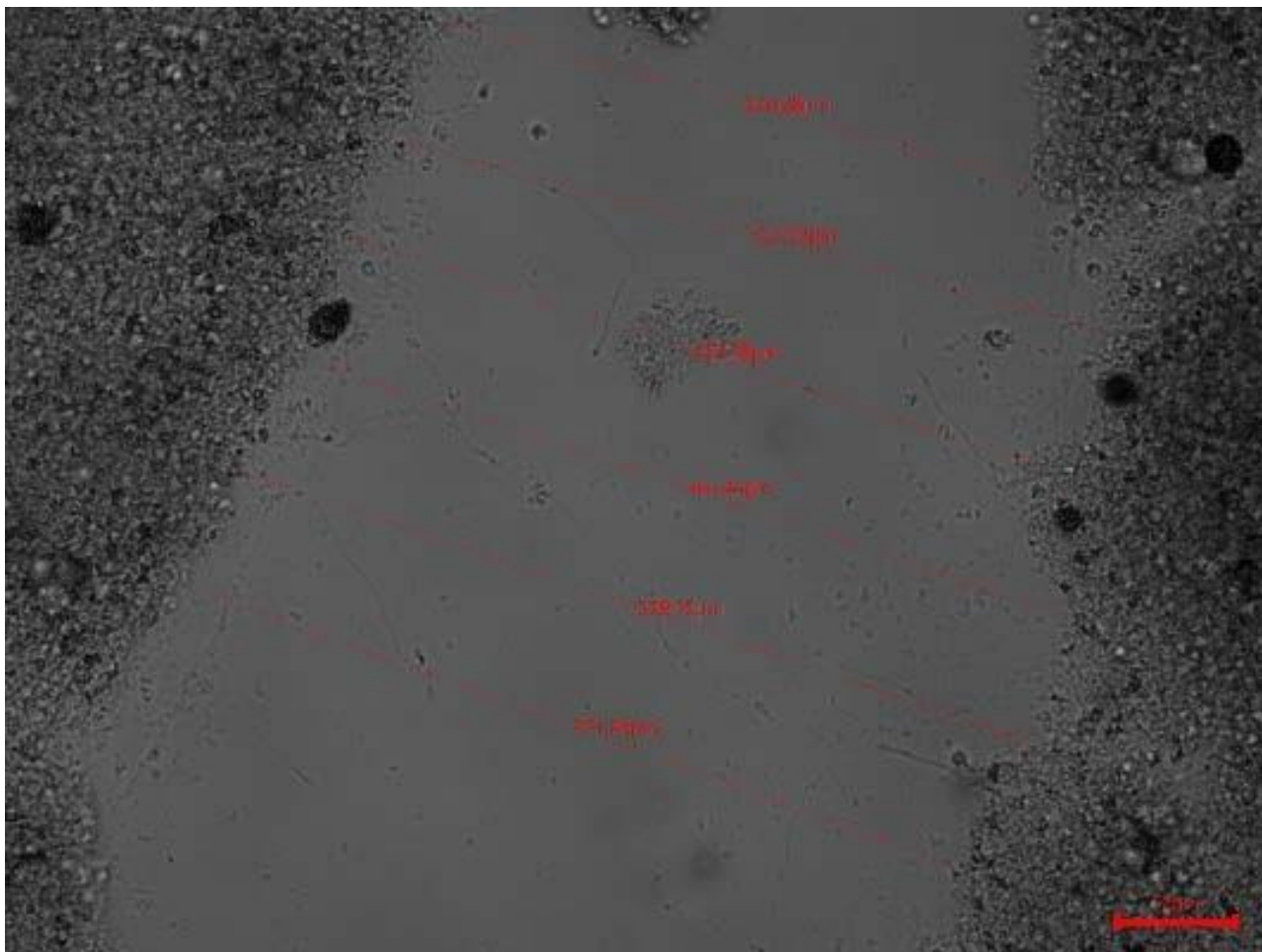
**Imaging Solution  
Image Analysis Report**

---

**Date: 2022-05-16 10:46:36**

**Дослід №2. Культура нервових клітин, 7-а доба культивування, 48 год  
після розсічення моношару і додавання КС ММСК ЖТ.**

**Вимірювання ширини ділянки розсічення моношару культури нервових  
клітин**



**Measurement:**

Індекс	Назва	Центр	Діаметр	Площа	Довжина
1	L1	(330,96, 42,89)			270,28
2	L2	(333,59, 101,42)			329,99
3	L3	(307,77, 153,94)			325,78
4	L4	(304,70, 214,99)			366,46
5	L5	(282,93, 268,71)			379,35
6	L6	(253,83, 322,10)			371,88

Unit: Мікрометр

**Comments:** У полі зору середня ширини ділянки розсічення моношару культури нервових клітин складає  $(340,62 + 37,47) \mu\text{m}$ .