

Міністерство освіти і науки України
Національний університет «Києво-Могилянська академія»
Факультет природничих наук
Кафедра лабораторної діагностики біологічних систем

Кваліфікаційна робота
освітній ступінь – магістр

на тему: **«МОРФОФУНКЦІОНАЛЬНІ ХАРАКТЕРИСТИКИ
МЕЗЕНХІМАЛЬНИХ СТОВБУРОВИХ КЛІТИН У МИШЕЙ РІЗНОГО ВІКУ
ЗА УМОВ СИСТЕМНОЇ ЗАПАЛЬНОЇ ВІДПОВІДІ»**

Виконала: студентка 2-го року навчання
спеціальності 091 – біологія та біохімія
Світлична Катерина Андріївна

Керівники:
Устименко А. М.,
завідувачка лабораторії клітинних та тканинних
культур, кандидат біологічних наук, старший
дослідник ДУ «Національний науковий центр
старший дослідник, «Інститут кардіології, клінічної
та регенеративної медицини імені академіка М. Д.
Стражеска НАН України»

Пахаренко М. В.
старший викладач кафедри лабораторної
діагностики біологічних систем, PhD

Рецензент:
Цупиков О. М.,
доктор медичних наук,
науковий співробітник відділу цитології
Інституту фізіології імені
О. О. Богомольця НАН України.

Кваліфікаційну роботу захищено
з оцінкою _____

Секретар ЕК
Пахаренко М.В.

«__» червня 20__ року

Київ – 2026

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ	4
ВСТУП.....	5
РОЗДІЛ 1	8
ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....	8
1.1. Мезенхімальні стовбурові клітини жирової тканини: загальна характеристика	8
1.1.1. Біологічна характеристика та властивості ММСК-ЖТ	8
1.2.1. Запальне старіння як ключовий фактор патогенезу вікових захворювань та терапевтичний потенціал мезенхімальних стовбурових клітин.....	10
1.2.2. Механізми клітинного старіння мезенхімальних стовбурових клітин та стратегії їх омолодження.....	11
1.3. Системна запальна відповідь та її вплив на ММСК	12
1.3.1. Характеристика системної запальної відповіді та її клінічне значення	12
1.3.2. Еволюція розуміння ролі ММСК як модуляторів запалення	13
1.4. Застосування ММСК-ЖТ у регенеративній медицині	14
1.4.1. Основні напрямки клінічного застосування ММСК-ЖТ	14
1.4.2. Питання безпеки та ефективності терапії ММСК-ЖТ	15
1.4.3. Перспективи та виклики	16
РОЗДІЛ 2	18
ОБ'ЄКТИ, МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ.....	18
2.1. Об'єкт дослідження	18
2.2. Реактиви, розчини та обладнання, що були використані в роботі	19
2.2.1. Реактиви:	19
2.2.2. Розчини:.....	20
2.2.3. Обладнання та витратні матеріали:	20
2.3. Моделювання експериментальної системної запальної відповіді	21
2.4. Отримання та характеристика ММСК жирової тканини мишей.....	22
2.4.1. Отримання первинних культур ММСК жирової тканини	22
2.4.2. Отримання культур мікрмаси ММСК жирової тканини	23
2.4.3. Оцінка проліферативного потенціалу культур ММСК in vitro	24

2.4.4. Визначення колонієутворюючої здатності культур ММСК in vitro ..	25
2.5. Верифікація мезенхімального фенотипу клітин	26
2.6. Статистичний аналіз результатів	27
РОЗДІЛ 3	28
РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ	28
3.1 Вплив LPS-індукованого синдрому системної запальної відповіді на функціональні характеристики ММСК жирової тканини молодих мишей	28
3.1.1 Морфологічна характеристика культур	28
3.1.2 Клоногенна активність ММСК	31
3.1.3 Проліферативна активність ММСК.....	34
3.2 Вплив LPS-індукованого синдрому системної запальної відповіді на функціональні характеристики ММСК жирової тканини старих мишей	37
3.2.1 Морфологічна характеристика культур	37
3.2.3 Проліферативна активність ММСК.....	42
3.3 Порівняльний аналіз функціональних характеристик ММСК жирової тканини молодих та старих мишей в умовах LPS-індукованого синдрому системної запальної відповіді	43
3.3.1 Порівняльна характеристика морфологічних параметрів культур	44
3.3.2 Порівняльна характеристика клоногенної активності.....	45
3.3.3 Порівняльна характеристика проліферативної активності	47
3.3.4 Інтегральна оцінка вікових відмінностей функціональної відповіді ММСК	48
ВИСНОВКИ	56
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	57

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

ММСК – мезенхімальні мультипотентні стромальні клітини

ММСК-ЖТ – мезенхімальні мультипотентні стромальні клітини жирової тканини

ЖТ – жирова тканина

СВФ – стромально-васкулярна (стромально-судинна) фракція

СЗВ – системна запальна відповідь

ССЗВ – синдром системної запальної відповіді

LPS – ліпополісахарид (lipopolysaccharide)

SVF – stromal vascular fraction (стромально-васкулярна фракція)

FBS – фетальна бичача сироватка (fetal bovine serum)

PBS – фосфатно-сольовий буфер (phosphate-buffered saline)

EDTA – етилендіамінтетраоцтова кислота

DMEM – Dulbecco's Modified Eagle Medium (поживне середовище)

CFU – колонієутворююча одиниця (Colony-Forming Unit)

PDT – час подвоєння клітинної популяції (population doubling time)

ВСТУП

Регенеративна медицина активно шукає клітинні інструменти, здатні поєднувати широку доступність, мультипотентність та імуномодулюючий потенціал. Мезенхімальні стовбурові клітини жирової тканини (МСК-ЖТ) відповідають усім вимогам: жирова тканина є багатим і легкодоступним джерелом клітин-попередників, виділення яких є мінімально інвазивним, а отримані культури зберігають стабільний фібробластоподібний фенотип і значний проліферативний потенціал *in vitro* протягом багатьох пасажів [1].

Терапевтична цінність МСК-ЖТ визначається насамперед їхніми паракринними властивостями: клітини секретують протизапальні цитокіни (IL-10, TGF- β) та екзосоми, збагачені біоактивними молекулами і мікроРНК, відкриваючи перспективи як клітинної, так і безклітинної (cell-free) терапії з мінімальним ризиком імунного відторгнення [2].

Проте функціональна активність МСК-ЖТ суттєво залежить від мікрооточення, в якому перебувають клітини. Одним із найпотужніших дестабілізуючих чинників є системна запальна відповідь (СЗВ): при травмах, інфекціях та ішемії масово вивільняються прозапальні цитокіни і молекулярні сигнали пошкодження (DAMPs), які безпосередньо змінюють проліферативну активність, морфологію та клоногенний потенціал МСК [3]. Хоча гостра запальна реакція є фізіологічним адаптивним механізмом, її надмірний або пролонгований перебіг здатний вичерпати регенеративний резерв тканин і знизити терапевтичну ефективність власних стовбурових клітин пацієнта [4].

Проблема набуває особливої гостроти в умовах глобального старіння населення. З віком в організмі формується хронічне субпорогове запалення — *inflammaging* [5], — що поступово виснажує пул клітин-попередників, прискорює їхнє реплікативне старіння та знижує адаптаційний резерв. Коли на такий хронічний прозапальний фон

накладається гостра СЗВ, виникає унікальний патофізіологічний сценарій: відповідь МСК-ЖТ старого організму на запальний стрес потенційно відрізняється від відповіді молодих клітин як за характером, так і за тривалістю. Втім це питання досі практично не досліджене [6].

Наявні роботи або обмежуються молодими донорами, або вивчають вікові зміни МСК за умов норми — без поєднання з моделлю гострої СЗВ. Ця прогалина має пряме клінічне значення: розуміння того, чи зберігають МСК-ЖТ літніх пацієнтів здатність до ефективної мобілізації після важкого запального епізоду, є необхідною передумовою для розробки персоналізованих протоколів клітинної терапії в геріатрії.

Таким чином, вивчення морфофункціональних характеристик МСК-ЖТ у мишей різного віку за умов СЗВ є актуальним науковим завданням, вирішення якого безпосередньо визначає перспективи використання аутологічних клітинних технологій у геріатричній практиці.

Мета роботи: визначення особливостей морфофункціональних характеристик мезенхімальних стовбурових клітин жирової тканини у мишей різного віку за умов розвитку системної запальної відповіді.

Завдання дослідження:

1. Виділити та охарактеризувати культури МСК-ЖТ від молодих та старих мишей у нормі та при моделюванні запалення.
2. Оцінити морфологічні зміни клітин (розмір, індекс розпластування, особливості адгезії).
3. Дослідити показники проліферативної активності та життєздатності МСК-ЖТ залежно від віку та наявності запального стресу.

Об'єкт дослідження: процеси морфофункціональної адаптації та функціонування мезенхімальних стовбурових клітин в умовах поєднання вікового фактора та системної запальної відповіді.

Предмет дослідження: закономірності змін морфологічних параметрів, проліферативного потенціалу та показників життєздатності МСК мишей різного віку за умов моделювання системного запалення.

Установа, на базі якої виконувалась робота: Інститут генетичної та регенеративної медицини Національного наукового центру кардіології, клінічної та регенеративної медицини імені академіка М.Д. Стражеска НАН України (Лабораторія культури клітин і тканин)

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Мезенхімальні стовбурові клітини жирової тканини: загальна характеристика

1.1.1. Біологічна характеристика та властивості ММСК-ЖТ. Мезенхімальні стовбурові клітини жирової тканини (ММСК-ЖТ), що є підгрупою мезенхімальних стовбурових клітин (ММСК), — це мультипотентні стромальні клітини, виділені зі стромально-судинної фракції жирової тканини. Як і інші ММСК, ММСК-ЖТ виявляють здатність до самовідновлення та потенціал до диференціації у різні клітинні лінії. Це високопроліферативні клітини, які можна легко культивувати *in vitro* з низькими витратами, зберігаючи генетичну стабільність протягом тривалого часу, і ефективно використовувати в різних підходах до регенерації тканин, не порушуючи етичних питань їх походження з дорослої тканини [1, 3, 14].

Важливою особливістю ММСК-ЖТ є їхня здатність впливати на імунну систему та запальні процеси в організмі. Окрім диференціації, ММСК-ЖТ володіють імуномодуючими властивостями, опосередкованими паракринною секрецією протизапальних цитокінів (наприклад, IL-10, TGF- β) та прямими міжклітинними взаємодіями, що робить їх перспективним кандидатом для регенеративної медицини та реконструктивної терапії [1]. ММСК-ЖТ секретують низку ангіогенних, антиапоптотичних та гематопоетичних факторів, які сприяють відновленню та регенерації тканин через аутокринні та паракринні дії [4]. Ці клітини також секретують протизапальні або імуносупресивні фактори та чинять імуномодуючу дію в клітинній терапії реакції «трансплантат проти хазяїна» (РТПХ), аутоімунних захворювань та запальних захворювань [4].

1.1.2. Переваги жирової тканини як джерела стовбурових клітин. Жирова тканина є не лише енергетичним депо, а й багатим джерелом ММСК, отримання яких значно простіше порівняно з кістковим мозком. Підшкірний жир легкодоступний у великих кількостях через мінімально інвазивну ліпосакцію — безпечну та економічно вигідну процедуру; ліпоаспірат, що зазвичай утилізується як медичні відходи, слугує цінним джерелом аутологічних ММСК-ЖТ [2, 3]. Альтернативно, клітини виділяють із голкових біопсій жирової тканини людини або пахових жирових подушок у мишей та інших ссавців [2].

Стромально-судинна фракція (СВФ) жирової тканини містить до 3% стовбурових клітин — у 2500 разів більше, ніж кістковий мозок, що забезпечує достатню клітинну масу для клітинної терапії [2].

Порівняльний аналіз різних джерел стовбурових клітин демонструє безперечну перевагу жирової тканини за кількісними показниками. Жирова тканина містить велику кількість мультипотентних клітин, що є необхідною передумовою для терапії на основі стовбурових клітин. Стромально-судинна фракція (СВФ) жирової тканини містить до 3% стовбурових клітин — у 2500 разів більше, ніж кістковий мозок, що забезпечує достатню клітинну масу для клітинної терапії [2].

1.2. Вікові зміни ММСК та їх функціонального потенціалу

Сучасне суспільство стикається з безпрецедентними демографічними змінами, що ставлять нові виклики перед системами охорони здоров'я у всьому світі. У період з 2019 по 2050 рік кількість людей віком понад 64 роки перевищить 1,5 мільярда, що означає подвоєння чисельності населення цієї вікової групи порівняно з нинішнім рівнем. Іншими словами, через 30 років кожна шоста людина у світі вважатиметься людиною похилого віку.

Процес старіння супроводжується комплексом фізіологічних змін, що робить організм більш вразливим до різноманітних захворювань. Старіння характеризується фізіологічною вразливістю, зумовленою як недостатньою реакцією на стрес, так і порушенням гомеостазу. Тому у віці 65 років підвищується ризик, зокрема,

нейродегенеративних захворювань, серцево-судинних захворювань, діабету, раку, остеопорозу та остеоартриту. Крім того, люди похилого віку не тільки частіше приймають багато ліків одночасно, але й загалом більш вразливі до їх взаємодії та побічних ефектів [5].

Все це зумовлює попит на нові терапевтичні альтернативи у зростаючій частині суспільства, яка, маючи економічні ресурси та доступ до медико-наукової інформації, підвищує очікування щодо кращої якості життя на початку життєвого шляху, що переривається виснаженою фізіопатологією. У цьому контексті регенеративна медицина відкриває принципово нові можливості для вирішення проблем, пов'язаних зі старінням. У цьому сценарії поява парадигми регенеративної медицини може спричинити ідеальний шторм ідей та нових підходів для подолання виклику здорового довголіття. Тому необхідні нові та невідкладні терапевтичні стратегії для допомоги при вікових розладах шляхом розробки нових стратегій лікування [5].

1.2.1. Запальне старіння як ключовий фактор патогенезу вікових захворювань та терапевтичний потенціал мезенхімальних стовбурових клітин. Концепція запального старіння стала важливою віхою у розумінні механізмів старіння та пов'язаних з ним патологічних процесів. Термін запальне старіння або інфлейм-ейджинг вперше був згаданий Франческі та співавторами у 2000 році [16], що означало новий напрямок досліджень старіння та пов'язаних зі старінням захворювань. Кастеллані та співавтори сформулювали біомедичну гіпотезу старіння [17], припускаючи, що хронічне запалення низького рівня є рушієм запального патологічного процесу і пов'язане зі старінням. Відповідно, запальне старіння було визначено як хронічний запальний стан з пов'язаним з віком підвищенням рівня прозапальних цитокінів у сироватці крові [16, 17, 18, 19, 20].

Запальне старіння є значним фактором ризику захворюваності та смертності серед літніх людей [21] і пов'язане з хворобою Альцгеймера, Паркінсона, атеросклерозом, серцевими захворюваннями [18], діабетом 2 типу [22], остеопорозом [23] та раком [24]. Механізми, біомаркери та підходи до лікування при inflammaging

потребують подальшого вивчення. Клінічне значення запального старіння важко переоцінити, оскільки воно пов'язане з широким спектром патологічних станів. Запальне старіння було визначено як значний фактор ризику захворюваності та смертності у літніх людей [21].

У цьому контексті мезенхімальні стовбурові клітини привертають значну увагу як потенційний інструмент боротьби із запальним старінням. Мезенхімальні стовбурові клітини є надзвичайно ефективними в контролі запальних цитокінів, які підвищені при ревматоїдному артриті [26], включаючи фактор некрозу пухлини альфа [27], який є цитокіном, що відіграє значну роль у патогенезі. Окрім зменшення запалення у пацієнтів з ревматоїдним артритом, мезенхімальні стовбурові клітини діють і нейтралізують фактор некрозу пухлини альфа з людськими антитілами та мінімізують прогресування захворювання [27, 28]. Механізм лікування мезенхімальними стовбуровими клітинами модулює імунну відповідь [29, 30] і зменшує експресію прозапальних цитокінів, що є зміщенням імунної відповіді від переважно прозапальних Т-хелперних клітин 1 типу до протизапальних Т-хелперних клітин 2 типу. Хоча мезенхімальні стовбурові клітини застосовувалися при лікуванні багатьох специфічних захворювань, існує мало клінічних досліджень щодо мезенхімальних стовбурових клітин та їх впливу на запальне старіння.

1.2.2. Механізми клітинного старіння мезенхімальних стовбурових клітин та стратегії їх омолодження. Незважаючи на інтенсивні дослідження та обнадійливі клінічні результати, терапія ММСК стикається з важливими обмеженнями, пов'язаними зі старінням клітин. Протягом останніх десятиліть терапія на основі мезенхімальних стовбурових клітин інтенсивно досліджувалася і показала багатообіцяючі результати в лікуванні різних захворювань завдяки простоті їх виділення, потенціалу диференціації в різні клітинні лінії та імуномодуючій дії. Проте на функцію аутологічних мезенхімальних стовбурових клітин негативно впливає вік, процес який називають старінням, що обмежує їхній терапевтичний потенціал [7, 8].

Процес старіння ММСК є складним і багатоетапним явищем, що відбувається через різні механізми. Старіючі мезенхімальні стовбурові клітини зазвичай поділяють на різні стадії. Після кожного циклу реплікації довжина теломерів скорочується. Коли теломери стають критично короткими, вони запускають старіння. Це називається реплікативним старінням [9]. Після цього активація онкогенів індукує старіння мезенхімальних стовбурових клітин. Це називається онкоген-індукованим старінням [10]. Численні стресові стимули також викликають старіння, відоме як стрес-індуковане старіння [11]. Індукція старіння може бути опосередкована як частина нормального процесу розвитку кількома шляхами або генами плюрипотентності. Це називається старінням розвитку [12].

Усвідомлення обмежень старіючих ММСК стимулює пошук методів відновлення їхніх функціональних властивостей. Відновлення функцій мезенхімальних стовбурових клітин є життєво важливим для їх регенераційної здатності [6]. Останні дослідження свідчать про те, що клітинне старіння є модифікованим фактором ризику, що дає надію для терапії на основі аутологічних мезенхімальних стовбурових клітин [13]. Культивування *in vitro* є необхідним для отримання достатньої кількості мезенхімальних стовбурових клітин для використання в клітинній терапії. Паралельно з цим орієнтація на три внутрішні механізми старіння мезенхімальних стовбурових клітин може допомогти запобігти старінню мезенхімальних стовбурових клітин.

1.3. Системна запальна відповідь та її вплив на ММСК

1.3.1. Характеристика системної запальної відповіді та її клінічне значення.

Системна запальна відповідь (СЗВ) є одним із найнебезпечніших патологічних станів, що може призводити до критичних порушень функції органів. Сепсис визначається як загрозлива органна дисфункція внаслідок дисрегульованої відповіді на інфекцію [31], а септичний шок — його підгрупа з глибшими метаболічними порушеннями та вищою

летальністю [31]. СЗВ на травму характеризується взаємодією про- та протизапальних медіаторів, що може призводити до ССЗВ і поліорганної недостатності [32].

Ключовою особливістю ММСК є їхня здатність взаємодіяти з вродженою імунною системою на ранніх етапах запальної відповіді. Експресія TLRs на поверхні клітин мезенхімальних стромальних клітин свідчить про їх внутрішню роль у модуляції цієї ранньої імунної відповіді [33]. Механічні тканинні бар'єри, такі як шкіра та слизові оболонки, забезпечують першу лінію захисту у вродженому імунітеті [33]. Багато немієлоїдних клітин сприяють цій захисній стратегії, включаючи фібробласти та епітеліальні клітини, які виробляють імуномодуючі та антимікробні фактори на додаток до їх функції фізичного бар'єру [33].

1.3.2. Еволюція розуміння ролі ММСК як модуляторів запалення. Наше розуміння функціональної ролі ММСК зазнало значної еволюції протягом останніх десятиліть, відображаючи поглиблення знань про ці клітини. Роль ММСК як охоронців запалення поступово виникла з досліджень цих клітин протягом останніх кількох десятиліть [34]. Еволюція даних спричинила драматичні зміни в гіпотезах дослідження [34]. Спочатку клітини досліджувалися як фідерні шари, які забезпечували нішу для культивування гемопоетичних клітин [34]. Потім клітини досліджувалися як репаративні клітини, які можуть приживлятися в ушкоджених тканинах та диференціюватися для заміни пошкоджених клітин [34].

Сучасна парадигма розглядає ММСК як динамічні регулятори тканинного гомеостазу, а не просто структурні елементи. Останнім часом дані демонструють, що клітини лише тимчасово з'являються в ушкоджених тканинах за більшості умов, але під час їх короткочасної появи вони реагують на перехресну взаємодію з ушкодженими клітинами, щоб обмежити руйнування тканин або посилити відновлення різними механізмами [34]. Ці механізми включають підвищення регуляції генів, які модулюють надмірні запальні та імунні реакції; забезпечення ніші для посилення проліферації та диференціації тканинних ендогенних стовбурових

клітин; та передачу везикулярних компонентів, які містять мітохондрії та мікроРНК [34].

Детальне розуміння молекулярних механізмів ініціації запалення допомогло краще зрозуміти роль ММСК у цих процесах. Роль ММСК як охоронців запалення стала більш очевидною, оскільки події, що ініціюють запалення, були визначені більш детально [34]. Ці події включають пасивне та активне вивільнення з ушкоджених клітин або макрофагів внутрішньоклітинних цитокінів, таких як інтерлейкін (IL)-1 α , які стимулюють паренхімальні клітини виробляти хемокіни, що рекрутують нейтрофіли [34]. Також відбувається класична активація резидентних макрофагів молекулярними патернами, пов'язаними з пошкодженням (DAMPs), або патоген-асоційованими молекулярними патернами (PAMPs), які взаємодіють з рецепторами розпізнавання патернів для виробництва високих рівнів прозапальних цитокінів [34]. Це призводить до продукції реактивних форм азоту та реактивних форм кисню, які індукують гостру фазу запальної відповіді [34].

1.4. Застосування ММСК-ЖТ у регенеративній медицині

1.4.1. Основні напрямки клінічного застосування ММСК-ЖТ.

Мезенхімальні мультипотентні стромальні клітини жирової тканини продемонстрували значний терапевтичний потенціал у широкому спектрі клінічних застосувань завдяки своїм унікальним біологічним властивостям. За останні десятиліття ММСК-ЖТ стали одним з найбільш досліджуваних типів стовбурових клітин для регенеративної медицини, що підтверджується тисячами клінічних випробувань у різних терапевтичних напрямках [35]. Ключовими факторами, що визначають привабливість ММСК-ЖТ для клінічного використання, є їхня легка доступність через мінімально інвазивні процедури ліпосакції, високий вихід клітин порівняно з іншими джерелами ММСК, та збереження мультипотентності навіть після тривалого культивування *in vitro* [36].

При аутоімунних захворюваннях ММСК-ЖТ виявили значний терапевтичний потенціал завдяки своїм імуномодуючим властивостям. ММСК-ЖТ здатні пригнічувати надмірну активацію імунної системи через секрецію імуносупресивних факторів та індукцію регуляторних Т-клітин, що сприяє відновленню імунної толерантності [37]. Клінічні дослідження показали, що системне введення ММСК-ЖТ призводить до зменшення активності захворювання у пацієнтів з рефрактерними формами аутоімунних захворювань [38]. Особливо перспективним є застосування ММСК-ЖТ при реакції «трансплантат проти хазяїна» після аlogenної трансплантації гемопоетичних стовбурових клітин [39].

1.4.2. Питання безпеки та ефективності терапії ММСК-ЖТ. Безпека клітинної терапії є критично важливим аспектом, що визначає можливість широкого клінічного впровадження ММСК-ЖТ. Численні клінічні випробування фази I та II послідовно демонструють високий профіль безпеки терапії ММСК-ЖТ при різних шляхах введення [40].

Однак питання ефективності терапії ММСК-ЖТ залишається предметом активних дискусій у науковій спільноті. Хоча багато клінічних досліджень ранніх фаз демонструють обнадійливі результати, великомасштабні рандомізовані контрольовані дослідження фази III часто показують більш стримані результати [41]. Ця невідповідність може пояснюватися гетерогенністю клітинних препаратів ММСК-ЖТ, варіабельністю протоколів виділення та культивування, різними дозами та режимами введення клітин, а також відмінностями в характеристиках пацієнтів [42]. Крім того, відсутність стандартизованих критеріїв якості ММСК-ЖТ та біомаркерів для прогнозування терапевтичної відповіді ускладнює порівняння результатів різних досліджень [43].

Важливим аспектом є життєздатність та функціональна активність ММСК-ЖТ після трансплантації. Дослідження показали, що більшість трансплантованих ММСК-ЖТ зникають з місця введення протягом кількох днів або тижнів, що свідчить про те, що їх терапевтичний ефект опосередкований переважно паракринними механізмами

[44]. Це спостереження стимулювало інтерес до безклітинних терапій на основі екзосом та секретому ММСК-ЖТ, які можуть забезпечити терапевтичні переваги при зменшенні потенційних ризиків [45]. Попередні дослідження показують, що екзосоми, отримані з ММСК-ЖТ, зберігають багато імуномодуючих та регенеративних властивостей самих клітин [46].

1.4.3. Перспективи та виклики. Майбутній розвиток терапій на основі ММСК-ЖТ вимагає вирішення кількох критичних викликів для переходу від експериментальних досліджень до широкої клінічної практики. Першочерговим завданням є стандартизація протоколів виділення, культивування та характеристики ММСК-ЖТ для забезпечення стабільної якості та ефективності клітинних продуктів [47]. Міжнародні організації, такі як ISCT та IFATS, працюють над розробкою консенсусних критеріїв, однак досі залишається значна варіабельність у практиках різних дослідницьких груп [48]. Встановлення стандартизованих процедур належної виробничої практики (GMP) для виробництва ММСК-ЖТ є необхідною умовою для отримання регуляторного схвалення [49].

Перспективним напрямком є розробка стратегій для підвищення терапевтичного потенціалу ММСК-ЖТ через генетичну модифікацію або попереднє кондиціонування клітин. Генетична модифікація ММСК-ЖТ для надмірної експресії специфічних терапевтичних генів може значно посилити їх регенеративні та імуномодуючі властивості [50]. Попереднє кондиціонування ММСК-ЖТ гіпоксією, прозапальними цитокінами або фармакологічними агентами може оптимізувати їх функціональний стан перед трансплантацією [51]. Крім того, комбінування ММСК-ЖТ з біоматеріалами та каркасами тканинної інженерії відкриває нові можливості для створення тривимірних тканинних конструкцій [52].

Регуляторні аспекти залишаються значним бар'єром для широкого клінічного впровадження терапій на основі ММСК-ЖТ. Різні країни та регіони мають відмінні регуляторні вимоги щодо клітинних продуктів, що ускладнює міжнародні клінічні дослідження та комерціалізацію [53]. Гармонізація регуляторних вимог на

міжнародному рівні могла б прискорити розвиток та впровадження безпечних і ефективних терапій на основі ММСК-ЖТ [54].

РОЗДІЛ 2

ОБ'ЄКТИ, МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1. Об'єкт дослідження

При проведенні дослідження об'єктом було обрано функціональний стан мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин (ММСК) жирової тканини мишей за умов експериментально індукованої системної запальної відповіді.

Для досягнення поставленої мети дослідження проведено на самцях лабораторних мишей лінії FVB «дикого» типу двох вікових груп: молодих (4 місяці, $n = 12$) та старих (16 місяців, $n = 12$). Вибір лінії FVB обумовлений її широким застосуванням у дослідженнях регенеративної медицини та імунологічних процесів, стабільним генотипом і відсутністю спонтанних новоутворень жирової тканини у зазначених вікових діапазонах. Вікові групи 4 та 16 місяців відповідають, відповідно, репродуктивно активному дорослому організму та старечому організму за загальноприйнятими критеріями геронтологічних досліджень на мишах.

Усередині кожної вікової групи тварин розподіляли на три підгрупи: контрольну (введення фізіологічного розчину, $n = 4$), експериментальну з виведенням через 7 діб після введення LPS ($n = 4$) та експериментальну з виведенням через 14 діб після введення LPS ($n = 4$). Такий дизайн дозволив оцінити динаміку функціональних змін ММСК у гострій (7 діб) та підгострій (14 діб) фазах постзапального періоду.

Тварин утримували за стандартних умов температури (22 ± 2 °C) та світлового режиму (12:12 год., світло з 8:00) з вільним доступом до води та стандартного гранульованого корму *ad libitum* на базі експериментальної клініки ДУ «Інститут геронтології імені Д. Ф. Чеботарьова НАМН України». Акліматизацію тварин проводили протягом не менше 7 діб до початку експерименту. Протягом усього

терміну спостереження здійснювали щоденний клінічний моніторинг загального стану тварин, маси тіла та поведінкових реакцій.

При роботі дотримувалися Міжнародних принципів Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються з експериментальною та іншою науковою метою (Страсбург, 1986 р.), Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження», а також «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах», схвалених I Національним конгресом з біоетики (Київ, 2001 р.) [24]. Дослідження схвалено комісією з питань етики ДУ «Інститут геронтології ім. Д. Ф. Чеботарьова НАМН України».

Вимірювальні можливості лабораторії патофізіології та імунології ДУ «Інститут геронтології ім. Д. Ф. Чеботарьова НАМН України» визнані ДП «УКРМЕТРТЕСТСТАНДАРТ» такими, що відповідають положенням ДСТУ ISO 10012:2005 щодо систем керування вимірюваннями та вимогам ISO 10012:2003, IDT (Сертифікат ПТ-200/24, виданий 05.08.2024, чинний до 04.08.2026 р.).

Виведення тварин з експерименту здійснювали шляхом цервікальної дислокації після загального знеболення інтраперитонеальним введенням 2,5 % розчину 2,2,2-трибромоетанолу в дозі 400 мг/кг (Sigma-Aldrich, США). Після настання наркотичного сну, що проявлявся знерухомленням тварини та релаксацією м'язів, у стерильних умовах кабінету біологічної безпеки вилучали фрагменти підшкірної жирової тканини для подальшого отримання стромально-васкулярної фракції з метою формування первинних культур ММСК.

2.2. Реактиви, розчини та обладнання, що були використані в роботі

2.2.1. Реактиви:

- Ліпополісахарид (LPS) E. coli (Pr. N. L2630, Sigma-Aldrich, США);
- 2,2,2-трибромоетанол (авертин) (Pr. N. T48402, Sigma-Aldrich, США);

- Колагеназа типу 1A (Pr. N. C9891, Sigma-Aldrich, США);
- Трипсин 0,25 % з EDTA 0,02 % (Sigma-Aldrich, США);
- Азур-еозин для забарвлення колоній (Sigma-Aldrich, США);
- Суміш антибіотиків PenStrep (Sigma-Aldrich, США);
- L-глутамін 200 мМ (Sigma-Aldrich, США);
- Незамінні амінокислоти non-essential amino acids 1:100 (Sigma-Aldrich, США);
- Фетальна сироватка великої рогатої худоби FBS (HyClone, США).

2.2.2. Розчини:

- Фізіологічний розчин 0,9 % NaCl (Дарниця, Україна);
- Фосфатно-сольовий буфер PBS (pH 7,4);
- Поживне середовище DMEM-LG з 10 % FBS та 1 % PenStrep (HyClone, США);
- Поживне середовище DMEM/F12 з 10 % FBS (Sigma-Aldrich, США);
- Розчин колагенази 1A 0,1 %-ий у PBS;
- Розчин LPS 5 мг/кг у 0,5 мл 0,9 % NaCl;
- Розчин авертину 2,5 %-ий.

2.2.3. Обладнання та витратні матеріали:

- Світлооптичний мікроскоп BX 41 (Olympus, Японія);
- Цифрова камера SP-500 UZ (Olympus, Японія);
- CO₂-інкубатор SteriCycle 371 (Thermo Fisher Scientific, США);
- Шейкер-термостат (BioSan, Латвія);
- Центрифуга лабораторна;
- Гемоцитометр Ньюбауера;
- Культуральні флакони площею 25 см² (Nunc, США);
- Чашки Петрі діаметром 35 мм (Sarstedt, Німеччина);
- Стерильні полістирольні пробірки об'ємом 5 мл;

- Набір хірургічних інструментів;
- Шприци одноразові інсулінові.

2.3. Моделювання експериментальної системної запальної відповіді

Для відтворення синдрому системної запальної відповіді (ССЗВ) в умовах експерименту використовували модель LPS-індукованого ендотоксикозу, яка є одним із найбільш поширених та відтворюваних підходів до вивчення патофізіологічних механізмів системного запалення у гризунів. Ліпополісахарид (LPS) бактерії *E. coli* є класичним індуктором запального каскаду, що зв'язується з рецепторами TLR-4 на поверхні імунокомпетентних клітин і запускає масивне вивільнення прозапальних цитокінів — TNF- α , IL-1 β , IL-6 та інших медіаторів запалення, формуючи клінічну картину ССЗВ.

Тваринам експериментальних груп одноразово інтраперитонеально вводили ліпополісахарид (LPS) *E. coli* у дозі 5 мг/кг, розчинений у 0,5 мл 0,9 % розчину NaCl. Обрана доза є сублетальною для дорослих мишей лінії FVB і відповідає дозам, що широко застосовуються в літературі для відтворення ССЗВ без летального результату, що дозволяє досліджувати постзапальні зміни клітинних популяцій у динаміці. Контрольна група тварин отримувала інтраперитонеально відповідний об'єм (0,5 мл) стерильного фізіологічного розчину за аналогічною схемою введення.

Вибір термінів виведення тварин — 7 та 14 діб після введення LPS — обумовлений перебігом основних фаз запальної відповіді. Сьома доба відповідає завершенню гострої фази ССЗВ і початку відновлювального періоду, тоді як чотирнадцята доба характеризує пізній постзапальний стан, під час якого відбувається поступова нормалізація системних показників. Порівняльний аналіз цих двох точок дозволяє оцінити як безпосередній вплив запалення на ММСК, так і ступінь відновлення їхніх функціональних властивостей.

Через 7 та 14 діб після введення препарату тварин виводили з експерименту шляхом цервікальної дислокації під загальним знеболенням інтраперитонеальним введенням 2,5 % розчину авертину в дозі 400 мг/кг. У стерильних умовах кабінету біологічної безпеки проводили забір фрагментів підшкірної жирової тканини пахової ділянки для виділення стромально-васкулярної фракції.

2.4. Отримання та характеристика ММСК жирової тканини мишей

2.4.1. Отримання первинних культур ММСК жирової тканини. Для отримання первинних культур ММСК у стерильних умовах препарували фрагменти підшкірної жирової тканини пахової ділянки та відмивали їх у фосфатно-сольовому буфері (PBS), що містив 1 % суміші антибіотиків PenStrep (Sigma-Aldrich, США). Жирову тканину механічно подрібнювали ножицями на фрагменти об'ємом приблизно 1 мм³ та інкубували в 3–5 мл 0,1 % розчину колагенази 1А (Sigma-Aldrich, США) при температурі 37 °С протягом 60 хв. з постійним перемішуванням на шейкері (BioSan, Латвія). Ферментативне розщеплення позаклітинного матриксу колагеназою 1А забезпечує ефективне вивільнення клітинних елементів із сполучнотканинного остову жирової тканини зі збереженням їхньої життєздатності та адгезивних властивостей.

Після завершення інкубації суспензію ресуспендували, додавали 10 мл повного поживного середовища для інактивації ферменту та центрифугували протягом 10 хв. при 450 ×g. Надосадову рідину, що містила зрілі адипоцити та фрагменти тканини, обережно видаляли. Утворений клітинний осад, який складав стромально-васкулярну фракцію (SVF), ресуспендували в повному поживному середовищі DMEM-LG (HyClone, США), що містило 10 % FBS, 1 % PenStrep, 1:100 non-essential amino acids та 200 мМ L-глутаміну (всі — Sigma-Aldrich, США). Після фільтрування через клітинний фільтр з діаметром пор 40 мкм для видалення невисокочепних агрегатів клітини переносили в культуральні флакони площею 25 см² (Nunc, США).

Культивування здійснювали у CO₂-інкубаторі SteriCycle 371 (Thermo Fisher Scientific, США) за стандартних умов: температурі 37 °C, зволоженій атмосфері з концентрацією CO₂ 5 %. Першу зміну поживного середовища проводили через 24–48 год. після посіву для видалення неадгезивних клітинних елементів; у подальшому середовище замінювали кожні 2–3 доби. Пасажування культур проводили при досягненні 80 % конфлюентності моношару за допомогою 0,25 % розчину трипсину та 0,02 % EDTA (Sigma-Aldrich, США) [25].

2.4.2. Отримання культур мікромаси ММСК жирової тканини. Культуру мікромаси ММСК жирової тканини формували після другого пасажу з метою оцінки здатності клітин до утворення тривимірних клітинних агрегатів — сфероїдів, що є одним із критеріїв підтвердження мезенхімального фенотипу та збереженості стовбурових властивостей. Для цього моношарову культуру переводили в суспензійний стан за допомогою 0,25 % розчину трипсину, відмивали в середовищі DMEM (Sigma-Aldrich, США) та переносили $1,5 \times 10^6$ клітин у стерильну полістирольну пробірку об'ємом 5 мл у повному поживному середовищі DMEM з 10 % FBS.

Через 24 год. після формування мікромаси клітини культивували в стандартних умовах CO₂-інкубатора протягом 7–12 діб. Для запобігання адгезії клітин до стінок пробірки її обережно струшували 1–2 рази на добу. Повну заміну поживного середовища здійснювали раз на дві–три доби шляхом короткочасного центрифугування ($300 \times g$, 3 хв.) з подальшим видаленням надосаду та ресуспендуванням мікромаси у свіжому середовищі. Площу поверхні сфероїдів мікромаси розраховували за допомогою програмного забезпечення ImageJ або за формулою:

$$S = 4 \cdot \pi \cdot R^2 \quad (2.1)$$

де π – математична константа (3,14); R – радіус сфери, визначений як половина середнього діаметру сфероїда за мікрофотографіями.

2.4.3. Оцінка проліферативного потенціалу культур ММСК *in vitro*.

Проліферативний потенціал є одним із ключових функціональних параметрів ММСК, що відображає їхню здатність до самооновлення та підтримки кількості клітин, необхідної для реалізації терапевтичних ефектів. Для його оцінки використовували метод послідовного субкультивування з визначенням часу подвоєння клітинної популяції (PDT).

Клітини після першого пасажу в кількості 1×10^5 вносили в чашки Петрі діаметром 35 мм (Sarstedt, Німеччина) з площею культуральної поверхні $9,5 \text{ cm}^2$ та культивували в поживному середовищі DMEM/F12 (Sigma-Aldrich, США), що містило 10 % FBS (HyClone, США), пеніцилін 100 од/мл, стрептоміцин 100 мкг/мл, 1:100 non-essential amino acids та 2 мМ L-глутаміну (всі — Sigma-Aldrich, США).

Після досягнення конфлюентного моношару клітини переводили в суспензію сумішню 0,25 % розчину трипсину та 0,02 % розчину EDTA (1:3) і центрифугували в поживному середовищі DMEM/F12 з 10 % FBS при $380 \times g$ протягом 10 хв. Після підрахунку клітин у гемоцитометрі Ньюбауера знову вносили 1×10^5 клітин у чашку Петрі та культивували в повному поживному середовищі. Субкультивування припиняли, коли кількість клітин після останнього пасажу була меншою за 1×10^5 , що свідчило про вичерпання проліферативного резерву. Кількість пасажів у середньому коливалась від 2 до 5.

Кількість подвоєнь клітин у популяції (n) та час подвоєння клітинної популяції (PDT, population doubling time) розраховували за формулами [26]:

$$n = C \cdot \lg(X_k / X_0) \quad (2.2)$$

$$\text{PDT} = T / (C \cdot \lg(X_k / X_0)) \quad (2.3)$$

де C – константа переведення натурального логарифму в десятковий ($C = 3,32$) для клітин, що культивуються; X_0 – кількість клітин на початку пасажу; X_k – кількість клітин, отриманих після субкультивування; T – тривалість логарифмічної фази росту

культури в годинах. Менше значення PDT свідчить про вищу проліферативну активність клітинної популяції.

2.4.4. Визначення колонієутворюючої здатності культур ММСК *in vitro*.

Колонієутворююча здатність є одним із фундаментальних критеріїв ідентифікації ММСК, що характеризує частку клітин у популяції, здатних до клональної проліферації і формування відособлених колоній при культивуванні з низькою щільністю посіву. Цей показник відображає наявність у популяції стовбурових клітин-попередників, здатних до самооновлення.

Клітини 1-го пасажу висаджували з низькою клональною щільністю 30 клітин/см² у чашки Петрі з площею культуральної поверхні 9,5 см² у поживному середовищі DMEM/F12 (Sigma-Aldrich, США), що містило 20 % фетальної сироватки великої рогатої худоби (HyClone, США), пеніцилін 100 од/мл, стрептоміцин 100 мкг/мл, 1:100 non-essential amino acids та 200 мМ L-глутаміну (всі — Sigma-Aldrich, США). Підвищена концентрація FBS (20 % проти стандартних 10 %) у середовищі для клонування забезпечує оптимальні умови для росту поодиноких клітин-попередників без необхідності паракринної підтримки з боку сусідніх клітин.

Культивування проводили у CO₂-інкубаторі за стандартних умов (37 °C, 5 % CO₂, зволожена атмосфера) протягом 14 діб без проміжного пасажування, що забезпечувало достатній час для формування видимих колоній із поодиноких клітин-попередників. Поживне середовище замінювали кожні 3–4 доби, уникаючи механічного пошкодження колоній.

Після завершення культивування чашки промивали фосфатно-сольовим буфером, клітини фіксували холодним 96 % етанолом протягом 10 хв. при температурі –20 °C, а сформовані колонії забарвлювали 10 % розчином азур-еозину. Підраховували кількість колоній (Colony-Forming Unit, CFU) діаметром понад 1 мм або таких, що склалися щонайменше зі 50 клітин. Ефективність клонування обчислювали за формулою:

$$\text{Ефективність клонування} = (X / Y) \cdot 100 \% \quad (2.4)$$

де X – кількість отриманих колоній; Y – початкова кількість висаджених клітин.

Підрахунок проводили у двох незалежних повторях для кожного зразка.

2.5. Верифікація мезенхімального фенотипу клітин

Верифікацію належності отриманих клітинних культур до популяції мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин здійснювали відповідно до мінімальних стандартів Міжнародного товариства клітинної терапії (ISCT), які передбачають три обов'язкові критерії: (1) адгезія до пластику в стандартних умовах культивування; (2) характерний імунофенотип (позитивна експресія CD73, CD90, CD105 та негативна — CD45, CD34, CD14, CD19, HLA-DR); (3) здатність до мультилінійного диференціювання в адипогенному, остеогенному та хондрогенному напрямках. У рамках даного дослідження верифікація ґрунтувалась на першому критерії та морфологічних ознаках культур, що є загальноприйнятим первинним підходом при порівняльних дослідженнях функціонального стану ММСК в ідентичних умовах культивування [25].

Критеріями ідентифікації слугували: стійка адгезія до культуральних ємностей після першої зміни середовища; формування гомогенного фібробластоподібного моношару на другому пасажі; характерна веретеноподібна або полігональна конфігурація клітин із чітко візуалізованими ядрами та цитоплазматичними відростками. Ці морфологічні ознаки є загальновизнаними первинними критеріями ідентифікації ММСК у культурах і не залежать від вікового чи запального статусу донора, що підтверджено літературними даними [3, 14]. Повна імунофенотипова характеристика і оцінка диференційовного потенціалу, хоча й не входять до завдань цієї роботи, не суперечать отриманим результатам і є предметом запланованих тематичних досліджень.

Застосований дизайн паралельного культивування клітин від тварин усіх груп в ідентичних умовах забезпечує коректність міжгрупових порівнянь: будь-які виявлені відмінності у морфологічних, клоногенних та проліферативних параметрах є відображенням біологічної реакції ММСК на вік і запальний стимул, а не технічних варіацій протоколу. Саме тому сукупність адгезивних, морфологічних та функціональних характеристик є достатньою для цілей даного дослідження і не потребує обов'язкового доповнення повним імунофенотипуванням у кожній окремій групі.

2.6. Статистичний аналіз результатів

Статистичну обробку отриманих даних здійснювали за допомогою програмного забезпечення MS Excel 2010 (Microsoft, США) та Statistica 7.0 (StatSoft Inc., США). Перед вибором методу статистичного аналізу перевіряли характер розподілу кількісних показників за критерієм Шапіро–Вілکا. За умови нормального розподілу та рівності дисперсій (критерій Левена) для порівняння двох незалежних груп застосовували параметричний t-критерій Стюдента для незалежних вибірок. У разі відхилення розподілу від нормального або при малих обсягах вибірок ($n < 10$) використовували непараметричний U-критерій Вілкоксона–Манна–Уїтні.

Числові результати подавали у вигляді середнього арифметичного значення (M) $\pm$ стандартна похибка середнього (SEM). Стандартна похибка середнього відображає точність оцінки генеральної середньої і дозволяє коректно порівнювати групові показники при різних обсягах вибірок. Відмінності середніх значень між групами порівняння вважали статистично достовірними при $p < 0,05$. Для наочного відображення міжгрупових відмінностей використовували гістограми з нанесенням значень SEM у вигляді стовпчиків похибок.

РОЗДІЛ 3

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ

3.1 Вплив LPS-індукованого синдрому системної запальної відповіді на функціональні характеристики ММСК жирової тканини молодих мишей

З метою верифікації належності отриманих первинних клітинних культур жирової тканини молодих піддослідних тварин до популяції мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин було здійснено їх комплексний аналіз за морфологічними параметрами, проліферативними та клоногенними характеристиками.

Характеристика первинної культури стромально-васкулярної фракції (пасаж 0)

3.1.1. Морфологічна характеристика культур. Первинна клітинна культура з жирової тканини піддослідних тварин, отримана як від тварин контрольної групи, так і експериментальної з введенням ліпополісахариду, характеризувалась різноманітними за морфологічними ознаками та розмірами адгезивними клітинними елементами, що було обумовлено початковою клітинною гетерогенністю складу стромально-васкулярної фракції, яка містить перицити, лейкоцитарні елементи, фібробласти, ендотеліальні клітини-попередники (Рис. 1)

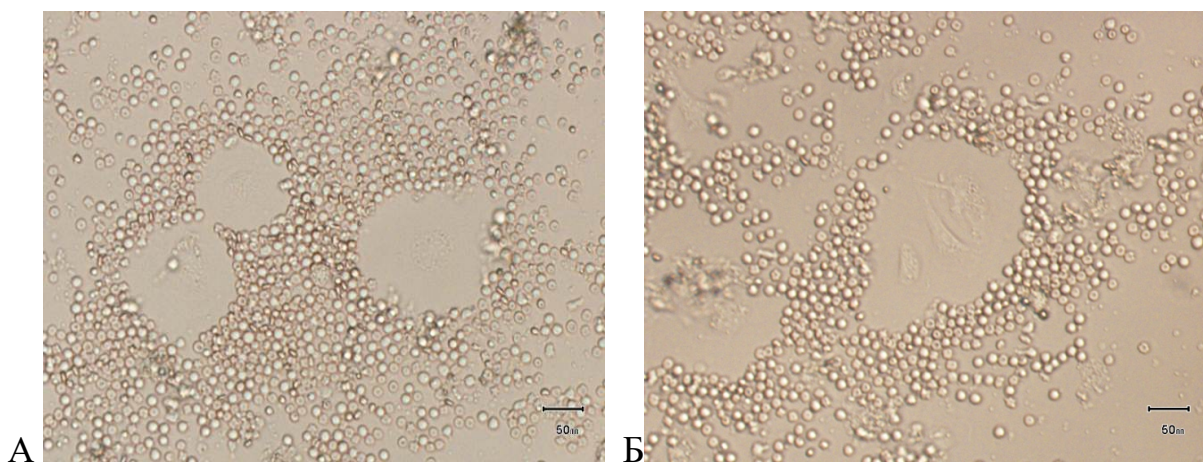


Рис. 1. А — Мікрофотографія первинної культури клітин стромально-васкулярної фракції контрольної групи на другу добу культивування, пасаж 0; Б — Первинна культура клітин СВФ експериментальної групи через сім діб після введення ліпополісахариду на другу добу культивування, пасаж 0.

Після досягнення моношару культуру P0 переводили у суспензійний стан за допомогою розчину трипсин 0,25 %/EDTA 0,02 %, відмивали у PBS з додаванням FBS для інактивації ферменту, центрифугували, видаляли надосад та вносили осад клітин у нові культуральні флакони з повним поживним середовищем для формування гомогенної культури клітин.

Характеристика клітин першого пасажу (P1)

У процесі культивування відбувалась елімінація слабоадгезивних клітинних компонентів, а на третю-шосту добу спостерігалось зростання загальної чисельності клітинних елементів. Збільшення площі адгезії та прискорення досягнення конфлюентного стану по всій площі культуральних ємностей відбувалось завдяки значним розмірам клітинних елементів. Впродовж шести-десяти діб культивування адгезивні клітинні елементи СВФ формували до 95 % конфлюентного моношару

За морфологічними параметрами клітинні елементи первинної культури мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин жирової тканини характеризувались подовженою або полігональною конфігурацією, іноді з декількома відростками, з чітко візуалізованими ядрами, а їхній діаметр варіював від десяти до двохсот п'ятдесяти мікрометрів (Рис. 2)

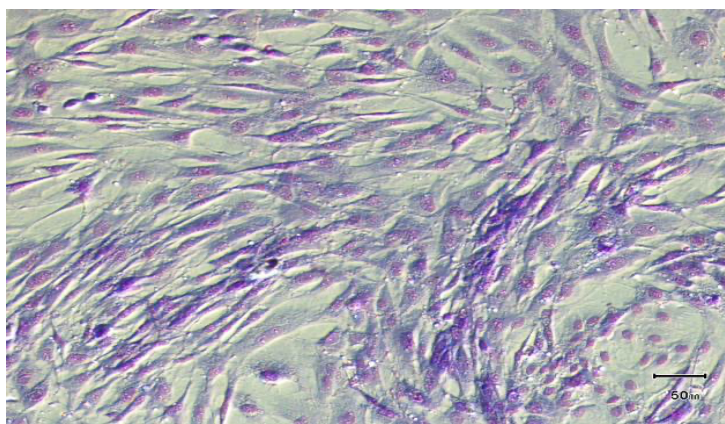


Рис. 2. Мікрофотографія первинної культури ММСК жирової тканини контрольної групи на першому пасажі. Фарбування за Giemsa. Світлова мікроскопія, шкала – 50 МКМ.

Характеристика культури клітин другого пасажу (P2)

Після субкультивування клітинні елементи досягали субконфлюентного стану в середньому на шосту добу. У процесі культивування культура набувала гомогенного стану і вже на другому пасажі складалась переважно з популяції фібробластоподібних клітинних елементів, які швидко формували моно шар (Рис.3).

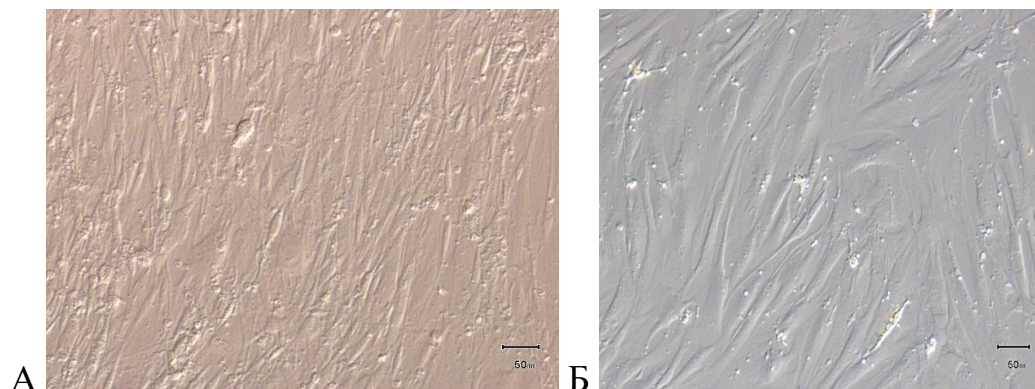


Рис. 3. А — Мікрофотографія культури ММСК жирової тканини контрольної групи на другому пасажі; Б — ММСК жирової тканини експериментальної групи через сім діб після введення ліпополісахариду на другому пасажі. Світлова мікроскопія, шкала — 50 мкм.

3.1.2. Клоногенна активність ММСК. ММСК, отримані з жирової тканини як контрольної групи, так і групи з введенням ЛПС, продемонстрували здатність до колоніє утворення (Рис. 4) , але з різною ефективністю.

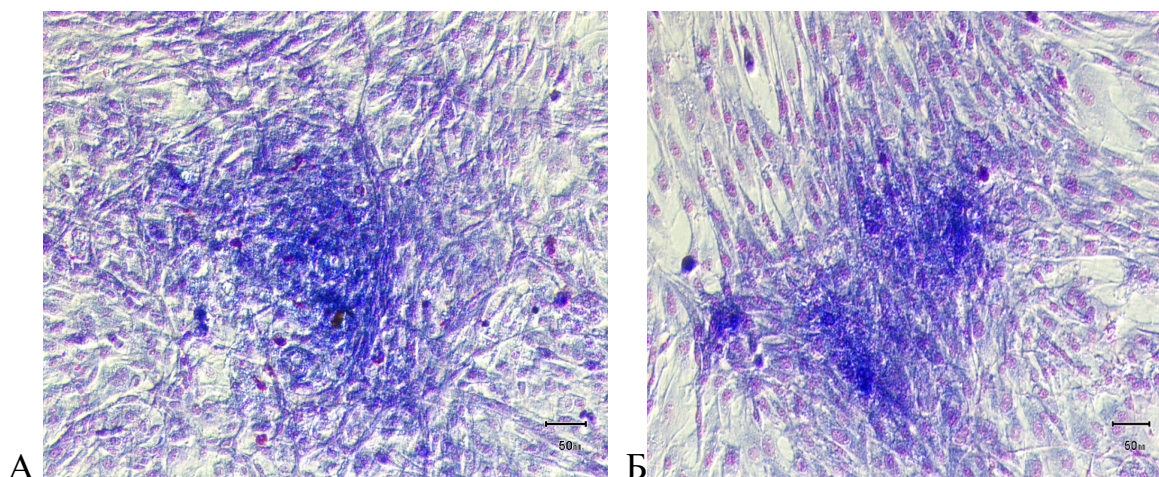


Рис. 4. А — Мікрофотографія колонієутворюючої одиниці фібробластів на дванадцятую добу культивування у групі піддослідних тварин без введення ліпополісахариду *E. coli*; Б — колонієутворююча одиниця фібробластів на дванадцятую добу культивування у групі піддослідних тварин через сім діб після введення ліпополісахариду *E. coli*.

За результатами культивування клітин встановлено зростання кількості колонієутворюючих одиниць фібробластного ряду як для стромально-васкулярної фракції (Рис. 5) , так і для мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин після другого пасажу у піддослідних тварин через сім та чотирнадцять діб після моделювання синдрому системної запальної відповіді, індукованого ліпополісахаридом *E. Coli*, порівняно з контрольною групою піддослідних тварин (Рис. 6).

Ефективність колонієутворення SVF

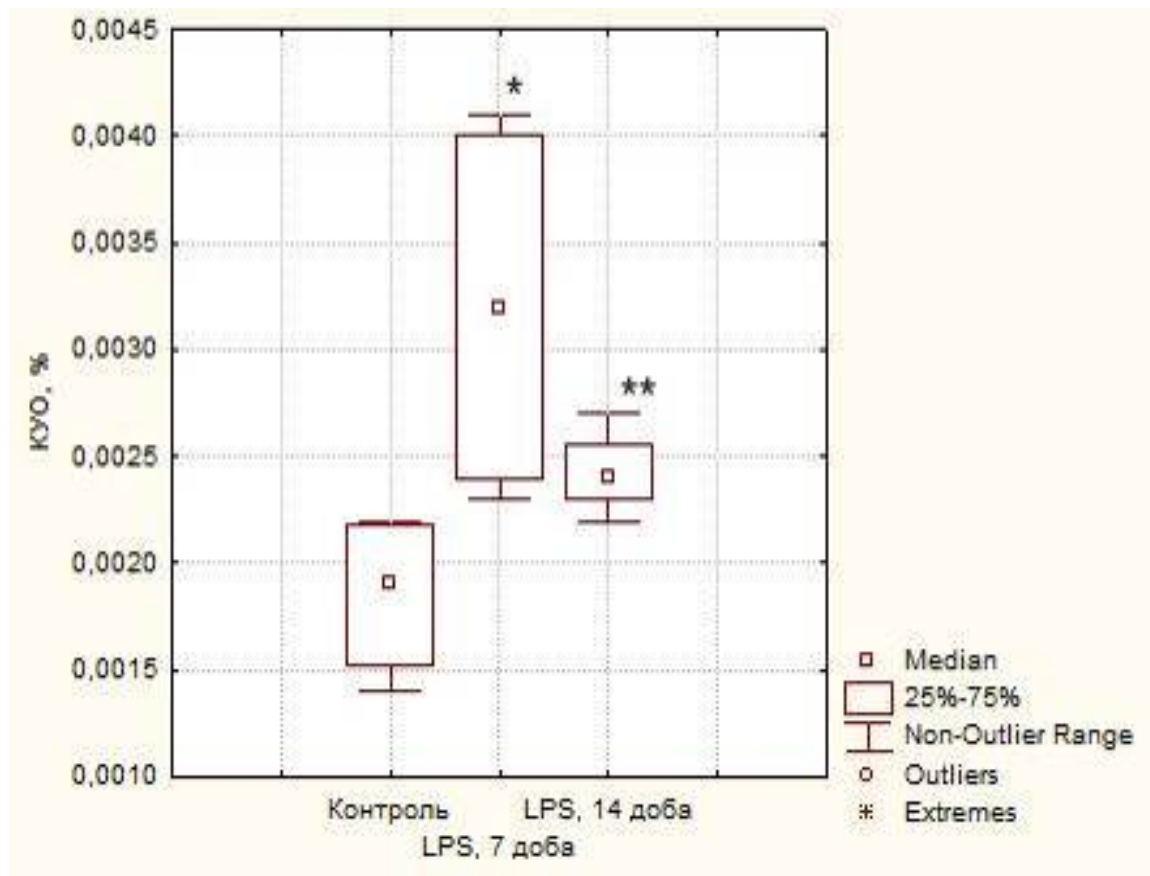


Рис. 5. Гістограма ефективності колонієутворення ядровмісних клітинних елементів стромально-васкулярної фракції у піддослідних тварин. Виявлено статистично значущі відмінності між контрольною групою та експериментальними групами: $p = 0,04$ та $p = 0,03$ у порівнянні з контрольною групою піддослідних тварин.

Ефективність колонієутворення ММСК

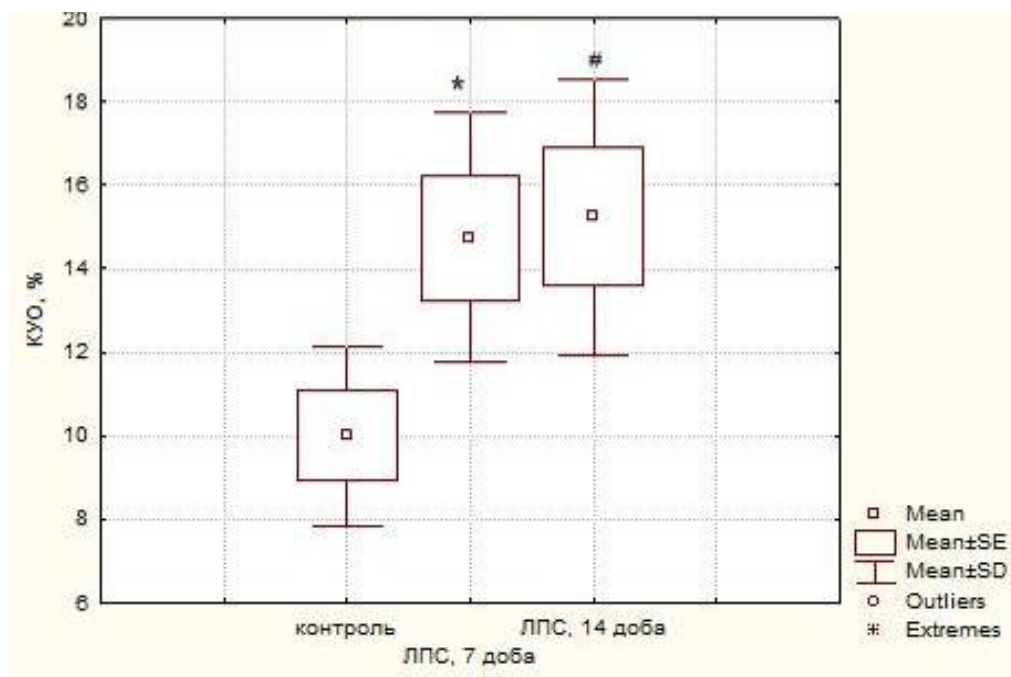


Рис. 6. Гістограма ефективності колонієутворення мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин жирової тканини у піддослідних тварин. Виявлено статистично значущі відмінності між контрольною групою та експериментальними групами.

3.1.3. Проліферативна активність ММСК. Варто наголосити, що часовий інтервал подвоєння клітинної популяції був більшим у культурах від піддослідних тварин із змодельованим системним запаленням як через сім, так і через чотирнадцять діб після введення ліпополісахариду і становив $4,83 \pm 0,77$ та $5,76 \pm 1,35$ доби відповідно у порівнянні з контрольною групою ($2,63 \pm 0,3$ доби) (Рис.7) .

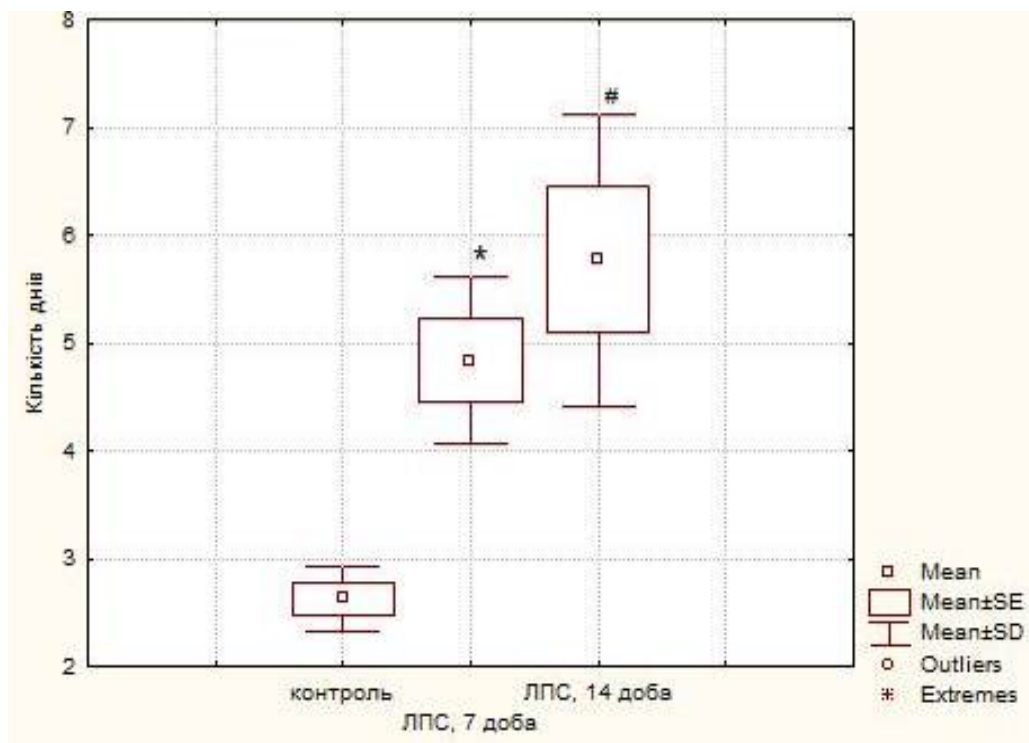


Рис. 7. Гістограма часу подвоєння популяції мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин жирової тканини піддослідних тварин в умовах культивування *in vitro*. Виявлено статистично значущі відмінності: $p = 0,001$ та $p = 0,004$ у порівнянні з контрольною групою піддослідних тварин.

Узагальнення функціональних характеристик ММСК молодих мишей

Таким чином, проведений комплексний аналіз функціональних характеристик мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин жирової тканини молодих піддослідних тварин в умовах змодельованого синдрому системної запальної відповіді, індукованого ліпополісахаридом, продемонстрував наступні особливості:

По-перше, морфологічні характеристики культур свідчать про збереження здатності до формування типових фібробластоподібних клітинних популяцій як у контрольній, так і в експериментальних групах, незважаючи на початкову гетерогенність стромально-васкулярної фракції.

По-друге, виявлено суттєве збільшення клоногенної активності, що проявлялось у зростанні кількості колонієутворюючих одиниць як на рівні стромально-васкулярної фракції, так і культивованих ММСК через сім та чотирнадцять діб після введення ліпополісахариду, що може свідчити про компенсаторну мобілізацію регенераторного потенціалу клітинних популяцій у відповідь на системне запалення.

По-третє, проліферативна активність демонструвала протилежну тенденцію: час подвоєння клітинної популяції збільшувався в експериментальних групах, що вказує на уповільнення проліферативних процесів під впливом системного запалення. Ця особливість може бути обумовлена активацією стресових клітинних відповідей та перерозподілом метаболічних ресурсів клітин на користь механізмів адаптації та виживання.

Отримані результати свідчать про складний характер впливу системного запалення на функціональний стан мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин жирової тканини, що проявляється у дисоційованій зміні різних функціональних параметрів клітинних популяцій.

3.2 Вплив LPS-індукованого синдрому системної запальної відповіді на функціональні характеристики ММСК жирової тканини старих мишей

Отримані первинні клітинні культури жирової тканини зі стромально-васкулярної фракції від старих піддослідних тварин було піддано комплексному аналізу за морфологічними параметрами, проліферативною та клоногенною активністю з метою верифікації їх належності до популяції мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин.

Характеристика первинної культури стромально-васкулярної фракції (пасаж 0)

3.2.1. Морфологічна характеристика культур. Первинна клітинна культура з жирової тканини піддослідних тварин, отримана як від особин контрольної групи, так і експериментальної з введенням ліпополісахариду, характеризувалась різноманітними за морфологічними параметрами та розмірами адгезивними клітинними елементами, що було обумовлено початковою гетерогенністю клітинних популяцій стромально-васкулярної фракції, оскільки містить перицити, лейкоцитарні елементи, фібробласти, ендотеліальні клітини-попередники (Рис. 8.)

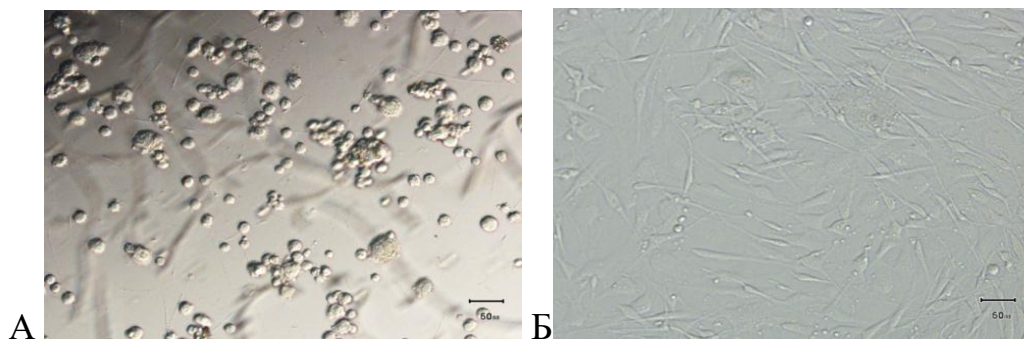


Рис. 8. А — Мікрофотографія первинної культури клітин стромально-васкулярної фракції жирової тканини старих піддослідних тварин на першу добу культивування, пасаж 0; Б — культура клітин стромально-васкулярної фракції через десять діб після початку культивування. Світлова мікроскопія, шкала – 50 мкм.

Характеристика клітин першого пасажу (Р 1)

У процесі культивування відбувалась елімінація культур від слабоадгезивних клітинних компонентів, а на п'яту-сьому добу спостерігалось зростання загальної чисельності клітинних елементів. Збільшення площі адгезії та прискорення досягнення конфлюентного стану по всій площі культуральних ємностей відбувалось завдяки значним розмірам клітинних елементів. У середньому на десяту добу культивування адгезивні клітинні елементи SVF формували до дев'яноста п'яти відсотків конфлюентного моношару.

За морфологічними параметрами клітинні елементи первинної культури мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин жирової тканини характеризувались подовженою або полігональною конфігурацією, іноді з декількома відростками, з чітко візуалізованими ядрами, а їхній діаметр варіював від десяти до двохсот п'ятдесяти мікрометрів.

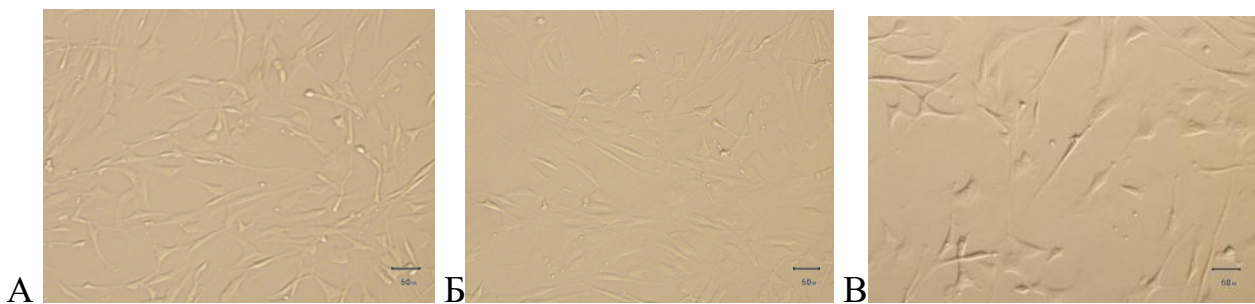


Рис. 9. А — Мікрофотографія первинної культури ММСК жирової тканини контрольної групи старих піддослідних тварин, перший пасаж; Б — первинна культура ММСК жирової тканини експериментальної групи через сім діб після

введення ліпополісахариду, перший пасаж; В — мікрофотографія первинної культури ММСК жирової тканини експериментальної групи через чотирнадцять діб після введення ліпополісахариду, перший пасаж. Світлова мікроскопія, шкала – 50 мкм.

Характеристик культури клітин другого пасажу P2)

Після субкультивування клітинні елементи першого пасажу досягали субконфлюентного стану в середньому на шосту добу. У процесі культивування культура набувала гомогенного стану і вже на другому пасажі складалась переважно з популяції фібробластоподібних клітинних елементів, які швидко формували моношар.



Рис. 10. А — Мікрофотографія культури ММСК жирової тканини контрольної групи старих піддослідних тварин, P2; Б — культура ММСК жирової тканини експериментальної групи через сім діб після введення ліпополісахариду, P2; В — мікрофотографія культури ММСК жирової тканини експериментальної групи через чотирнадцять діб після введення ліпополісахариду, P2.

Клоногенна активність ММСК, отримані з жирової тканини старих мишей як контрольної групи, так і групи з введенням ЛПС, продемонстрували здатність до колоніє утворення (Рис. 11) , але з різною ефективністю.

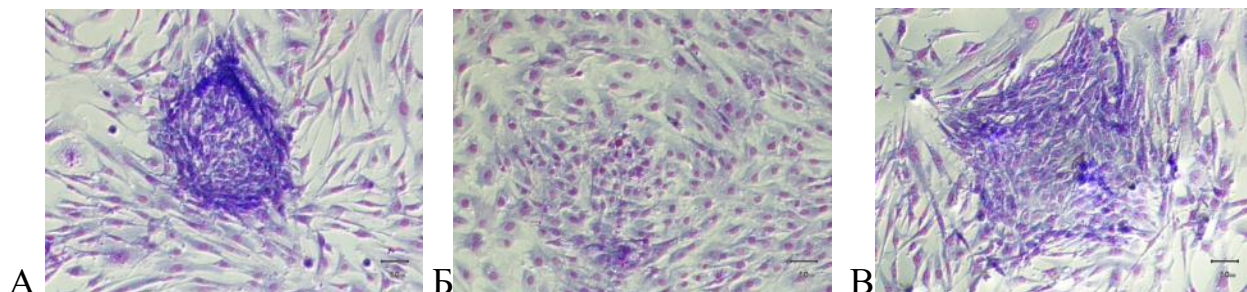


Рис. 11. А — Мікрофотографія колонієутворюючої одиниці фібробластів на дванадцять добу культивування у групі старих піддослідних тварин без введення ліпополісахариду *E. coli*; Б — колонієутворююча одиниця фібробластів на дванадцять добу культивування у групі старих піддослідних тварин через сім діб після введення ліпополісахариду *E. coli*; В — мікрофотографія колонієутворюючої одиниці фібробластів на дванадцять добу культивування у групі старих піддослідних тварин через чотирнадцять діб після введення ліпополісахариду *E. coli*.

Для мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин було продемонстровано статистично значуще збільшення ефективності колонієутворення як на сьому, так і на чотирнадцять добу після моделювання синдрому системної запальної відповіді, індукованого ліпополісахаридом, порівняно з контрольною групою піддослідних тварин.

За результатами культивування клітинних елементів встановлено зростання кількості колонієутворюючих одиниць фібробластного ряду для стромально-васкулярної фракції на сьому добу після моделювання синдрому системної запальної відповіді, індукованого ліпополісахаридом ($p < 0,05$ у порівнянні з контрольною групою піддослідних тварин). (Рис.12).

Ефективність колонієутворення SVF

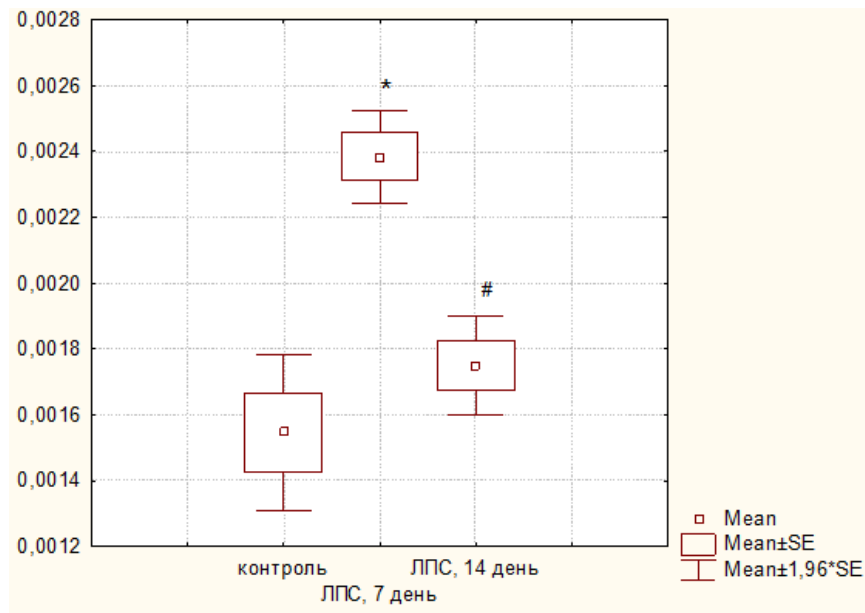


Рис. 12. Гістограма ефективності колонієутворення ядровмісних клітин стромально-васкулярної фракції у старих піддослідних тварин.

Не було виявлено статистично значущих відмінностей за цим показником на чотирнадцяту добу після введення ліпополісахариду у порівнянні з контрольною групою. Водночас, спостерігалось статистично значуще зменшення ефективності колонієутворення на чотирнадцяту добу після введення ліпополісахариду у порівнянні з групою піддослідних тварин через сім діб після введення ліпополісахариду.

Ефективність колонієутворення ММСК

За результатами культивування клітинних елементів встановлено зростання кількості колонієутворюючих одиниць фібробластного ряду для мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин на сьому добу після моделювання синдрому системної запальної відповіді, індукованого ліпополісахаридом ($p < 0,05$ у порівнянні з контрольною групою піддослідних тварин), а також на чотирнадцяту добу після

введення ліпополісахариду ($p < 0,05$ у порівнянні з контрольною групою піддослідних тварин) (Рис. 13).

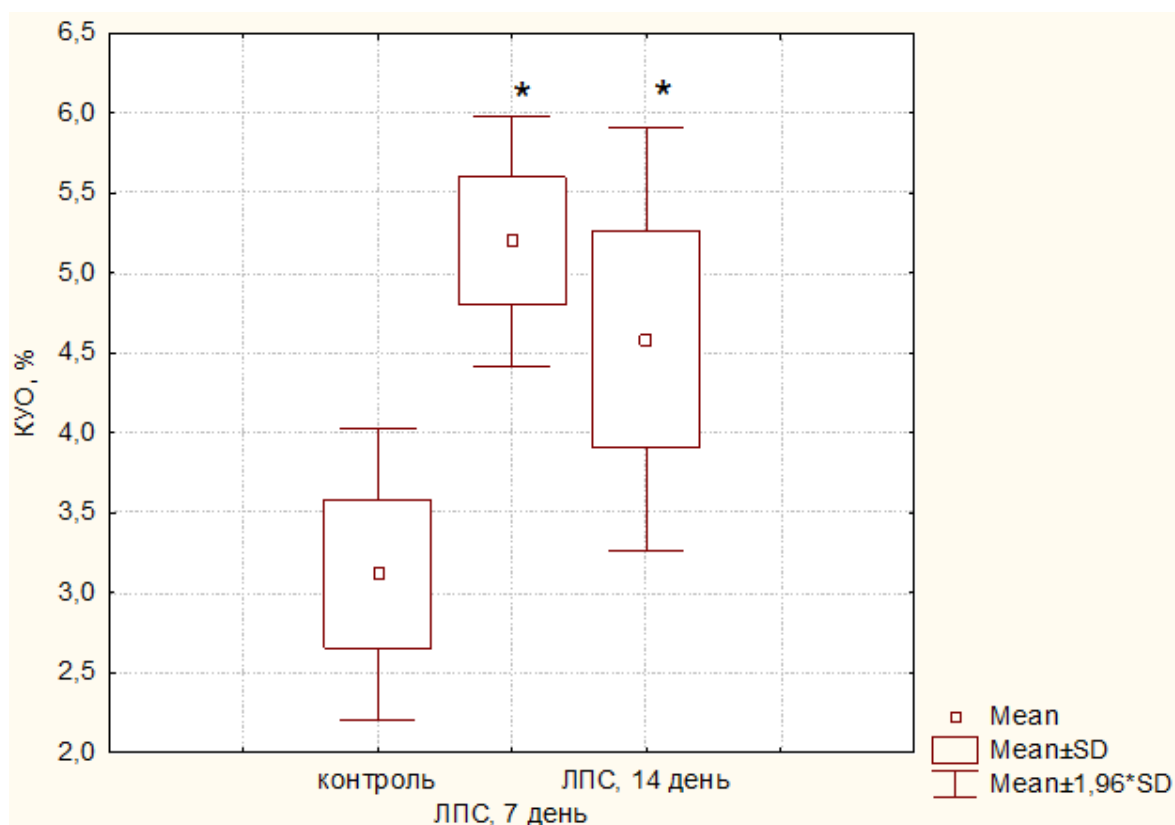


Рис. 13. Гістограма ефективності колонієутворення мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин жирової тканини у старих піддослідних тварин.

3.2.3. Проліферативна активність ММСК. Варто наголосити, що часовий інтервал подвоєння клітинної популяції був більшим у культурах від старих піддослідних тварин із змодельованим системним запаленням через чотирнадцять діб після введення ліпополісахариду порівняно з контрольною групою ($p = 0,04$) (Рис. 14).

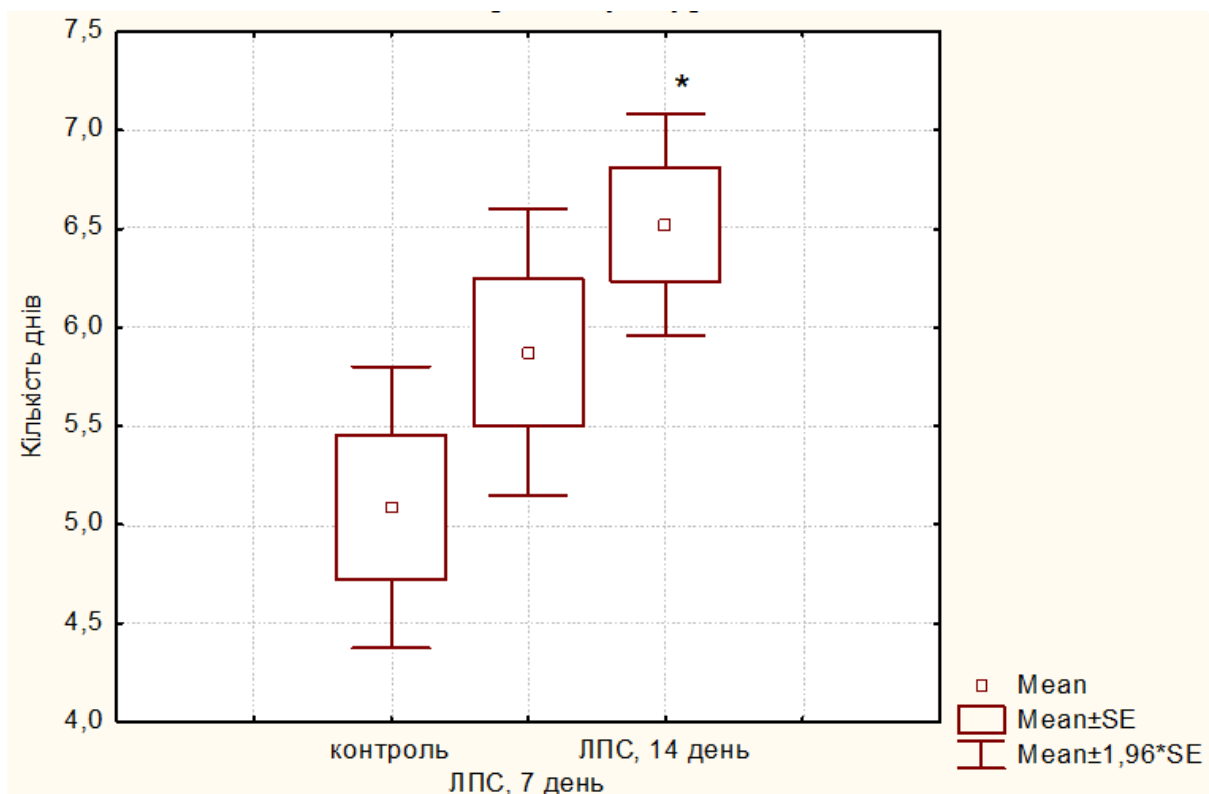


Рис. 14. Гістограма часу подвоєння популяції мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин жирової тканини старих піддослідних тварин в умовах культивування *in vitro*.

У той же час не було виявлено статистично значущих відмінностей у швидкості подвоєння популяції у піддослідних тварин через сім діб після моделювання системного запалення у порівнянні з контрольною групою, що становило в середньому $5,09 \pm 0,96$ та $5,87 \pm 0,64$ доби відповідно.

3.3 Порівняльний аналіз функціональних характеристик ММСК жирової тканини молодих та старих мишей в умовах LPS-індукованого синдрому системної запальної відповіді

Зіставлення результатів, отриманих у молодих та старих піддослідних тварин, дозволяє виявити якісні та кількісні відмінності у відповіді мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин жирової тканини на системне запалення залежно від віку організму-донора. Порівняльний аналіз проводився за трьома основними функціональними параметрами: морфологічними характеристиками культур,

клоногенною та проліферативною активністю ММСК. Актуальність такого зіставлення зумовлена глобальним старінням населення та зростаючою потребою у розробці ефективних регенеративних стратегій для геріатричної практики [5, 6].

3.3.1. Порівняльна характеристика морфологічних параметрів культур.

Морфологічна характеристика первинних культур та культур після субкультивування виявила принципові відмінності між віковими групами вже на рівні стромально-васкулярної фракції. Жирова тканина є багатим джерелом ММСК, однак кількісний та якісний склад стромально-васкулярної фракції суттєво змінюється в процесі старіння організму [2, 7]. У молодих тварин первинні культури SVF характеризувались вищою щільністю адгезивних клітинних елементів і коротшим часом досягнення конфлюентності — у середньому на третю-шосту добу — порівняно з п'ятою-сьомою добою у старих тварин. Ця різниця відображає нижчий вихідний вміст клітин-попередників у стромально-васкулярній фракції жирової тканини старих мишей, що узгоджується з відомими закономірностями вікового зниження пулу стромальних клітин [7, 13].

На рівні першого та другого пасажу морфологічна відмінність між групами ставала більш вираженою. Клітинні елементи культур від молодих тварин мали переважно веретеноподібну або полігональну конфігурацію з чіткими відростками та рівномірним розподілом у моношарі — типовий фібробластоподібний фенотип, описаний як основна морфологічна ознака ММСК жирової тканини при культивуванні *in vitro* [1, 3]. Натомість культури від старих тварин на аналогічних пасажах характеризувались більшими розмірами клітинних тіл, розпластанішою формою та помітнішою гетерогенністю популяції навіть за відсутності запального стимулу.

Збільшення розмірів клітин і набуття розпластаного фенотипу є одним із морфологічних маркерів клітинного старіння. Згідно з сучасними уявленнями, старіючі ММСК набувають характерних морфологічних змін внаслідок порушення

регуляції актинового цитоскелету та збільшення розмірів клітинного ядра [8]. Ці зміни асоційовані з різними механізмами старіння: реплікативним старінням внаслідок вкорочення теломерів, стрес-індукованим старінням та онкоген-індукованим старінням [9, 10, 11]. Збережений при цьому фібробластоподібний фенотип підтверджує, що морфологічні зміни при старінні є модифікацією, а не втратою основних ознак ММСК.

Введення LPS поглиблювало морфологічні зміни в обох вікових групах, однак характер і вираженість цих змін відрізнялись. У молодих тварин культури другого пасажу зберігали відносну однорідність фібробластоподібного фенотипу навіть через 14 діб після введення ліпополісахариду. У старих тварин через 14 діб після введення LPS спостерігалось більш виражене збільшення частки полігональних клітин із нечіткими межами цитоплазми. Це узгоджується з концепцією синергічного впливу вікових і запальних чинників: хронічне запальне тло («inflammaging»), притаманне старіючому організму [15, 17, 18], може потенціювати морфологічні зміни, індуковані гострим запаленням, зумовлюючи більш виражений клітинний поліморфізм у старих тварин.

3.3.2. Порівняльна характеристика клоногенної активності. Аналіз клоногенної активності виявив подібну загальну спрямованість реакції в обох вікових групах — зростання ефективності колонієутворення у відповідь на системне запалення — однак із суттєвими відмінностями у динаміці та тривалості цієї відповіді. Клоногенна активність є одним із фундаментальних показників стовбурових властивостей ММСК і відображає здатність клітин-попередників до самооновлення та клональної проліферації [1, 14].

У молодих тварин підвищення ефективності колонієутворення SVF реєструвалось на обох термінах дослідження — через 7 діб ($p = 0,04$) та через 14 діб ($p = 0,03$) після введення LPS. Така стійка двофазна відповідь свідчить про здатність молодого організму підтримувати мобілізацію клітин-попередників протягом усього

постзапального спостережного періоду. Підвищення клоногенної активності у відповідь на запальні сигнали пов'язують із впливом прозапальних цитокінів на резидентні стовбурові клітини: ММСК здатні реагувати на сигнали пошкодження, змінюючи свій функціональний стан для участі у відновлювальних процесах [34, 35]. Це узгоджується із сучасною парадигмою про роль ММСК як охоронців запалення, що тимчасово з'являються в ушкоджених тканинах і реагують на перехресну взаємодію з пошкодженими клітинами для обмеження деструкції та посилення відновлення [34].

У старих тварин підвищення клоногенної активності SVF було зафіксовано лише на сьому добу ($p < 0,05$), тоді як на чотирнадцяту добу показник повертався до контрольних значень. Ця двофазна динаміка з подальшим виснаженням компенсаторної відповіді відображає обмеженість резервного пулу клітин-попередників у жировій тканині старих тварин. Відомо, що функція аутологічних ММСК негативно змінюється з віком, що обмежує їхній терапевтичний потенціал [7, 8]. Зниження клітин-попередників у SVF старих тварин може бути пов'язане із хронічним запальним тлом, що накопичується з віком: тривала дія прозапальних цитокінів призводить до виснаження пулу стовбурових клітин та прискорення їх реплікативного старіння [15, 16].

Водночас для культивованих ММСК другого пасажу ефективність колонієутворення зростала на обох термінах після введення LPS в обох вікових групах ($p < 0,05$). Збереження підвищеної клоногенності ММСК старих тварин на 14-ту добу, на відміну від SVF, може пояснюватися тим, що умови культивування *in vitro* з послідовними пасажами та заміною поживного середовища дозволяють відібрати і збагатити популяцію найбільш стійкими клонами. Це відповідає даним про те, що культивування *in vitro* є необхідним для отримання достатньої кількості ММСК для клітинної терапії, а також дозволяє модифікувати їхні функціональні характеристики [26].

3.3.3. Порівняльна характеристика проліферативної активності. Найбільш виражені вікові відмінності були виявлені при аналізі проліферативної активності ММСК. Вихідний рівень PDT у контрольних групах молодих та старих тварин становив $2,63 \pm 0,30$ та $5,87 \pm 0,64$ доби відповідно. Понад дворазова різниця у базовому значенні PDT між групами є прямим підтвердженням загальновідомої закономірності: проліферативний потенціал ММСК знижується в процесі старіння організму [7, 8, 13]. Зниження проліферативної активності є наслідком накопичення стресових пошкоджень та активації механізмів клітинного старіння, включаючи вкорочення теломерів та стрес-індуковане старіння, що обмежують здатність клітин до поділу [9, 11].

У молодих тварин системне запалення зумовлювало статистично значуще збільшення PDT вже через 7 діб після введення LPS — до $4,83 \pm 0,77$ доби ($p = 0,001$), з подальшим наростанням до $5,76 \pm 1,35$ доби на 14-ту добу ($p = 0,004$). Уповільнення проліферації ММСК у відповідь на запальні сигнали є відомим феноменом: встановлено, що TNF- α , який відіграє значну роль у патогенезі системного запалення [27], здатний оборотно змінювати імуносупресивні та проліферативні властивості ММСК [28]. Ця реакція може розглядатися як адаптивна: уповільнення проліферації дозволяє клітинам перерозподілити метаболічні ресурси на синтез і секрецію протизапальних факторів — IL-10, TGF- β та інших медіаторів [1], реалізуючи таким чином паракринну імуномодулюючу функцію ММСК.

Уповільнення проліферації при збереженні або навіть підвищенні клоногенності є феноменом, відомим як стрес-індукована quiescence. Цей стан характеризується оборотним виходом клітин з клітинного циклу зі збереженням здатності до клональної проліферації після усунення стресового стимулу. Роль ММСК як охоронців запалення передбачає саме таку дворежимну поведінку: перехід у стан quiescence в умовах запального мікросередовища з одночасним посиленням секреторної та клоногенної активності [34, 35].

У старих тварин картина принципово відрізнялась: на 7-му добу PDT становив $5,09 \pm 0,96$ доби і статистично не відрізнявся від контрольного значення $5,87 \pm 0,64$ доби ($p > 0,05$). Достовірне уповільнення проліферації реєструвалось лише на 14-ту добу ($p = 0,04$). Відсутність ранньої проліферативної відповіді у старих тварин може пояснюватися кількома механізмами. По-перше, вихідно низький проліферативний потенціал залишає менший «простір» для подальшого уповільнення, що може маскувати ранню реакцію. По-друге, «inflammaging» — хронічне запальне тло, що є невід'ємною ознакою старіючого організму [15, 17, 18] — може обумовлювати зниження чутливості вікових ММСК до додаткових запальних сигналів через десенситизацію відповідних рецепторів та сигнальних шляхів. По-третє, накопичення пошкоджень ДНК і активація механізмів клітинного старіння обмежують здатність вікових ММСК до динамічної перебудови функціонального стану у відповідь на зовнішні стимули [8, 13].

Показово, що на 14-ту добу значення PDT молодих тварин ($5,76 \pm 1,35$ доби) наближалось до базового рівня PDT старих у контролі ($5,87 \pm 0,64$ доби). Ця закономірність свідчить про те, що гостре системне запалення тимчасово відтворює у молодих клітинах функціональний проліферативний профіль, характерний для вікового зниження. Фактично, LPS-індукований ССЗВ «функціонально старить» ММСК молодих тварин до рівня норми старих особин — що підкреслює глибину та біологічну значимість запального стресу для функціонального стану стромальних клітин-попередників.

3.3.4. Інтегральна оцінка вікових відмінностей функціональної відповіді ММСК. Узагальнюючи результати порівняльного аналізу, можна виділити два якісно різних патерни функціональної відповіді ММСК жирової тканини на системне запалення залежно від віку тварин-донорів.

Для молодих тварин характерний патерн ранньої, інтенсивної та симетричної адаптаційної відповіді: одночасне підвищення клоногенної активності та

уповільнення проліферації вже на 7-му добу свідчить про скоординовану мобілізацію стресових механізмів захисту. Цей патерн узгоджується з описаною в літературі роллю ММСК як динамічних регуляторів тканинного гомеостазу, що реагують на сигнали пошкодження комплексною перебудовою своїх функціональних характеристик [35]. Імуномодуючі властивості ММСК, які проявляються через секрецію протизапальних цитокінів, пригнічення прозапальних Т-хелперних клітин 1 типу та стимуляцію протизапальних Т-хелперних клітин 2 типу [30, 31], можуть забезпечувати ефективний контроль запального каскаду в молодому організмі.

Для старих тварин характерний патерн затриманої, менш вираженої та асиметричної відповіді з обмеженою тривалістю компенсаторних реакцій на рівні SVF. Цей патерн відображає вплив «inflammaging» на функціональний резерв стромальних клітин-попередників: хронічний запальний фон, що формується впродовж усього життя через антигенне навантаження та метаболічний стрес [15, 16, 17], поступово виснажує адаптаційний потенціал ММСК. Водночас принципова збереженість клоногенної активності культивованих ММСК старих тварин на обох термінах спостереження є важливим позитивним висновком: вона свідчить про те, що незважаючи на вікові зміни, ММСК жирової тканини зберігають ключову ознаку стовбурових клітин — здатність до клональної проліферації [6, 8].

Отже, вік є критичним модифікуючим фактором відповіді ММСК жирової тканини на системне запалення. Ці відмінності мають безпосереднє практичне значення для розробки стратегій застосування аутологічних ММСК у клінічній практиці: терапевтичний потенціал ММСК від літніх донорів зберігається, однак потребує урахування модифікованого функціонального профілю та, можливо, додаткової преклінічної оптимізації *ex vivo* для відновлення пошкоджених функцій [6, 8].

УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

Синдром системної запальної відповіді (ССЗВ) є складним патологічним станом, який супроводжується каскадом імунних, метаболічних та структурних порушень у багатьох тканинах організму [32, 33]. Однією з мішеней системного запалення є жирова тканина, яка не лише виконує енергетичну та ендокринну функції, але й слугує резервуаром мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин (ММСК) — ключових учасників процесів регенерації, імуномодуляції та підтримки тканинного гомеостазу [1, 3]. Зміни мікрооточення жирової тканини в умовах системного запалення безпосередньо позначаються на функціональному стані резидентних ММСК, причому характер цих змін значною мірою залежить від вікових особливостей організму [5, 8]. Актуальність вивчення цих закономірностей зумовлена, з одного боку, зростаючою частотою ССЗВ у клінічній практиці — зокрема, на тлі інфекційних ускладнень, тяжких травм та хірургічних втручань, — а з іншого, глобальним постарінням населення, що робить геріатричний контекст невід'ємною складовою будь-яких досліджень у сфері регенеративної медицини.

У межах проведеного дослідження було охарактеризовано вплив експериментального LPS-індукованого синдрому системної запальної відповіді на функціональні характеристики мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин, виділених із підшкірної жирової тканини молодих і старих мишей. Зокрема, проаналізовано морфологічні параметри первинних культур, а також клоногенну та проліферативну активність ММСК у динаміці — через 7 та 14 діб після введення ліпополісахариду *E. coli*. Вибір саме цих функціональних параметрів обумовлений їхньою інформативністю як інтегральних показників стовбурових властивостей і регенераторного потенціалу клітинних популяцій: клоногенна активність відображає наявність і частку клітин-попередників, здатних до самооновлення, тоді як проліферативна активність характеризує швидкість клітинного поділу та загальний функціональний резерв популяції.

Аналіз культур ММСК жирової тканини показав, що в усіх експериментальних групах клітини зберігали типові морфологічні характеристики незалежно від віку тварин та умов експерименту. На пасажі 0 первинна культура стромально-васкулярної фракції (SVF) була гетерогенною і містила перицити, лейкоцити, фібробласти та ендотеліальні клітини-попередники, тоді як уже на другому пасажі культура набувала гомогенного фібробластоподібного фенотипу й формувала конфлюентний моношар. Збереження адгезивних та фенотипових характеристик ММСК в умовах системного запалення узгоджується з даними літератури про стабільність основних ідентифікаційних ознак мезенхімальних стромальних клітин при культивуванні *in vitro* [2, 3]. Разом з тим, культури від старих тварин характеризувались рядом якісних морфологічних відмінностей: збільшеними розмірами клітинних тіл, розпластанішою конфігурацією, зниженою щільністю моношару та помітнішою гетерогенністю популяції навіть у контрольних групах. Ці зміни відповідають описаним у літературі ознакам реплікативного старіння стромальних клітин та є наслідком накопичення стресових пошкоджень ДНК, вкорочення теломерів і активації сигнальних шляхів p21/p53 та p16/Rb, що разом призводять до незворотного виходу частини клітин з клітинного циклу.

Водночас функціональні параметри клітинних популяцій зазнавали суттєвих змін, характер яких залежав від віку тварин. У молодих особин клоногенна активність зростала як на рівні стромально-васкулярної фракції, так і на рівні ММСК другого пасажу через 7 та 14 діб після введення ліпополісахариду ($p = 0,04$ та $p = 0,03$ відповідно). Однак проліферативна активність ММСК демонструвала протилежну тенденцію: час подвоєння клітинної популяції збільшувався з $2,63 \pm 0,3$ доби у контролі до $4,83 \pm 0,77$ доби на сьому добу та $5,76 \pm 1,35$ доби на чотирнадцяту добу ($p = 0,001$ та $p = 0,004$). Така дисоційована зміна — одночасне зростання клоногенності та уповільнення проліферації — є відомим феноменом стресової відповіді стромальних клітин, що позначається в літературі як стрес-індукована quiescence. Цей стан характеризується оборотним виходом клітин із клітинного циклу

зі збереженням здатності до клональної проліферації після усунення стресового стимулу. Встановлено, що прозапальні медіатори, зокрема TNF- α , здатні змінювати функціональні властивості ММСК, модулюючи їхню проліферативну активність та переводячи клітини у стан тимчасової зупинки зі збереженням клоногенного потенціалу [29, 34, 35]. З біологічної точки зору, цей перехід є доцільним: вивільнення від необхідності підтримувати активну проліферацію дозволяє ММСК спрямувати метаболічні ресурси на синтез та секрецію протизапальних паракринних факторів — IL-10, TGF- β 1, PGE2 та HGF — реалізуючи таким чином свою ключову імуномодуючу функцію в умовах гострого запалення.

У старих тварин ефективність колонієутворення ММСК також достовірно зростала на обох термінах дослідження ($p < 0,05$), однак для стромально-васкулярної фракції була виявлена двофазна динаміка: початкове зростання на сьому добу змінювалось зниженням до контрольних значень на чотирнадцяту добу. Ця відмінність між поведінкою SVF та культивованих ММСК є принципово важливою з методологічного погляду: вона свідчить про те, що умови культивування *in vitro* з послідовними пасажами та селекційним тиском дозволяють збагатити популяцію найбільш стійкими клонами, здатними зберігати функціональний потенціал навіть у пізньому постзапальному періоді. Феномен виснаження клоногенної відповіді SVF у старих тварин на 14-ту добу може відображати обмеженість компенсаторних резервів клітинних популяцій в умовах вікового зменшення пулу клітин-попередників [6, 7, 13]. Відповідно до концепції «inflammaging» — хронічного низькоінтенсивного запального тла, що формується в процесі старіння організму, — ММСК старих тварин функціонують в умовах перманентної субпорогової активації запальних сигнальних шляхів [15, 17, 18]. Тривала дія прозапальних цитокінів прискорює реплікативне старіння клітин-попередників та виснажує їхній резервний пул, унаслідок чого здатність до мобілізації у відповідь на гострий запальний стимул виявляється обмеженою в часі.

Проліферативна активність ММСК старих тварин уповільнювалась лише на чотирнадцяту добу ($p = 0,04$), тоді як на цьому добу часовий інтервал подвоєння клітинної популяції ($5,09 \pm 0,96$ доби) статистично значуще не відрізнявся від контрольних значень ($5,87 \pm 0,64$ доби). Відсутність ранньої проліферативної відповіді у старих тварин, ймовірно, пов'язана зі зниженою чутливістю вікових ММСК до цитокінових сигналів внаслідок вікових змін рецепторного апарату та порушення внутрішньоклітинних сигнальних механізмів [5, 7, 8]. Крім того, вихідно підвищений базальний рівень прозапальних цитокінів у старих тварин може зумовлювати часткову десенситизацію відповідних рецепторних систем і знижувати амплітуду клітинної відповіді на додатковий запальний стимул — ефект, подібний до феномену ендотоксинової толерантності, описаного для клітин вродженого імунітету. Показово, що на 14-ту добу значення PDT молодих тварин ($5,76 \pm 1,35$ доби) наближалось до базового рівня PDT старих у контролі ($5,87 \pm 0,64$ доби), що свідчить про здатність гострого системного запалення тимчасово відтворювати у молодих клітинах функціональний профіль, характерний для вікового зниження проліферативного потенціалу. Фактично, LPS-індукований ССЗВ «функціонально старить» ММСК молодих тварин — що підкреслює глибину запального стресу та його здатність відтворювати ключові ознаки вікової інволюції клітинних популяцій.

Порівняння функціональних характеристик ММСК молодих і старих тварин виявило виражені вікові особливості відповіді клітинних популяцій на системне запалення. Для молодих особин характерний патерн ранньої, інтенсивної та симетричної адаптаційної відповіді: одночасне підвищення клоногенної активності та уповільнення проліферації вже на 7-му добу свідчить про скоординовану мобілізацію стресових механізмів захисту. Для старих — патерн затриманої, менш вираженої та асиметричної відповіді з обмеженою тривалістю компенсаторних реакцій на рівні SVF. Принципово важливо, що підвищення клоногенної активності зберігалось у обох вікових групах, що вказує на принципову збереженість регенераторного потенціалу ММСК навіть в умовах вікової інволюції тканини. Цей висновок має важливе

практичне значення: збережена клоногенність ММСК старих тварин свідчить про принципову можливість застосування аутологічних ММСК жирової тканини у геріатричних пацієнтів [1, 5, 6], хоча і з урахуванням модифікованого функціонального профілю цих клітин. Відповідно, розробка методів *ex vivo* оптимізації ММСК від літніх донорів — зокрема, передпересадочного кондиціонування ростовими факторами (FGF-2, EGF) чи гіпоксичним прекондиціонуванням — є перспективним напрямком підвищення ефективності аутологічної клітинної терапії в геріатрії.

Загалом результати дослідження демонструють, що LPS-індукований синдром системної запальної відповіді викликає глибокі функціональні зміни мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин жирової тканини, характер і динаміка яких суттєво відрізняються залежно від віку тварин. Для молодих особин типовою є рання та інтенсивна стресова відповідь з одночасною мобілізацією клоногенного потенціалу та тимчасовим уповільненням проліферації. Для старих — затримана та менш виражена адаптаційна реакція з обмеженістю компенсаторних резервів SVF, що може відображати вплив «inflammaging» на функціональний резерв стромальних клітин-попередників [15, 16, 17]. Імуномодуючі та регенеративні властивості ММСК жирової тканини, детально описані в літературі [28, 34, 35], зберігаються в умовах системного запалення, проте їхня повноцінна реалізація потребує врахування вікового контексту донора. Вік є не лише біологічною характеристикою тварини-донора, а й критичним модифікуючим фактором, що визначає тип, інтенсивність та тривалість функціональної відповіді ММСК на запальний стрес.

Отримані дані можуть слугувати основою для подальших досліджень із розробки вікодиференційованих підходів до корекції наслідків системного запалення та оптимізації регенеративних стратегій із використанням аутологічних ММСК жирової тканини. Перспективними напрямками є вивчення імунофенотипу (CD73, CD90, CD105, CD34, CD45) та диференційовного потенціалу ММСК в умовах ССЗВ

[2, 4, 14], а також дослідження *in vivo* терапевтичної ефективності ММСК при моделюванні тканинних пошкоджень у тварин різного віку. Не менш актуальним є вивчення молекулярних механізмів виявлених вікових відмінностей — зокрема, ролі сигнальних шляхів NF- κ B та JAK-STAT у регуляції функціональної відповіді ММСК на запалення, а також епігенетичних механізмів, що визначають вікову пластичність стовбурових клітин. Включення аналізу секретому ММСК — цитокінового профілю кондиційованого середовища та складу екзосом — дозволило б значно повніше охарактеризувати паракринну функцію цих клітин у постзапальному контексті та оцінити потенційні відмінності між молодими та старими донорами на молекулярному рівні.

Окремої уваги заслуговує питання трансляції отриманих експериментальних даних у клінічну практику. Незважаючи на те, що миша є лише модельним організмом, а лінія FVB має власні генетичні особливості, загальні закономірності — збереження клоногенного потенціалу ММСК при одночасному зниженні проліферативної активності у відповідь на запальний стрес — узгоджуються з результатами досліджень на ММСК людини. Зокрема, показано, що ММСК жирової тканини літніх людей характеризуються зниженою здатністю до проліферації та зміненним секреторним профілем порівняно з молодими донорами, що підтверджує міжвидову консервативність виявлених закономірностей і підвищує трансляційну цінність отриманих результатів. Розуміння того, як вік донора модифікує функціональну відповідь ММСК на системне запалення, є необхідною передумовою для розробки персоналізованих протоколів клітинної терапії, адаптованих до індивідуального функціонального профілю клітин конкретного пацієнта.

ВИСНОВКИ

1. У молодих мишей системне запалення сприяло значному посиленню клоногенного потенціалу клітин стромально-васкулярної фракції та ММСК як на сьому, так і на чотирнадцяту добу після введення ліпополісахариду), що може свідчити про компенсаторну мобілізацію регенераторного потенціалу клітинних популяцій в умовах системного запалення.
2. . Проліферативна активність ММСК молодих мишей в умовах системного запалення достовірно знижувалася у порівнянні з контрольною групою тварин. що може вказувати на перерозподіл метаболічних ресурсів клітин на користь стресових адаптаційних механізмів.
3. . У старих мишей клоногенний потенціал ММСК достовірно зростав на обох термінах дослідження, однак для стромально-васкулярної фракції була характерна двофазна динаміка — початкове підвищення на сьому добу та повернення до контрольних значень на чотирнадцяту добу, що може відображати поступове виснаження компенсаторних резервів клітинних популяцій в умовах вікової інволюції.
4. Проліферативна активність ММСК старих мишей уповільнювалася на чотирнадцяту добу після введення ліпополісахариду, тоді як на сьому добу час подвоєння клітинної популяції не відрізнявся від значень контрольної групи , що може свідчити про знижену здатність до своєчасної мобілізації стресових адаптаційних механізмів у старих тварин.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Wang, L., Jiang, X., Zhao, F., Duan, P., Li, Z., & Luo, Y. (2025). A review of adipose-derived mesenchymal stem cells' impacts and challenges. *Frontiers in Endocrinology*, 16, 1606847.
2. Baer, P. C., & Geiger, H. (2011). Adipose-Derived Mesenchymal Stromal/Stem Cells: Tissue Localization, Characterization, and Heterogeneity. *Stem Cells International*, 2012(1), 812693.
3. Gimble, J. M., Katz, A. J., & Bunnell, B. A. (2007). Adipose-derived stem cells for regenerative medicine. *Circulation Research*, 100(9), 1249–1260.
4. Ong, W. K., Chakraborty, S., & Sugii, S. (2021). Adipose Tissue: Understanding the Heterogeneity of Stem Cells for Regenerative Medicine. *Biomolecules*, 11(7), 918.
5. Fraile, M., Eiro, N., Costa, L. A., Martín, A., & Vizoso, F. J. (2022). Aging and Mesenchymal Stem Cells: Basic Concepts, Challenges and Strategies. *Biology*, 11(11), 1678.
6. Block, T. J., Marinkovic, M., Tran, O. N., Gonzalez, A. O., Marshall, A., Dean, D. D., & Chen, X. D. (2017). Restoring the quantity and quality of elderly human mesenchymal stem cells for autologous cell-based therapies. *Stem Cell Research & Therapy*, 8(1), 217.
7. Liu, M., Lei, H., Dong, P., Fu, X., Yang, Z., Yang, Y., Ma, J., Liu, X., Cao, Y., & Xiao, R. (2017). Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells from the Elderly Exhibit Decreased Migration and Differentiation Abilities with Senescent Properties. *Cell Transplantation*, 26(9), 1505–1519.
8. Zhou, X., Hong, Y., Zhang, H., & Li, X. (2020). Mesenchymal Stem Cell Senescence and Rejuvenation: Current Status and Challenges. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 8, 364.
9. Ho, T. T., Warr, M. R., Adelman, E. R., Lansinger, O. M., Flach, J., Verovskaya, E. V., Figueroa, M. E., & Passequé, E. (2017). Autophagy maintains the metabolism and function of young and old stem cells. *Nature*, 543(7644), 205–210.

10. Kosar, M., Bartkova, J., Hubackova, S., Hodny, Z., Lukas, J., & Bartek, J. (2011). Senescence-associated heterochromatin foci are dispensable for cellular senescence, occur in a cell type- and insult-dependent manner and follow expression of p16^{ink4a}. *Cell Cycle*, 10(3), 457–468.
11. Kornienko, J. S., Smirnova, I. S., Pugovkina, N. A., Ivanova, J. S., Shilina, M. A., Grinchuk, T. M., Shatrova, A. N., Aksenov, N. D., Zenin, V. V., Nikolsky, N. N., & Lyublinskaya, O. G. (2019). High oxygen concentration induces premature senescence of multipotent mesenchymal stromal cells. *Free Radical Biology and Medicine*, 134, 532–542.
12. Liu, J., Qu, X., Zhao, L., Wang, J., An, H., Lv, P., Li, X., Sun, B., & Yan, C. (2015). Reversine promotes cell cycle of adipose-derived stem cells through regulating Nanog and Sox2 expression. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 410(1–2), 111–118.
13. Stolzing, A., Jones, E., McGonagle, D., & Scutt, A. (2008). Age-related changes in human bone marrow-derived mesenchymal stem cells: Consequences for cell therapies. *Mechanisms of Ageing and Development*, 129(3), 163–173.
14. Andrzejewska, A., Lukomska, B., & Janowski, M. (2019). Concise review: Mesenchymal stem cells: From roots to boost. *Stem Cells*, 37(7), 855–864.
15. Abuna, R. P. F., De Oliveira, F. S., Santos, T. S., Guerra, T. R., Rosa, A. L., & Beloti, M. M. (2016). Participation of TNF- α in inhibitory effects of adipocytes on osteoblast differentiation. *Journal of Cellular Physiology*, 231(1), 204–214.
16. Franceschi, C., Bonafè, M., Valensin, S., Olivieri, F., De Luca, M., Ottaviani, E., & De Benedictis, G. (2000). Inflamm-aging. An evolutionary perspective on immunosenescence. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 908, 244–254.
17. Castellani, G. C., Menichetti, G., Garagnani, P., Giulia Bacalini, M., Pirazzini, C., Fantini, S., Contoli, M., Franceschi, C., & Collini, P. (2016). Systems medicine of inflammaging. *Briefings in Bioinformatics*, 17(3), 527–540.

18. Franceschi, C., Capri, M., Monti, D., Giunta, S., Olivieri, F., Sevini, F., Panourgia, M. P., Invidia, L., Celani, L., Scurti, M., Cevenini, E., Castellani, G. C., & Salvioli, S. (2007). Inflammaging and anti-inflammaging: A systemic perspective on aging and longevity emerged from studies in humans. *Mechanisms of Ageing and Development*, 128(1), 92–105.
19. Chen, Y., Klein, S. L., Garibaldi, B. T., Li, H., Wu, C., Osevala, N. M., Li, T., Margolick, J. B., Pawelec, G., & Leng, S. X. (2021). Aging in COVID-19: Vulnerability, immunity and intervention. *Ageing Research Reviews*, 65, 101205.
20. Michaud, M., Balardy, L., Moulis, G., Gaudin, C., Peyrot, C., Vellas, B., Cesari, M., & Nourhashemi, F. (2013). Proinflammatory cytokines, aging, and age-related diseases. *Journal of the American Medical Directors Association*, 14(12), 877–882.
21. Singh, T., & Newman, A. B. (2011). Inflammatory markers in population studies of aging. *Ageing Research Reviews*, 10(3), 319–329.
22. Liu, Y. Z., Wang, Y. X., & Jiang, C. L. (2017). Inflammation: The common pathway of stress-related diseases. *Frontiers in Human Neuroscience*, 11, 316.
23. Bruunsgaard, H., Pedersen, M., & Pedersen, B. K. (2001). Aging and proinflammatory cytokines. *Current Opinion in Hematology*, 8(3), 131–136.
24. Barbour, K. E., Boudreau, R., Danielson, M. E., Youk, A. O., Wactawski-Wende, J., Greep, N. C., LaCroix, A. Z., Horwitz, M. J., Evans, R. W., & Cauley, J. A. (2012). Inflammatory markers and the risk of hip fracture: The Women's Health Initiative. *Journal of Bone and Mineral Research*, 27(5), 1167–1176.
25. Candore, G., Caruso, C., & Colonna-Romano, G. (2010). Inflammation, genetic background and longevity. *Biogerontology*, 11(5), 565–573.
26. Wang, L., Wang, L., Cong, X., Liu, G., Zhou, J., Bai, B., Li, Y., Bai, W., Li, M., Ji, H., Zhu, D., Wu, M., & Liu, Y. (2013). Human umbilical cord mesenchymal stem cell therapy for patients with active rheumatoid arthritis: Safety and efficacy. *Stem Cells and Development*, 22(24), 3192–3202.

27. Sun, L., Wang, D., Liang, J., Zhang, H., Feng, X., Wang, H., Hua, B., Liu, B., Ye, S., Hu, X., Xu, W., Zeng, X., Hou, Y., Gilkeson, G. S., Silver, R. M., Lu, L., & Shi, S. (2010). Umbilical cord mesenchymal stem cell transplantation in severe and refractory systemic lupus erythematosus. *Arthritis & Rheumatism*, 62(8), 2467–2475.
28. Chiang, C. C., Fu, L. C., Hsia, C. Y., Chen, L. T., Chuang, C. H., Chen, M. H., & Chou, Y. H. (2019). Adipose-derived mesenchymal stem cells in the treatment of rheumatoid arthritis: Phase I/II clinical trial. *Regenerative Medicine*, 14(11), 1019–1030.
29. Madrigal, M., Rao, K. S., & Riordan, N. H. (2014). A review of therapeutic effects of mesenchymal stem cell secretions and induction of secretory modification by different culture methods. *Journal of Translational Medicine*, 12, 260.
30. González, M. A., Gonzalez-Rey, E., Rico, L., Büscher, D., & Delgado, M. (2009). Treatment of experimental arthritis by inducing immune tolerance with human adipose-derived mesenchymal stem cells. *Arthritis & Rheumatism*, 60(4), 1006–1019.
31. Djouad, F., Fritz, V., Apparailly, F., Louis-Pence, P., Bony, C., Sany, J., Jorgensen, C., & Noël, D. (2005). Reversal of the immunosuppressive properties of mesenchymal stem cells by tumor necrosis factor alpha in collagen-induced arthritis. *Arthritis & Rheumatism*, 52(5), 1595–1603.
32. Freedman, M. S., Bar-Or, A., Atkins, H. L., Karussis, D., Frassoni, F., Lazarus, H., Scolding, N., Slavin, S., Le Blanc, K., & Uccelli, A. (2010). The therapeutic potential of mesenchymal stem cell transplantation as a treatment for multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis*, 16(4), 503–510.
33. Gerdoni, E., Gallo, B., Casazza, S., Musio, S., Bonanni, I., Pedemonte, E., Mantegazza, R., Frassoni, F., Mancardi, G., Pedotti, R., & Uccelli, A. (2007). Mesenchymal stem cells effectively modulate pathogenic immune response in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Annals of Neurology*, 61(3), 219–227.

34. Zappia, E., Casazza, S., Pedemonte, E., Benvenuto, F., Bonanni, I., Gerdoni, E., Giunti, D., Ceravolo, A., Cazzanti, F., Frassoni, F., Mancardi, G., & Uccelli, A. (2005). Mesenchymal stem cells ameliorate experimental autoimmune encephalomyelitis inducing T-cell anergy. *Blood*, 106(5), 1755–1761.
35. Mazini, L., Rochette, L., Amine, M., & Malka, G. (2019). Regenerative capacity of adipose derived stem cells (ADSCs), comparison with mesenchymal stem cells (MSCs). *Int J Mol Sci*, 20(10), 2523.
36. Bourin, P., Bunnell, B. A., Casteilla, L., et al. (2013). Stromal cells from the adipose tissue-derived stromal vascular fraction and culture expanded adipose tissue-derived stromal/stem cells: a joint statement of IFATS and ISCT. *Cytotherapy*, 15(6), 641–648.
37. Luz-Crawford, P., Kurte, M., Bravo-Alegría, J., et al. (2013). Mesenchymal stem cells generate a CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulatory T cell population during the differentiation process of Th1 and Th17 cells. *Stem Cell Res Ther*, 4(3), 65.
38. Wang, D., Zhang, H., Liang, J., et al. (2013). Allogeneic mesenchymal stem cell transplantation in severe and refractory systemic lupus erythematosus: 4 years of experience. *Cell Transplant*, 22(12), 2267–2277.
39. Le Blanc, K., Frassoni, F., Ball, L., et al. (2008). Mesenchymal stem cells for treatment of steroid-resistant, severe, acute graft-versus-host disease: a phase II study. *Lancet*, 371(9624), 1579–1586.
40. Lalu, M. M., McIntyre, L., Pugliese, C., et al. (2012). Safety of cell therapy with mesenchymal stromal cells (SafeCell): a systematic review and meta-analysis of clinical trials. *PLoS One*, 7(10), e47559.
41. Galipeau, J., & Sensébé, L. (2018). Mesenchymal stromal cells: clinical challenges and therapeutic opportunities. *Cell Stem Cell*, 22(6), 824–833.
42. Squillaro, T., Peluso, G., & Galderisi, U. (2016). Clinical trials with mesenchymal stem cells: an update. *Cell Transplant*, 25(5), 829–848.

43. Viswanathan, S., Shi, Y., Galipeau, J., et al. (2019). Mesenchymal stem versus stromal cells: ISCT position statement on nomenclature. *Cytotherapy*, 21(10), 1019–1024.
44. Eggenhofer, E., Benseler, V., Kroemer, A., et al. (2012). Mesenchymal stem cells are short-lived and do not migrate beyond the lungs after intravenous infusion. *Front Immunol*, 3, 297.
45. Théry, C., Witwer, K. W., Aikawa, E., et al. (2018). Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018). *J Extracell Vesicles*, 7(1), 1535750.
46. Shi, Y., Wang, Y., Li, Q., et al. (2018). Immunoregulatory mechanisms of mesenchymal stem and stromal cells in inflammatory diseases. *Nat Rev Nephrol*, 14(8), 493–507.
47. Mushahary, D., Spittler, A., Kasper, C., Weber, V., & Charwat, V. (2018). Isolation, cultivation, and characterization of human mesenchymal stem cells. *Cytometry A*, 93(1), 19–31.
48. Mendicino, M., Bailey, A. M., Wonnacott, K., Puri, R. K., & Bauer, S. R. (2014). MSC-based product characterization for clinical trials: an FDA perspective. *Cell Stem Cell*, 14(2), 141–145.
49. Sensebé, L., Gadelorge, M., & Fleury-Cappellesso, S. (2013). Production of mesenchymal stromal/stem cells according to good manufacturing practices: a review. *Stem Cell Res Ther*, 4(3), 66.
50. Hmadcha, A., Martin-Montalvo, A., Gauthier, B. R., Soria, B., & Capilla-Gonzalez, V. (2020). Therapeutic potential of mesenchymal stem cells for cancer therapy. *Front Bioeng Biotechnol*, 8, 43.
51. Qazi, T. H., Mooney, D. J., Pumberger, M., Geissler, S., & Duda, G. N. (2015). Biomaterials based strategies for skeletal muscle tissue engineering: existing technologies and future trends. *Biomaterials*, 53, 502–521.

52. Phelps, J., Sanati-Nezhad, A., Ungrin, M., Duncan, N. A., & Sen, A. (2018). Bioprocessing of mesenchymal stem cells and their derivatives: toward cell-free therapeutics. *Stem Cells Int*, 2018, 9415367.
53. Sensebé, L., Bourin, P., & Tarte, K. (2011). Good manufacturing practices production of mesenchymal stem/stromal cells. *Hum Gene Ther*, 22(1), 19–26.
54. Martin, I., Galipeau, J., Kessler, C., Le Blanc, K., & Dazzi, F. (2019). Challenges for mesenchymal stromal cell therapies. *Sci Transl Med*, 11(480), eaat2189.