

УДК: 591.81:616-006.484:591.3:591.881:616-092.9
doi:10.22494/cot.v4i2.58

Морфометрична характеристика TGF- β 1-позитивних клітин фетального мозку щура *in vitro*



Любич Л. Д., Лісяний М. І., Малишева Т. А., Семенова В. М., Стайно Л. П., Васлович В. В.
ДУ «Інститут нейрохірургії ім. акад. А. П. Ромоданова НАМН України», Київ, Україна

e-mail: lyubichld@gmail.com

РЕЗЮМЕ

Одним із напрямів клітинної терапії, що розробляється для лікування гліом головного мозку, є використання нейрогенних стовбурових та прогеніторних клітин (НСК/НПК). Існують дані щодо протипухлинних та імуномодуючих властивостей НСК/НПК, механізми реалізації яких не з'ясовані. Як одну з потенційних мішеней для терапії пухлин розглядають трансформуючий фактор росту β (TGF- β), який вважають одним із ключових факторів регуляції проліферації, диференціації та виживання або апоптозу.

Оскільки існують дані про можливість продукції TGF- β мультипотентними НСК/НПК ссавців, метою роботи було дослідження TGF- β 1-позитивних клітин в динаміці культивування нейрогенних клітин фетального мозку як потенційного джерела протипухлинних або імуномодуючих ефектів цих клітин.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ. Матеріалом для культивування слугували клітини фетального мозку щура 14-ї доби гестації (E14), які досліджували морфометрично та за допомогою імуноцитохімічних реакцій на 2-у та 37-у добу культивування в стандартних умовах (середовище DMEM + 1 % фетальна теляча сироватка).

РЕЗУЛЬТАТИ. В культурі клітин фетального мозку щура TGF- β 1-імунопозитивні клітини становили $22,04 \pm 2,33$ % від загальної кількості, тоді як нестин-позитивні – $49,16 \pm 10,60$ %. Морфометричні показники TGF- β 1-позитивних клітин перевищували відповідні показники негативних клітин (середні значення площі перерізу клітини, площі перерізу ядра, ядерно-цитоплазматичного співвідношення). Протягом культивування відносна кількість TGF- β 1-позитивних клітин дещо зменшувалась ($15,27 \pm 9,80$ %, $p = 0,7$) а їх розміри збільшувались. На 37-у добу культивування розміри TGF- β 1-позитивних клітин, а також їх ядер були меншими за розміри TGF- β 1-негативних клітин.

ВИСНОВКИ. Встановлено наявність експресії TGF- β 1 у частини нейрогенних клітин фетального мозку щура (E14) *in vitro*, яка зберігалась протягом культивування (~5 тиж.). Виявлено значущі кількісні відмінності морфометричних показників TGF- β 1-позитивних та негативних клітин.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: культура клітин фетального мозку; TGF- β 1; нестин; морфометрія; імуноцитохімія

У даний час клітинна трансплантологія знаходить своє застосування у лікуванні широкого кола захворювань, у тому числі нейроонкологічних. Одним із напрямів клітинної терапії, що розробляється, зокрема для лікування гліом головного мозку, є використання нейрогенних стовбурових та прогеніторних клітин (НСК/НПК) [1-4]. Показано, що НСК/НПК можуть мігрувати до гліобластом, пригнічувати ріст гліоми у мишей та щурів і подовжувати тривалість життя тварин-носіїв пухлин [5-7] завдяки індукції довгострокової протипухлинної відповіді [5, 8]. Виявлено клітинну і молекулярну подібність НСК та стовбурових клітин пухлин мозку [9, 10]. Тим не менш механізми протипухлинних та імуномодуючих властивостей НСК/НПК залишаються нез'ясованими.

Як одну з потенційних мішеней для терапії пухлин розглядають трансформуючий фактор росту β (*transforming growth factor β* – TGF- β) та пов'язані з ним клітинні сигнальні шляхи [11-16]. TGF- β вважають одним із ключових факторів регуляції проліферації, диференціації та виживання або апоптозу [14, 15, 17]. У фізіологічних умовах TGF- β має важливе значення у процесах ембріо- і морфогенезу та у підтриманні гомеостазу тканин [13, 18]. В умовах патології, зокрема при гліальних пухлинах мозку, TGF- β може відігравати дуалістичну роль. З одного боку, цей фактор є важливим медіатором злоякісного фенотипу гліом мозку людини: модулює інвазивність, ангиогенез, ухилення від імунного контролю та підтримання стовбурових клітин

пухлин мозку [16, 19-21]. З іншого боку, TGF- β вважається фактором пригнічення пухлинного росту, оскільки є сильним інгібітором проліферації різних типів клітин [16, 22].

Показано, що TGF- β є високо плейотропним цитокином, що відіграє ключову регуляторну роль у багатьох аспектах імунної відповіді: прямо інгібує цитолітичну активність природних кілерів, макрофагів, CD8⁺ цитотоксичних лімфоцитів (ЦТЛ), а також може пригнічувати активацію і експансію пухлиноспецифічних популяцій Т-хелперів та ЦТЛ і посилювати генерацію імуносупресивних Т-регуляторних клітин [11, 23].

На даний час наявні окремі дані щодо експресії TGF- β 1 клітинами фетального мозку. Зокрема, у роботі R. Pelton та ін. при імуногістохімічному дослідженні зрізів мозку у тканині ЦНС ембріона миші у період з 12,5 по 18,5 день ембріогенезу виявлено високу експресію TGF- β 2 і TGF- β 3 та невелику – TGF- β 1 [18]. Деякими іншими дослідниками показано, що мультипотентні НПК людини, щура і миші здатні продукувати всі ізоформи TGF- β , зокрема TGF- β 1, TGF- β 2 [24-26].

Оскільки нейрогенні клітини, які експресують TGF- β 1, є ймовірно потенційним джерелом протипухлинних та імунomodуючих ефектів, з огляду на можливість їх застосування у клітинній терапії гліом мозку важливим видається підтвердження здатності НСК/НПК до експресії TGF- β 1 у умовах *in vitro*. Тому метою роботи було морфометричне дослідження TGF- β 1-позитивних клітин в динаміці культивування нейрогенних клітин фетального мозку.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Усі роботи з експериментальними тваринами були погоджені Комітетом з біоетики ДУ «Інститут нейрохірургії ім. акад. А. П. Ромоданова НАМН України» та проводились з дотриманням Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження», «Європейської конвенції по захисту хребетних тварин, які використовуються з експериментальною та іншою науковою метою», а також з урахуванням принципів біоетики та норм біологічної безпеки. У дослідженні використані білі аутбредні щури (n = 6, самиці вагою 200 ± 10 г) розводки віварію ДУ «Інститут нейрохірургії ім. акад. А. П. Ромоданова НАМН України». Тварин утримували у стандартних умовах з вільним доступом до води та їжі. Знеболення та евтаназію проводили за допомогою ефірного наркозу.

Матеріалом для культивування слугували клітини фетального мозку щура 14-ї доби гестації (E14). Первинні культури клітин фетального мозку щура (E14) отримували за стандартним протоколом [27]. Нативну тканину мозку плодів щура звільняли від плодових оболонок у фізіологічному розчині, переносили в середовище DMEM (*Sigma*, Німеччина) і суспендували багаторазовим піпетуванням. Клітини осаджували центрифугуванням протягом 5 хв. при 1500 об/хв., відмивали у середовищі DMEM, до осаду клітин додавали свіже середовище DMEM та ресуспендували. Життєздатність клітин визначали за проникністю плазматичної мембрани для 0,2 % розчину трипанового синього (*Merck*, Німеччина) [27].

Клітини в кількості 1•10⁶ наносили на адгезивні покривні скельця площею 1 см², вкриті поліетиленіміном (*Sigma*, Німеччина), які поміщали у чашки Петрі (n = 12) і культивували в середовищі DMEM з додаванням 1 % фетальної телячої сироватки (*Sigma*, США), 400 мг % глюкози та 0,2 од/мл інсуліну (об'єм поживного середовища становив 2 мл). Клітини культивували в CO₂-інкубаторі за стандартних умов (37 °C, вологість 95 %, 5 % CO₂) та прижиттєво спостерігали за допомогою інвертованого мікроскопа Eclips TS 100 (*Nikon*, Японія) з мікрофотографічною реєстрацією. Поживне середовище змінювали кожних 3 доби, загальний строк культивування становив 37 діб. На 2-у та 37-у добу культури фіксували 10 % формаліном і проводили цитологічний та імуногістохімічний аналіз клітинного складу.

Імуногістохімічне забарвлення на TGF- β 1, а також на нестин проводили за попередньо відпрацьованою методикою. Первинни-

ми антитілами слугували мишачі моноклональні антитіла до TGF- β 1 (*Sigma*, США) та кролячі афінні антитіла до нестину (*Sigma*, США) у розведенні 1:100; вторинними антитілами – мічені пероксидазою козячі antimouse/antirabbit IgG (*Dako*, Данія) у розведенні 1:200. Візуалізацію імуногістохімічних реакцій проводили за допомогою субстратного розчину з діамінобензидином (*Dako*, Данія), дофарбовували гематоксиліном і заключали в бальзам. Паралельно проводили дослідження з постановкою позитивного і негативного контролю. Як негативний контроль використовували клітини фетального мозку щура, для яких при імуногістохімічному фарбуванні виключали етап нанесення первинних антитіл. Як позитивний контроль на TGF- β 1 використовували культивовані клітини гліоми C6 щура з Клітинного банку ліній тканин людини та тварин Інституту експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р. Є. Кавецького НАН України (м. Київ).

Мікроскопічне дослідження та фотореєстрацію цитологічних препаратів первинних культур здійснювали на мікроскопі AxioImager A2 (*Carl Zeiss*, Німеччина) з широкосмуговим фільтром та фотокамерою AxioCam MRc5 (*Carl Zeiss*, Німеччина). Кількісні дослідження культур проводили в 10 репрезентативних полях зору зі стандартною вимірною шкалою об'єкт-мікрометра. Аналіз цифрових зображень проводили за допомогою програмного забезпечення Zen Lite 2012 (Німеччина). У препаратах культур визначали загальну кількість клітин, кількість імунопозитивних та негативних клітин, морфометричні показники. Морфометричний аналіз проводили за допомогою обробки цифрових зображень культур в 10 довільно вибраних полях зору загальною площею 0,04 мм² для кожного зразка при однаковому збільшенні (x800). Визначали загальну кількість клітин, площу перерізу ядер клітин та площу перерізу цитоплазми клітин. Кількісний показник ядерно-цитоплазматичного співвідношення знаходили як частку математичного ділення площі перерізу ядер клітин на площу перерізу цитоплазми клітин.

Кількість клітин, позитивних на TGF- β 1 і нестин, визначали в 10 довільно вибраних полях зору для кожного зразка при однаковому збільшенні (x800) та вираховували як частку від загальної кількості клітин у відсотках.

Статистичну обробку даних проводили з використанням програмного забезпечення «Statistica 8.0» (*StatSoft Inc.*, США). Застосовували параметричні (t-критерій Стьюдента, двохвибірковий t-тест з різними дисперсіями) та непараметричні (критерій Манна-Вітні для порівняння незалежних груп) методи варіаційної статистики, а також кореляційний аналіз із застосуванням рангового критерію Спірмена. Нормальність розподілу даних визначали за критерієм Шапіро-Уїлка. Статистично значущими вважали відмінності при p < 0,05, статистично високозначущими – при p < 0,01.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

З метою аналізу клітинного складу культур нейрогенних клітин фетального головного мозку щура (E14) ми провели імуногістохімічне дослідження експресії нестину. На 2-у добу культивування клітини, позитивні на нестин, становили 49,16 ± 10,60 % від загальної кількості клітин в культурі (рис. 1-А, див. с. 208).

Оскільки нестин є білком проміжних філаментів, експресованих в НСК, і вважається нейрональним маркером [28, 29], можна стверджувати, що культури нейрогенних клітин фетального головного мозку щура (E14) містили в середньому біля 50 % НСК/НКП. Середні значення площі перерізу нестин-позитивних клітин становили 20,26 ± 0,83 мкм², середні значення площі перерізу ядер – 10,69 ± 0,33 мкм², ядерно-цитоплазматичне співвідношення – 1,24 ± 0,06.

У той же час у первинних культурах клітин нормального фетального мозку щура (E14) на 2-у добу культивування в стандартних умовах частка клітин, позитивних на TGF- β 1, становила 22,04 ± 2,33 % (рис. 1-В, див. с. 208).

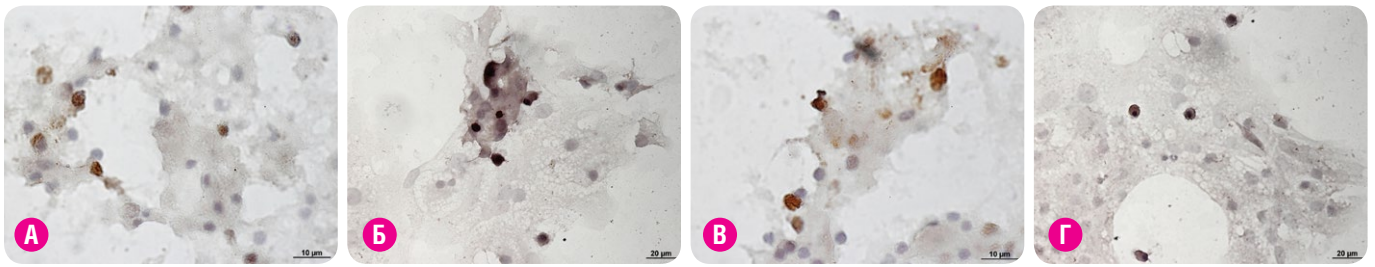
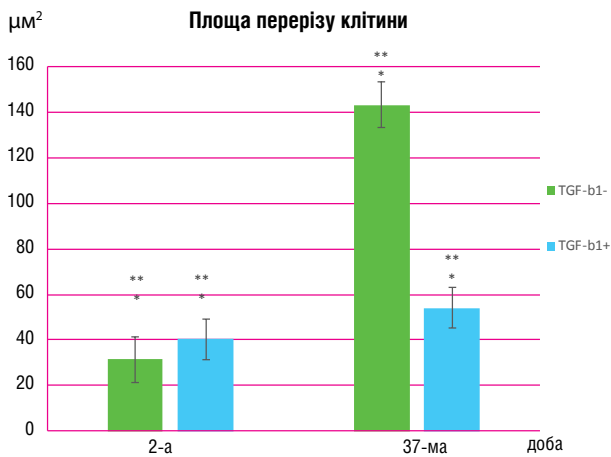
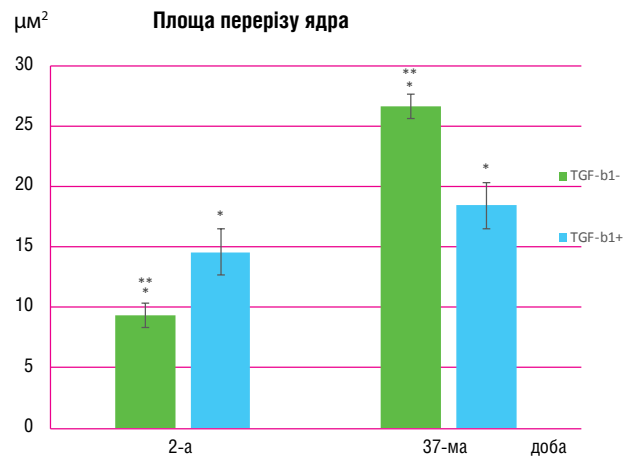


Рис. 1. Мікрофотографії цитопрепаратів культур фетального мозку щурів, 2-а (А, В) та 37-а (Б, Г) доба культивування. Імуноцитохімічне забарвлення (коричневий колір) на нестин (А, Б) та TGF-β1 (В, Г) із дозабарвленням гематоксилином.

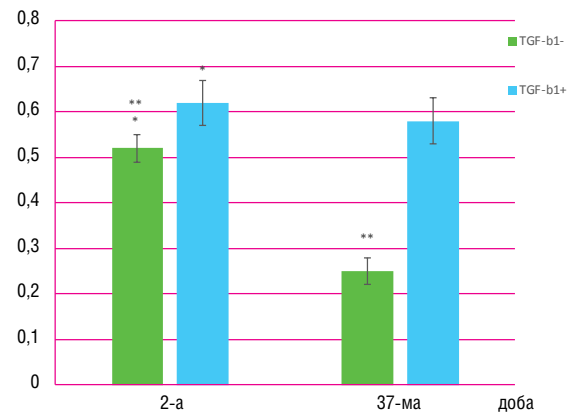


А



Б

Ядерно-цитоплазматичне співвідношення



В

Рис. 2. Морфометрична характеристика культивованих нейрогенних клітин фетального мозку щура (E14) залежно від експресії TGF-β1, n = 100: А – площа перерізу клітини; Б – площа перерізу ядра; В – ядерно-цитоплазматичне співвідношення.

Примітки:

* – статистично значуща різниця між позитивними і негативними клітинами (p < 0,05);

** – статистично значуща різниця між показниками на 2-у і 37-у добу (p < 0,05).

Морфометричні показники TGF-β1-позитивних клітин у культурі клітин фетального головного мозку щура (E14) на 2-у добу культивування статистично значуще відрізнялись від показників TGF-β1-негативних клітин. Середні значення площі перерізу TGF-β1-негативних та позитивних клітин у культурі фетального мозку становили відповідно 31,38 ± 2,56 мкм² та 40,42 ± 2,89 мкм² (p = 0,04, U-критерій Манна-Уїтні; **рис. 2-А**); середні значення площі перерізу ядер відповідно дорівнювали 9,34 ± 0,47 мкм² та 14,58 ± 0,85 мкм² (p = 0,003, U-критерій Манна-Уїтні; **рис. 2-Б**).

Ядерно-цитоплазматичне співвідношення у TGF-β1-позитивних клітинах (0,62 ± 0,04) було вищим за показник імунонегативних клітин (0,52 ± 0,05, p = 0,03, U-критерій Манна-Уїтні; **рис. 2-В**). Таким чином, розміри TGF-β1-позитивних клітин, а також їх ядер у культурах клітин фетального головного мозку щура (E14) були більшими за розміри TGF-β1-негативних клітин.

Кореляційний аналіз засвідчив відсутність значущих кореляційних зв'язків між кількісними показниками нестин- та TGF-β1-позитивних та негативних клітин (p > 0,05, ранговий критерій Спірмена).

Протягом культивування загальна кількість клітин у культурі збільшувалась в середньому приблизно в 1,4 разу, однак різниця не була статистично значущою (p = 0,6, U-критерій Манна-Уїтні). У той

же час, відносна кількість нестин-позитивних клітин дещо зменшувалась (37,78 ± 12,17 %, p = 0,24, U-критерій Манна-Уїтні). На 37-у добу культивування відносна кількість TGF-β1-позитивних клітин також зменшувалась, проте ці зміни не були статистично значущими (15,27 ± 9,80 %, p = 0,7, U-критерій Манна-Уїтні).

З огляду на те, що нестин при диференціації НСК замінюється на типоспецифічні клітинні проміжні філаменти – нейрофіламенти і гліальний фібрилярний кислий білок (glial fibrillary acidic protein – GFAP) [28, 29], ми припустили, що певна частка клітин у культурі фетального мозку протягом місячного терміну культивування починає диференціюватися. На користь такого припущення опосередковано свідчать зміни морфометричних показників клітин на 37-у добу культивування.

Середні значення площі перерізу TGF-β1-негативних та позитивних клітин у культурі фетального мозку збільшувались у порівнянні з показниками на 2-у добу до 143,14 ± 14,59 мкм² (p = 0,000006)

та $54,03 \pm 8,57$ мкм² ($p = 0,04$) відповідно і значуще відрізнялись між собою ($p = 0,00003$, U-критерій Манна-Уїтні). Середні значення площі перерізу ядра TGF- β 1-негативних та позитивних клітин у культурі фетального мозку відповідно дорівнювали $26,62 \pm 1,05$ мкм² та $18,43 \pm 2,83$ мкм² ($p = 0,03$ у порівнянні між позитивними і негативними клітинами; $p = 0,000006$, $p = 0,14$ у порівнянні з відповідними показниками на 2-у добу, U-критерій Манна-Уїтні). Ядерно-цитоплазматичне співвідношення у TGF- β 1-позитивних клітинах культури фетального мозку ($0,58 \pm 0,11$) було вищим за показник негативних клітин ($0,25 \pm 0,03$, $p = 0,004$, U-критерій Манна-Уїтні). Отже, через місяць культивування розміри клітин у культурах фетального головного мозку щура (E14) збільшувались порівняно з 2-ю добою культивування; розміри TGF- β 1-позитивних клітин, а також їх ядер у культурах були меншими за розміри TGF- β 1-негативних клітин.

Таким чином, наше дослідження показало, що культури нейрогенних клітин фетального головного мозку щура (E14) містили в середньому 22 % клітин, що експресували TGF- β 1; через місяць культивування експресія TGF- β виявлялась в середньому у 15 % клітин в культурі. Тобто певна частина клітин фетального мозку зберігала експресію TGF- β протягом місячного терміну культивування у стандартних умовах.

Як наведено вище, в окремих роботах наявні дані щодо експресії TGF- β 1 клітинами фетального мозку [18, 24-26]. Щодо біологічної ролі TGF- β 1 вважається, що у фізіологічних умовах він відіграє важливу роль на всіх етапах онтогенезу: протягом ембріо-, морфогенезу, у підтриманні гомеостазу сформованих тканин [13, 18]. Припускають, що ізоформи ростового фактору TGF- β 1-3 протягом ембріогенезу свавців працюють як за паракринним, так і за аутокринним механізмом; регулюють диференціацію (стимулюючи чи пригнічуючи, залежно від типу клітин), стимулюють утворення екстрацелюлярного матриксу, виступають хемоаттрактантом для певних клітин, а також

індукують формування мезодерми протягом раннього розвитку [18]. У зрілому мозку TGF- β 1 експресується у значних кількостях, регулюючи нейрогенез [30]. Показано, що TGF- β 1 є потужним інгібітором проліферації НПК *in vitro* [31] та сприяє віковому зниженню проліферації НПК субвентрикулярної зони мозку *in vivo* [32].

Проте увага переважної більшості дослідників до TGF- β пов'язана саме з його контроверсійною роллю при онкологічних процесах. Відомо, що TGF- β -сигналінг залучається в регуляцію проліферації, диференціації та виживання або апоптозу [14], модулює ухилення від імунного контролю [16, 19-21], є сильним інгібітором проліферації імунних клітин [16, 22]. Експресія ізоформ TGF- β значно зростає в гліомах з високим ступенем злоскісності [11-16], сприяючи униканню пухлиною імунного розпізнавання за допомогою різних механізмів, у тому числі інгібування CD8⁺ ЦТЛ і природних кілерів [23] та стимулювання генерації T-регуляторних клітин.

Як зазначалось, елементи TGF- β -сигналінгу вважаються потенційними мішенями для терапії пухлин [11-16, 33]. У той же час розробляються підходи із застосуванням НСК/НПК для лікування гліом головного мозку [1-8]. У попередніх дослідженнях нами продемонстровано деякі аспекти протипухлинних та імуномодулюючих властивостей нейрогенних клітин фетального мозку, і, зокрема, продукованих ними гуморальних факторів (супернатант НПК щура) [34-36]. Оскільки в даній роботі нами підтверджено наявність експресії TGF- β 1 у частини нейрогенних клітин фетального головного мозку та з огляду на ймовірний паракринно-аутокринний механізм його дії [18], на нашу думку, не виключено, що саме фракція TGF- β 1-позитивних клітин є носієм протипухлинних та імуномодулюючих властивостей НПК та може знайти своє застосування у розробці способів клітинної терапії гліом головного мозку. Вважаємо, що перспективними є подальші дослідження ролі TGF- β 1 у протипухлинних та імуномодулюючих ефектах НПК щура.

ВИСНОВКИ

Встановлено наявність експресії TGF- β 1 у частини нейрогенних клітин фетального мозку щура (E14) *in vitro*, яка зберігалась протягом 5 тижнів культивування.

Виявлено значущі кількісні відмінності морфометричних показників TGF- β 1-позитивних та негативних клітин фетального мозку щура (E14) *in vitro* в динаміці.

СПИСОК ЦИТОВАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Neural Stem Cell–Mediated Enzyme/Prodrug Therapy for Glioma: Preclinical Studies [Text] / K. S. Aboody, J. Najbauer, M. Z. Metz, et al. // Sci. Transl. Med. – 2013. – Vol. 5, № 184. – P. 184-189.
2. Bovenberg M. S. Advances in stem cell therapy against gliomas [Text] / M. S. Bovenberg, M. H. Degeling, B. A. Tannous // Trends Mol Med. – 2013. – Vol. 19, № 5. – P. 281-291.
3. Analysis of glioblastoma tumor coverage by oncolytic virus-loaded neural stem cells using MRI-based tracking and histological reconstruction [Text] / R. A. Morshed, M. Gutova, J. Juliano, et al. // Cancer Gene Therapy. – 2015. – Vol. 22. – P. 55-61.
4. Stem cell therapeutics for cancer [Text] / Shah Kh. (ed.). // Wiley Blackwell, 2013 – 304 p.
5. Kim S. U. Neural stem cell-based gene therapy for brain tumors [Text] / S. U. Kim // Stem Cell Rev. – 2011. – Vol. 7, № 1. – P. 130-140.
6. The homing and inhibiting effects of hNSCs-BMP4 on human glioma stem cells [Text] / S. Liu, F. Yin, M. Zhao, et al. // Oncotarget. – 2016. – Vol. 7, № 14. – P. 17920-17931.
7. Namba H. Use of genetically engineered stem cells for glioma therapy [Text] / H. Namba, H. Kawaji, T. Yamasaki // Oncol Lett. – 2016. – Vol. 11, № 1. – P. 9-15.
8. Maintaining and loading neural stem cells for delivery of oncolytic adenovirus to brain tumors [Text] / A. U. Ahmed, I. V. Ulasov, R. W. Mercer, et al. // Methods Mol Biol. – 2012. – Vol. 797. – P. 97-109.
9. Sanai N. Neural stem cells and the origin of gliomas [Text] / N. Sanai, A. Alvarez-Buylla, M. S. Berger // N Engl J Med. – 2005. – Vol. 353, № 8. – P. 811-822.
10. Shervington A. Expression of multidrug resistance genes in normal and cancer stem cells [Text] / A. Shervington, C. Lu // Cancer Invest. – 2008. – Vol. 26, № 5. – P. 535-542.
11. Systemic inhibition of transforming growth factor-beta in glioma-bearing mice improves the therapeutic efficacy of glioma-associated antigen peptide vaccines [Text] / R. Ueda, M. Fujita, X. Zhu, et al. // Clin Cancer Res. – 2009. – Vol. 15, № 21. – P. 6551-6559.
12. Massively parallel signature sequencing and bioinformatics analysis identifies up-regulation of TGFB1 and SOX4 in human glioblastoma [Text] / B. Lin, A. Madan, J.-G. Yoon, et al. // PLoS ONE. – 2010. – Vol. 5, № 4 – P. 1-12.

13. *Calone I.* Inhibition of TGF- β signaling and its implications in anticancer treatments [Text] / *I. Calone, S. Souchelnytskyi* // *Exp Oncol.* – 2012. – **Vol. 34, № 1.** – P. 9-16.
14. *Kaminska B.* TGF beta signaling and its role in glioma pathogenesis [Text] / *B. Kaminska, M. Kocyk, M. Kijewska* // *Adv Exp Med Biol.* – 2013. – **Vol. 986.** – P. 171-187.
15. Correlation between TSP-1, TGF- β and PPAR- γ expression levels and glioma microvascular density [Text] / *J. Zhang, W. Yang, D. Zhao, et al.* // *Oncol Lett.* – 2014. – **Vol. 7, № 1.** – P. 95-100.
16. Transforming growth factor- β pathway activity in glioblastoma [Text] / *K. Frei, D. Gramatzki, I. Tritschler, et al.* // *Oncotarget.* – 2015. – **Vol. 6, № 8.** – P. 5963-5977.
17. *Dubrovskaya A. M.* Low-density microarray analysis of TGF β 1-dependent cell cycle regulation in human breast adenocarcinoma MCG7 cell line [Text] / *A. M. Dubrovskaya, S. S. Souchelnytskyi* // *Biopolymers and Cell.* – 2014. – **Vol. 30, № 2.** – P. 107-117.
18. Immunohistochemical localization of TGF β 1, TGF β 2, and TGF β 3 in the mouse embryo: expression patterns suggest multiple roles during embryonic development [Text] / *R. W. Pelton, B. Saxena, M. Jones, et al.* // *J Cell Biol.* – 1991. – **Vol. 15, № 4.** – P. 1091-1105.
19. TGF β 1 promotes motility and invasiveness of glioma cells through activation of ADAM17 [Text] / *Y. Lu, F. Jiang, X. Zheng, et al.* // *Oncol Rep.* – 2011. – **Vol. 25, № 5.** – P. 1329 - 1335.
20. The cancer stem cell subtype determines immune infiltration of glioblastoma [Text] / *C. P. Beier, P. Kumar, K. Meyer, et al.* // *Stem Cells and Dev.* – 2012. – **Vol. 21, № 15.** – P. 2753 – 2761.
21. Interleukin-1 β and transforming growth factor- β cooperate to induce neurosphere formation and increase tumorigenicity of adherent LN-229 glioma cells [Text] / *L. Wang, Z. Liu, S. Balivada, et al.* // *Stem Cell Research & Therapy.* – 2012. – **Vol. 3, № 5.** – P. 1-16.
22. *Mints M.* Impact of combinations of EGF, TGF β , 17 β -oestradiol, and inhibitors of corresponding pathways on proliferation of breast cancer cell lines [Text] / *M. Mints, S. Souchelnytskyi* // *Exp Oncol.* – 2014. – **Vol. 36, № 2.** – P. 67 – 71.
23. TGF β downregulates the activating receptor NKG2D on NK cells and CD8+ T cells in glioma patients [Text] / *C. A. Crane, S. J. Han, J. J. Barry, et al.* // *Neuro-Oncology.* – 2009. – **Vol. 12, № 1.** – P. 7-13.
24. Expression of cytokines by multipotent neural progenitor cells [Text] / *H. J. Klassen, K. L. Imfeld, I. I. Kirov, et al.* // *Cytokine.* – 2003. – **Vol. 22, № 3-4.** – P. 101-106.
25. Neural progenitor cell lines inhibit rat tumor growth *in vivo* [Text] / *K. Staffin, G. Honeth, S. Kalliomaki, et al.* // *Cancer Res.* – 2004. – **Vol. 64, № 15.** – P. 5347-5354.
26. Human neural stem/progenitor cells derived from embryonic stem cells and fetal nervous system present differences in immunogenicity and immunomodulatory potentials *in vitro* [Text] / *J. Liu, C. Götherström, M. Forsberg, et al.* // *Stem Cell Res.* – 2013. – **Vol. 10, № 3.** – P. 325-337.
27. Руководство по культивированию нервной ткани. Методы. Техника. Проблемы [Текст] / *В. П. Божкова, П. Д. Брежестовский, В. П. Буравлев, и др.* // М.: Наука, 1988. – 388 с.
28. *Encinas J. M.* Identifying and quantitating neural stem and progenitor cells in the adult brain [Text] / *J. M. Encinas, G. Enikolopov* // *Methods Cell Biol.* – 2008. – **Vol. 85.** – P. 243-272.
29. *Robertson M. J.* Neural stem cell engineering: directed differentiation of adult and embryonic stem cells into neurons [Text] / *M. J. Robertson, P. Gip, D. V. Schaffer* // *Front Biosci.* – 2008. – **Vol. 13.** – P. 21-50.
30. Impaired TGF- β induced growth inhibition contributes to the increased proliferation rate of neural stem cells harboring mutant p53 [Text] / *P. Kumar, U. Naumann, L. Aigner, et al.* // *Am J Cancer Res.* – 2015. – **Vol. 5, № 11.** – P. 3436-3445.
31. TGF β lengthens the G1 phase of stem cells in aged mouse brain [Text] / *M. Daynac, J. R. Pineda, A. Chicheportiche, et al.* // *Stem Cells.* – 2014. – **Vol. 32, № 12.** – P. 3257-3265.
32. Vascular-derived TGF- β increases in the stem cell niche and perturbs neurogenesis during aging and following irradiation in the adult mouse brain [Text] / *J. R. Pineda, M. Daynac, A. Chicheportiche, et al.* // *EMBO Mol Med.* – 2013. – **Vol. 5, № 4.** – P. 548-562.
33. *Bryukhovetskiy I.* Molecular mechanisms of the effect of TGF- β 1 on U87 human glioblastoma cells [Text] / *I. Bryukhovetskiy, V. Shevchenko* // *Oncol Lett.* – 2016. – **Vol. 12, № 2.** – P. 1581-1590.
34. *Liubich L. D.* Influence of rat progenitor neurogenic cells supernatant on glioma 101.8 cells *in vitro* [Text] / *L. D. Liubich, V. M. Semenova, L. P. Stayno* // *Biopolymers and Cell.* – 2015. – **Vol. 31, № 3.** – P. 200-208.
35. Dynamics of CD133+ cells in cultures of glioma C6 and fetal rat brain under the neurogenic cells supernatant influence [Text] / *L. D. Liubich, N. I. Lisyany, V. M. Semenova, et al.* // *Cell and Organ Transplantation.* – 2015. – **Vol. 3, № 2.** – P. 151-154.
36. *Любич Л. Д.* Вплив супернатанта прогеніторних нейроклітин на цитотоксичну функцію лімфоцитів у щурів з гліомою [Текст] / *Л. Д. Любич, М. І. Лісяний* // *Фізіол журн.* – 2015. – **Т. 61, № 4.** – С.70-77.



СТАТТЯ НА САЙТІ
TRANSPLANTOLOGY.ORG

Автори підтверджують відсутність можливих конфліктів інтересів.

Надійшла до редакції 14.09.2016 р.

Прийнята до друку 05.11.2016 р.