

Л. Д. ЛЮБИЧ<sup>1</sup>, В. М. СЕМЕНОВА<sup>1</sup>, Т. А. МАЛИШЕВА<sup>1</sup>, Л. П. СТАЙНО<sup>1</sup>,  
В. В. ВАСЛОВИЧ<sup>1</sup>

## ВПЛИВ СУПЕРНАТАНТА ФЕТАЛЬНИХ НЕЙРОГЕННИХ КЛІТИН НА ПРОЛІФЕРАТИВНУ АКТИВНІСТЬ У КУЛЬТУРІ КЛІТИН ГЛІОМИ С6

Надійшла 10.09.15

Оцінювали вплив супернатанта фетальних нейрогенних клітин (ФНК) щура на проліферативну активність культивованих клітин гліоми мозку щура (клітинна лінія С6). Супернатант ФНК отримували із суспензії клітин мозку плодів щура на 14-ту добу гестації (Е14). До культурального середовища експериментальних культур додавали 0.10 мг/мл супернатанта та інкубували 48 год. Імуноцитохімічне забарвлення щодо маркера проліферації Ki-67 проводили з використанням кролячих моноклональних антитіл до цього протеїну. Після інкубації в присутності супернатанта ФНК у культурах клітин гліоми С6 з'являлися дегенеративні та некробіотично змінені пухлинні клітини із заокругленими цитоплазматичними тілами та редукцією відростків. В умовах дії ФНК порівняно з контрольними спостереженнями середня щільність клітин у 10 тест-полях зору в експериментальних культурах (0.04 мм<sup>2</sup>) ставала вірогідно меншою, ніж у контролі (332.0 ± 36.0 проти 569.5 ± 70.5;  $P = 0.00026$ ); середнє значення ядерно-цитоплазматичного співвідношення в пухлинних клітинах було дещо (невірогідно) зниженим – 0.28 ± 0.01 проти 0.32 ± 0.02 ( $P = 0.64$ ), а частка клітин із множинними ядерцями – більш ніж удвічі меншою – 3.53 ± 0.33 і 7.97 ± 0.25 % ( $P = 0.053$ ). Індекс мітозу культивованих пухлинних клітин, підданих впливу супернатанта, ставав вчетверо нижчим (1.10 ± 0.04 і 4.90 ± 0.09 %;  $P = 0.009$ ), а частка пухлинних клітин, імунопозитивних щодо Ki-67, зменшувалась з 27.86 ± 2.91 до 10.47 ± 0.91 % ( $P = 0.0015$ ). Спостережуваний антипроліферативний ефект супернатанта ФНК свідчить на користь можливості та доцільності розробки комплексної патогенетичної терапії злоякісних пухлин мозку із застосуванням препаратів, отриманих із ФНК.

**КЛЮЧОВІ СЛОВА:** культури клітин гліоми С6, супернатант фетальних нейрогенних клітин (ФНК), маркер проліферації Ki-67, індекс мітозу (ІМ), індекс проліферації (ІП).

### ВСТУП

Незважаючи на постійне вдосконалення методів діагностики і лікування злоякісних пухлин головного мозку, захворюваність на такі новоутворення в Україні в 2013 р. за даними Національного канцер-реєстру становила 5.6 на 100 тисяч населення, а смертність – 3.9 % [1]. Найчисленнішу групу серед пухлин ЦНС складають гліоми; найбільш злоякісними варіантами останніх є гліобластоми. Лікування гліобластом зараз базується на хірургічних

втручаннях, променевої терапії та хіміотерапії; починають застосовуватися деякі новітні технології [2]. Незважаючи на певний прогрес, середній термін життя пацієнтів після діагностування гліобластоми (медіана відповідного розподілу) на даний час становить близько 15 місяців, а проградієнтний перебіг захворювання є майже неминучим. У зв'язку з цим у нейроонкології сьогодні активно розробляється новий напрямок – персоналізована, або цілеспрямована (таргетна), специфічна терапія гліом. Вона базується на пошуку певних прийомів лікування для кожного пацієнта на основі виявлення унікального набору молекулярних змін (геномних та епігеномних мутацій) у клітинах пухлини із застосуванням молекулярних маркерів [3], що підвищує ефективність лікувальних схем. Одним із

<sup>1</sup>ДУ «Інститут нейрохірургії ім. акад. А. П. Ромоданова НАМН України», Київ (Україна).

Ел. пошта: lyubichld@gmail.com (Л. Д. Любич);  
seveme22@rambler.ru (В. М. Семенова);  
morpho.neuro@gmail.com (Т. А. Малишева).

загальновизначених маркерів злякисних клітин є маркер проліферації Ki-67, який характеризує здатність клітин новоутворення до безконтрольного поділу (саме це й зумовлює їх біологічну агресивність).

У дослідженнях механізмів канцерогенезу в головному мозку зараз широко використовуються первинні та дисоційовані культури клітин, отримані з різних гістологічних варіантів відповідних пухлин. Застосування таких моделей відкриває певні перспективи для теоретичного обґрунтування нових підходів у лікуванні цих нейроонкологічних захворювань [4]. Первинна культура гліальних пухлин є загальновизнаною адекватною моделлю для кількісної оцінки реакцій пухлинних клітин на прямий вплив різних антибластичних чинників.

Одним із сучасних підходів у лікуванні гліом, що зараз інтенсивно розробляється, є використання нейрогенних стовбурових та прогеніторних клітин (НСК/НПК) [5–9]. Виявилось, що НПК у мишей та щурів демонструють певні протипухлинні властивості [10–14], проте механізми такої дії поки залишаються нез'ясованими. Згідно з даними попередніх досліджень, клітини нервової системи плодів щурів 18–20-ї доби гестації (фетальні клітини ЦНС) здатні пригнічувати клітини експериментальної гліоми 101.8 в умовах як *in vitro* [15, 16], так і *in vivo* (при гетеротрансплантації під капсулу нирки мишей) [15]. В експериментах *in vivo* було показано протипухлинний вплив супернатанта фетальних клітин мозку щура 14–16-ї доби гестації у щурів із гліомою 101.8 [17].

У нашій роботі ми оцінювали вплив супернатанта фетальних нейрогенних клітин (ФНК) щура на проліферативну активність культивованих клітин гліоми щура С6.

## МЕТОДИКА

Матеріалом для культивування слугували клітини гліоми головного мозку щурів (клітинна лінія С6). Зразки було отримано від «Клітинного банку ліній тканин людини та тварин» Інституту експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р. Є. Кавецького НАН України (Київ). Досліджували контрольні культури, утримувані в стандартних умовах культивування без впливу супернатанта ФНК ( $n = 8$ ), та культури, піддані впливу 0.10 мг/мл цього супернатанта протягом 48 год культивування ( $n = 8$ ).

Супернатант ФНК отримували із суспензії нейрогенних клітин мозку щура на 14-ту добу гестації (E14). Зразки нативної тканини мозку щура, отримані в зазначені строки, звільняли у фізіологічному розчині від оболонок, переносили в середовище DMEM («Sigma», ФРН) і диспергували за допомогою шприца з товстою голкою. Клітини осаджували із суспензії, застосовуючи центрифугування протягом 5 хв при 1500 об./хв, відмивали в середовищі DMEM, до осаду клітин додавали свіже середовище DMEM та піддавали цей осад ресуспендуванню. Життєздатність клітин у суспензії визначали за допомогою стандартного цитотоксичного тесту з 0.2 %-вим трипановим синім («Merck», ФРН). Концентрацію клітин доводили до  $6.0 \cdot 10^6$  мл<sup>-1</sup>, до отриманої клітинної суспензії додавали мітоген конканавалін А (0.10 мг/мл) та утримували протягом 2 год в інкубаторі (температура  $37.0 \pm 0.5$  °C, вологість 95 %, вміст CO<sub>2</sub> 5 %). Після інкубації клітини осаджували за допомогою центрифугування протягом 5 хв при 1500 об./хв та відмивали в середовищі DMEM. До осаду клітин додавали свіже середовище DMEM, ресуспендували та інкубували протягом 24 год. Після такої інкубації клітини повторно осаджували, застосовуючи центрифугування протягом 5 хв при 1500 об./хв, відбирали отриманий супернатант, визначали в ньому концентрацію білка, стандартизували до концентрації останнього 0.1 мг/мл, аліквотизували і зберігали при  $-20 \pm 0.5$  °C.

Для отримання первинних культур зразки клітин гліоми С6, що вміщували 10<sup>6</sup> одиниць, висівали на покривні адгезивні скельця, вкриті поліетиленіміном («Sigma», ФРН). Скельця вміщували в чашки Петрі. Культуральне середовище складалось із суміші середовища 199 та DMEM (1:1) з додаванням 10 % ембріональної телячої сироватки, 400 мг% глюкози та 0.2 од/мл інсуліну. Культури клітин тримали у вуглекислотному інкубаторі (37 °C, вологість 95 %, вміст CO<sub>2</sub> 5 %) та прижиттєво спостерігали з використанням інвертованого мікроскопа «Eclips TS 100» (Японія).

Для дослідження впливу супернатанта ФНК на первинні культури відбирали культури з рівномірною зоною росту ( $n = 8$ ), додавали до культурального середовища 0.10 мг/мл супернатанта та інкубували протягом 48 год. Культури фіксували 10 %-вим формаліном і піддавали цитологічному та імуноцитохімічному аналізу. Для цитологічного дослідження культури забарвлювали

гематоксиліном Караччі.

Імуноцитохімічне забарвлення щодо маркера проліферації Ki-67 проводили з використанням кролячих моноклональних антитіл до цього маркера ("Thermo Scientific", США) та системи детекції Ultra Vision Quanto Detection System HRP DAB Chromogen ("Thermo Scientific", США) згідно з попередньо відпрацьованою методикою. Для цього фіксовані клітини культури регідрували; температурне «демаскування» антигенів проводили за допомогою нагрівання зразків у цитратному буфері (0.01 M, pH 6.0) на водяній бані (95–99 °C) протягом 20 хв. Потім скельця з клітинами охолоджували при кімнатній температурі протягом 20 хв і перенесли у фосфатний буфер (0.01 M, pH 6.0) на 5 хв. Для блокування ендогенної пероксидази скельця з культурами інкубували 10 хв у темряві з 3 %-вим розчином  $H_2O_2$ , після чого промивали 5 хв у фосфатному буфері, а для блокування неспецифічного фонового забарвлення – інкубували 5 хв з реагентом Ultra V block ("Thermo Scientific", США). Після промивання у буфері на скельця наносили кролячі моноклональні антитіла до Ki-67 ("Thermo Scientific", США) у розведенні 1:100 та інкубували 20 хв при кімнатній температурі. Подальше забарвлення здійснювали із застосуванням стандартної системи візуалізації Ultra Vision Quanto ("Thermo Scientific", США). Після промивання дистильованою водою культури додатково забарвлювали гематоксиліном Майєра і заключали в бальзам. Паралельно проводили постановку позитивного і негативного ( $n = 8$ ) контролів.

Мікроскопічне дослідження та фотореєстрацію цитологічних препаратів первинних культур здійснювали з використанням світлооптичного фотомікроскопа AxioPhot ("OPTON", ФРН) з об'єкт-мікрометром "Carl Zeiss" (ФРН). Визначення кількісних характеристик контрольних культур та культур, підданих дії супернатанта, проводили в 10 тест-полях зору, застосовуючи стандартну вимірювальну шкалу (об'єкт-мікрометр). Оцифровані зображення клітин аналізували з використанням комп'ютерного аналізатора зображень CAI-01ABH „SELMI” (Україна) та програмного забезпечення «Karra opto-electronics GmbH» (ФРН). Цитологічний аналіз включав у себе визначення індексу мітозу (ІМ) та індексу проліферації (ІП). У перебігу морфометричного аналізу в 10 довільно вибраних тест-полях зору (0.04 мм<sup>2</sup>) для кожного зразка при однаковому збільшенні ( $\times 800$ ) підраховували середню кількість клітин у межах

тест-поля (щільність), середні площі перерізів ядер клітин і перерізів цитоплазми у тест-полі та кількість ядерців в ядрах клітин. Значення ядерно-цитоплазматичного відношення встановлювали як результат поділу площі перерізу ядер на площу перерізу цитоплазми.

Підрахунок випадків мітозів виконували в трьох спостереженнях культур кожного зразка також у 10 випадково вибраних полях зору мікроскопа ( $\times 800$ ). У кожному вимірюванні підраховували не менше 1000 клітин та визначали ІМ як нормовану кількість клітин з проявами мітозу (%) щодо загальної кількості клітин, прийнятої за 100 %.

Кількість Ki-67-імунопозитивних та негативних клітин також визначали в 10 довільно вибраних полях зору для кожного зразка при однаковому збільшенні ( $\times 800$ ); ІП вираховували як нормовану кількість Ki-67-імунопозитивних клітин (%), приймаючи загальну кількість клітин за 100 %.

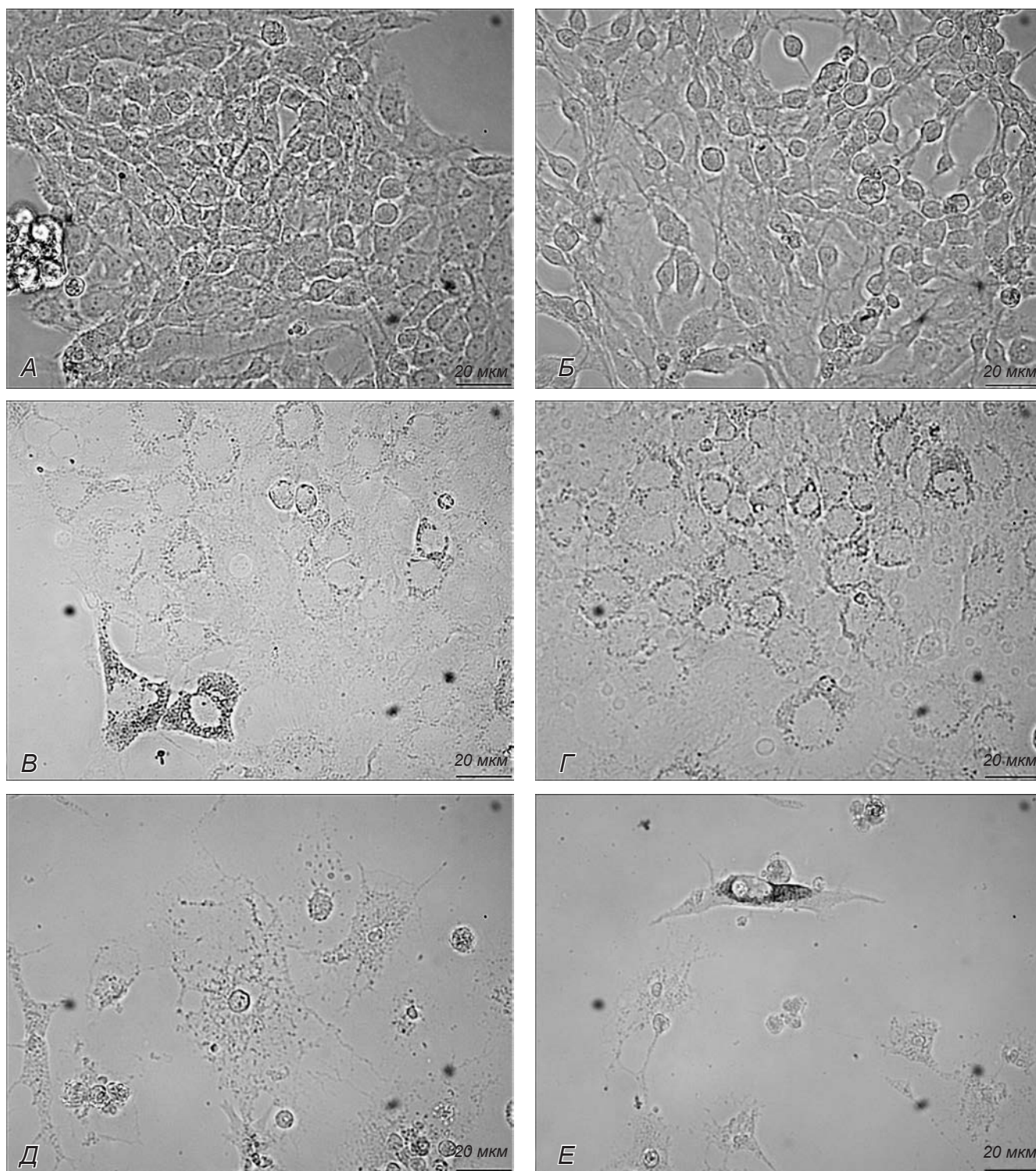
Статистичну обробку даних проводили з використанням пакета статистичних програм «Statistica 6.0» (програмне забезпечення StatSoft Inc., США, 2003). Застосовували параметричні ( $t$ -критерій Ст'юдента та двовибірковий  $t$ -тест із різними дисперсіями) та непараметричні (критерій Манна-Уїтні для порівняння незалежних груп) методи варіаційної статистики. Нормальність розподілу даних визначали за критерієм Шапіро-Уїлка. Статистично значущими вважали відмінності при  $P < 0.05$ .

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

*Контрольні первинні культури гліоми С6 головного мозку щурів.* Протягом перших діб культивування в мікроексплантаті спостерігалися розростання пухлинних клітин недиференційованого фенотипу. Для них були характерними невелика площа перерізу цитоплазми та ядра з помірними проявами атиповості (рис. 1, А). В препаратах були наявними ущільнені клітинні мікроагрегати, розділені моношаровими ділянками клітин астроцитарного фенотипу з вираженими відростками, які утворювали ретикулярні структури (Б). Серед клітин з проявами мітозу зустрічалися патологічні форми цього процесу, що є характерною властивістю злоякісних пухлин головного мозку.

У подальші строки спостереження (четверта–шоста доби) в культурах гліоми С6 виявлялося розривлення клітинних мікроагрегатів. Серед клітин пере-





**Рис. 1.** Морфологія культивованих клітин гліоми С6 та вплив на неї супернатанта фетальних нейрогенних клітин – ФНК (світлова мікроскопія, живі незабарвлені культури).

На *A* – друга доба, контроль. Множинні багаточарові мікроагрегати. На *Б* – третя доба, контроль. Утворення сіткоподібних структур клітинами астроцитарного фенотипу. На *В – Е* – після інкубації із 0.10 мг/мл супернатанта ФНК протягом 48 год (*В* – дистрофовані пухлинні клітини, клітини-тіні; *Г* – клітини-тіні; *Д* – редукція відростків; *Е* – дифузно розташовані окремі пухлинні клітини з наявністю відростків).

важали пухлинні одиниці астроцитарного фенотипу уніполярної, трикутної або ромбоподібної форми з довгими поодинокими відростками, які формували ретикулярну структуру. У недиференційованих пухлинних клітинах середнє значення ІМ складало  $4.90 \pm 0.01$  %.

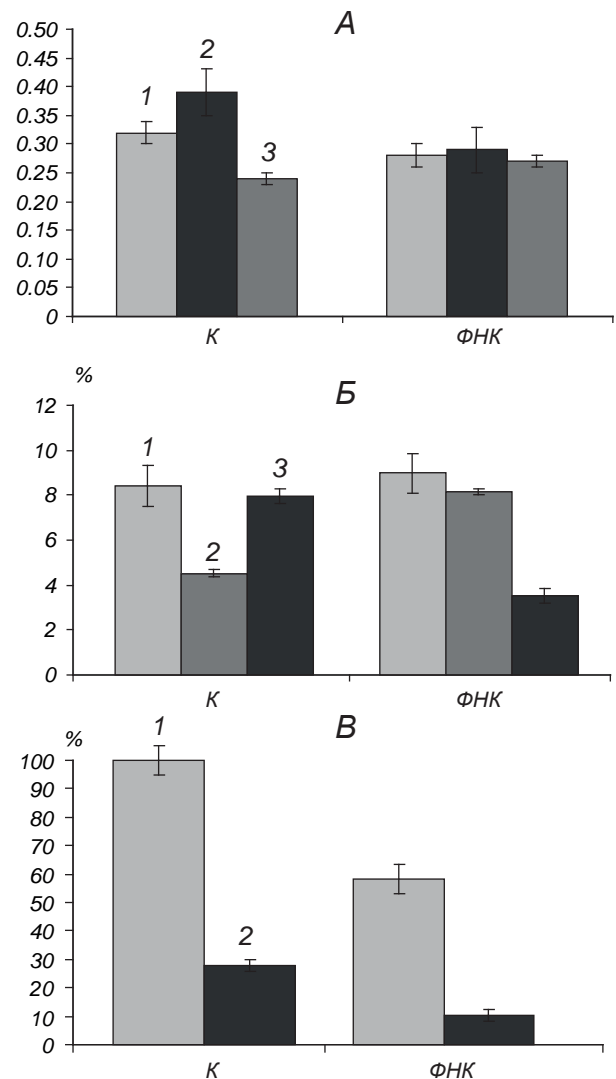
На восьму-дев'яту добу культивування щільність монокультури зменшувалася внаслідок десквамації спонтанно загиблих пухлинних клітин; при цьому з'являлася значна кількість апоптозних тілець. Дані процеси охоплювали переважну кількість клітин зони активного росту, за виключенням окремих ділянок ретикулярних структур та клітинних сфероїдних мікроагрегатів. Останні були оточені моношаровими розростаннями недиференційованих клітин.

Для дослідження впливу супернатанта ФНК на п'яту-шосту добу відбирали культури з рівномірною зоною росту. Морфометричний аналіз таких препаратів культур у цей термін показав, що середня кількість клітин у 10 довільно вибраних полях зору ( $0.04 \text{ мм}^2$ ) становила  $569.5 \pm 70.5$ , а середнє значення ядерно-цитоплазматичного співвідношення у пухлинних клітинах дорівнювало  $0.32 \pm 0.02$  (рис. 2, А). Частка клітин, в ядрах яких візуалізувалося одне ядрець, становила  $8.44 \pm 0.91$ . Клітини з двома ядрецями склали в середньому  $4.53 \pm 0.16$ , а з трьома і більше –  $7.97 \pm 0.25$  % (Б). Як відомо, наявність ядрець корелює з активністю синтетичних транскрипційних і трансляційних процесів в ядрі; мультиплікація ядрець є характерною ознакою злоякісних гліом [18].

Частка пухлинних клітин, імунопозитивних щодо Ki-67 (ІП), становила в середньому  $27.86 \pm 2.91$  % (рис. 2, В, 3). Ядерно-цитоплазматичне співвідношення у проліферуючих (Ki-67-імунопозитивних) клітинах статистично високозначуще перевищувало цей показник у Ki-67-імунонегативних клітинах ( $0.39 \pm 0.04$  порівняно з  $0.24 \pm 0.02$ ;  $P = 0.0070$ ).

Таким чином, у стандартних умовах культивування клітини гліоми С6 головного мозку щурів виявляли високу проліферативну активність. У монокультурі переважала популяція клітин недиференційованого фенотипу. В той же час частина пухлинних клітин демонстрували морфологічні ознаки астроцитарного диференціювання, що є підтвердженням астроцитарного походження гліоми С6 щурів.

*Дослідження впливу супернатанта ФНК на первинні культури гліоми С6.* Через 48 год інкубації культур гліоми С6 із супернатантом ФНК (Е14)

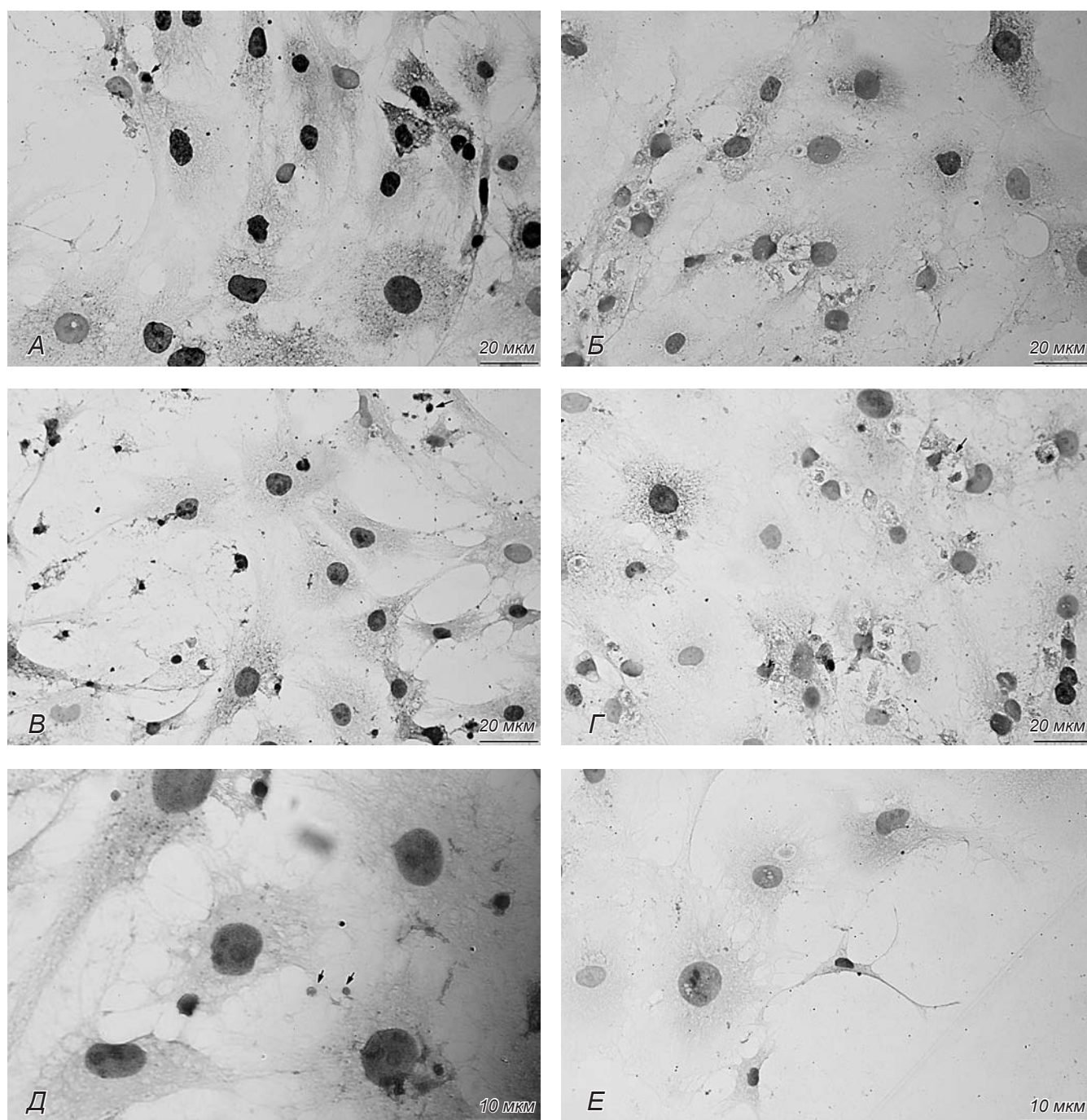


**Р и с. 2.** Кількісні показники первинних культур гліоми С6 у контролі (К) та в умовах впливу 0.10 мг/мл супернатанта фетальних нейрогенних клітин протягом 48 год.

А – ядерно-цитоплазматичне співвідношення в клітинах загальної популяції (1), Ki-67-позитивних (2) і Ki-67-негативних (3) клітинах. Б – нормована кількість клітин з одним (1), двома (2) та трьома і більше (3) ядрецями в ядрі. В – нормована щільність клітин (кількість клітин у тест-полі зору): 1 – загальна щільність (даний показник у контролі прийнято за 100 %); 2 – щільність Ki-67-позитивних клітин.

у концентрації 0.10 мг/мл у зоні росту культур з'являлися дистрофічно або некробіотично змінені пухлинні клітини із заокругленими цитоплазматичними тілами та гіперхромними ядрами, а також значна кількість клітин-тіней (рис. 1, В, Г). Щільність клітинного моношару ставала меншою, а частка пухлинних клітин з ознаками руйнування





**Р и с. 3.** Морфологічні зміни у первинних культурах гліоми С6 під впливом супернатанта фетальних нейрогенних клітин (імуноцитохімічне забарвлення щодо Ki-67 із дозбарвленням гематоксилином Майєра).

*А, В, Д* – контроль; *Б, Г, Е* – після інкубації із 0.10 мг/мл супернатанта протягом 48 год. Стрілками вказані апоптозні тільця.

(редукція відростків, заокруглення цитоплазматичних тіл) – більшою (*D*). Пухлинні клітини внаслідок дистрофічних змін та руйнування цитоплазми набували вигляду «голих» ядер. У той же час у препаратах були присутні окремі пухлинні клітини з поодинокими короткими ущільненими відростками (*E*). Середній ІМ ( $1.10 \pm 0.04$  %) був вірогідно нижчим порівняно з контролем ( $P = 0.009$ ).

Результати морфометричного аналізу препаратів дослідних культур у цей термін та порівняння з контролем показали, що в умовах впливу супернатанта середня кількість клітин у 10 довільно вибраних полях зору ( $0.04 \text{ мм}^2$ ) ставала статистично високозначуще меншою ( $332.0 \pm 36.0$ ;  $P = 0.00026$ ). Середній показник ядерно-цитоплазматичного співвідношення в пухлинних клітинах дещо (невірогідно) знижувався ( $0.28 \pm 0.01$ ;  $P > 0.05$ ; рис. 2, *A*). Частка клітин, в яких візуалізувалося одне ядро, становила  $8.97 \pm 0.26$  % ( $P = 0.068$  порівняно з контролем). Клітини з двома ядрами склали в середньому  $8.15 \pm 0.16$  % ( $P = 0.28$  порівняно з контролем), а кількість клітин з трьома ядрами і більше ставала меншою ( $3.53 \pm 0.33$  %;  $P = 0.053$  порівняно з контролем; *B*). Такі зміни свідчать про певне зниження інтенсивності синтетичних транскрипційних і трансляційних процесів в ядрах пухлинних клітин в умовах впливу ФНК.

Середній ІП під впливом супернатанта ФНК став статистично високозначуще меншим ( $10.47 \pm 0.91$  %;  $P = 0.0015$  порівняно з контролем) (рис. 2, *B*, *3*). Ядерно-цитоплазматичне співвідношення в проліферуючих (Кі-67-імунопозитивних) клітинах у таких зразках практично не відрізнялося від цього показника в Кі-67-імунонегативних клітинах ( $0.29 \pm 0.02$  порівняно з  $0.27 \pm 0.02$ ). Одночасно, проте, виявлялася тенденція до зменшення ядерно-цитоплазматичного співвідношення в проліферуючих клітинах після впливу ФНК ( $0.29 \pm 0.02$ ) порівняно з відповідним показником у контрольних культурах ( $0.39 \pm 0.04$ ;  $P = 0.19$ ).

Отже, результати дослідження впливу на культивовані пухлинні клітини гліоми С6 супернатанта ФНК (Е14) у використаній концентрації протягом 48 год свідчать про виражений антипроліферативний ефект цього супернатанта; останній, очевидно, вміщує певні високоактивні агенти. Зокрема, відомо, що мультипотентні НПК людини, щура і миші можуть експресувати як прозапальні, так і супресорні цитокіни (IL-1a, IL-

1b, IL-6, IL-10, TGF-b1, TGF-b2, TNF-a, LIF) [19–21]. За даними наших попередніх досліджень, супернатант ФНК у своєму складі вміщує дві основні фракції білків з молекулярними масами 67 (55 %) та 46 (44 %) кДа, а також мінерні фракції, в яких визначаються BDNF, TGF-b1, IL-1b та IL-4 [22]. У зв'язку з цим ми вважаємо, що антипроліферативний ефект супернатанта ФНК зумовлений в основному відповідними властивостями TGF-b1 (регуляція проліферації, диференціації та виживання / апоптозу клітин [23–25]) та, можливо, BDNF (зв'язування з рецепторами суперродини фактора некрозу пухлин). BDNF активує внутрішньоклітинні сигнальні каскади (NF-kB, Jun-кіназу), які опосередковують ініціацію програмованої загибелі клітини, тобто апоптозу [26].

Таким чином, можна дійти висновку, що застосування первинної культури гліоми С6 головного мозку щура є адекватною моделлю для оцінки впливу супернатанта клітин фетального мозку щура на клітини вказаної пухлини. В умовах дії супернатанта ФНК у концентрації 0.10 мг/мл на такі культури протягом 48 год відбуваються зменшення загальної кількості клітин у культурі (їх щільності), зниження ядерно-цитоплазматичного співвідношення в проліферуючих клітинах, зменшення частки клітин із множинними ядрами та зниження ІМ та ІП.

Отримані результати потребують подальшого поглибленого аналізу. Проте вони вже зараз можуть стати основою для теоретичного обґрунтування комплексної патогенетичної терапії злоякісних пухлин головного мозку та для розробки препаратів із ФНК.

Зразки культур клітин гліоми головного мозку щурів були люб'язно надані нам «Клітинним банком ліній тканин людини та тварин» Інституту експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р. Є. Кавецького НАН України. Дослідження було проведено на культивованих клітинах гліоми головного мозку щурів; отже, методика експериментів не потребує підтвердження існуючим етичним стандартам для робіт на тваринах.

Автори даної роботи – Л. Д. Любич, В. М. Семенова, Т. А. Малишева, Л. П. Стайно та В. В. Васлович – стверджують про відсутність будь-яких конфліктів щодо комерційних або фінансових відносин, відносин з організаціями або особами, котрі будь-яким чином могли бути пов'язані з дослідженням, а також взаємовідносин співавторів статті.

## СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. “Рак в Україні, 2013–2014. Захворюваність, смертність, показники діяльності онкологічної служби”, *Бюл. Нац. Канцер-реєстру*, № 16, 56-57 (2015).
2. L. Ampie, E. C. Woolf, and C. Dardis, “Immunotherapeutic advancements for glioblastoma,” *Front. Oncol.*, **5**, 1-8 (2015).
3. Ch. I. Ene and E. C. Holland, “Personalized medicine for gliomas,” *Surg. Neurol. Int.*, **6**, No. 1, S89-S95 (2015).
4. Ю. А. Зозуля, И. Г. Васильева, А. Я. Главацкий и др., “Фотодинамическая терапия глиом головного мозга”, в кн.: *Глиомы головного мозга*, под ред. Ю. А. Зозули, УИПК «ЕксОб», Киев (2007), с. 495-501.
5. И. С. Брюховецкий, А. С. Брюховецкий, П. В. Мищенко и др., “Стволовые клетки в терапии злокачественных опухолей головного мозга: реальность и перспективы”, *Клин. практика*. № 4, 45-57 (2013).
6. P. Achanta, N. I. Sedora Roman, and A. Quiñones-Hinojosa, “Gliomagenesis and the use of neural stem cells in brain tumor treatment,” *Anticancer Agents Med. Chem.*, **10**, No. 2, 121-130 (2010).
7. A. U. Ahmed, I. V. Ulasov, R. W. Mercer, and M. S. Lesniak, “Maintaining and loading neural stem cells for delivery of oncolytic adenovirus to brain tumors,” *Methods Mol. Biol.*, **797**, 97-109 (2012).
8. M. S. Bovenberg, M. H. Degeling, and B. A. Tannous, “Advances in stem cell therapy against gliomas,” *Trends Mol. Med.*, **19**, No. 5, 281-291 (2013).
9. S. Ito, A. Natsume, S. Shimato, et al., “Human neural stem cells transduced with IFN-beta and cytosine deaminase genes intensify bystander effect in experimental glioma,” *Cancer Gene Ther.*, **17**, No. 5, 299-306 (2010).
10. S. U. Kim, “Neural stem cell-based gene therapy for brain tumors,” *Stem Cell Rev.*, **7**, No. 1, 130-140 (2011).
11. J. Y. Jeon, J. H. An, S. U. Kim, et al., “Migration of human neural stem cells toward an intracranial glioma,” *Exp. Mol. Med.*, **40**, No. 1, 84-91 (2008).
12. K. Stafflin, M. Lindvall, T. Zuchner, and C. Lundberg, “Instructive cross-talk between neural progenitor cells and gliomas,” *J. Neurosci. Res.*, **85**, No. 10, 2147-2159 (2007).
13. K. Stafflin, G. Honeth, S. Kalliomaki, et al., “Neural progenitor cell lines inhibit rat tumor growth *in vivo*,” *Cancer Res.*, **64**, No. 15, 5347-5354 (2004).
14. J. H. Walzlein, M. Synowitz, B. Engels, et al., “The antitumorigenic response of neural precursors depends on subventricular proliferation and age,” *Stem Cells*, **26**, No. 11, 2945-2954 (2008).
15. Н. И. Лисяный, Г. М. Олейник, О. В. Маркова и др., “Влияние клеток головного мозга на рост опухолей под капсулой почки *in vivo*”, в кн.: *Иммунная система головного мозга*, под ред. Н. И. Лисяного, ВИПОЛ, Киев (1999), с. 116-135.
16. В. М. Семенова, В. И. Цимбалюк, Л. П. Стайно и др., “Изучение противоопухолевых свойств различных популяций клеток мозга в культуре нервной ткани”, в кн.: *Иммунная система головного мозга*, под ред. Н. И. Лисяного, ВИПОЛ, Киев (1999), с. 136-146.
17. М. І. Лісяний, Л. Д. Любич та О. Г. Хохлов, “Дослідження протипухлинної дії прогеніторних нейроклітин (НК) при експериментальній гліомі головного мозку у щурів”, *Імунологія та алергологія*, № 3, 61-66 (2008).
18. В. М. Семенова, *Експериментально-морфологічна оцінка ефективності антибластическої терапії гліом головного мозгу*, Дис. ... д-ра мед. наук, Київ (1992).
19. H. J. Klassen, K. L. Imfeld, I. I. Kirov, et al., “Expression of cytokines by multipotent neural progenitor cells,” *Cytokine*, **22**, Nos. 3/4, 101-106 (2003).
20. H. C. Chen, H. I. Ma, H. K. Sytwu, et al., “Neural stem cells secrete factors that promote auditory cell proliferation via a leukemia inhibitory factor signaling pathway,” *J. Neurosci. Res.*, **88**, No. 15, 3308-3318 (2010).
21. J. Liu, C. Götherström, M. Forsberg, et al., “Human neural stem/progenitor cells derived from embryonic stem cells and fetal nervous system present differences in immunogenicity and immunomodulatory potentials *in vitro*,” *Stem Cell Res.*, **10**, No. 3, 325-337 (2013).
22. L. D. Liubich, V. M. Semenova, and L. P. Stayno, “Influence of rat progenitor neurogenic cells supernatant on glioma 101.8 cells *in vitro*,” *Biopolymers Cell*, **31**, No. 3, 200-208 (2015).
23. B. Kaminska, M. Kocyk, and M. Kijewska, “TGF beta signaling and its role in glioma pathogenesis,” *Adv. Exp. Med. Biol.*, **986**, 171-187 (2013).
24. J. Zhang, W. Yang, D. Zhao, et al., “Correlation between TSP-1, TGF- $\beta$  and PPAR- $\gamma$  expression levels and glioma microvascular density,” *Oncol. Lett.*, **7**, No. 1, 95-100 (2014).
25. A. M. Dubrovska and S. S. Souchelnytskyi, “Low-density microarray analysis of TGF $\beta$ 1-dependent cell cycle regulation in human breast adenocarcinoma MCG7 cell line,” *Biopolymers Cell*, **30**, No. 2, 107-117 (2014).
26. D. K. Binder and H. E. Scharfman, “Brain-derived neurotrophic factor,” *Growth Factors*, **22**, No. 3, 123-131 (2004).