

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ  
ДЕРЖАВНИЙ УНІВЕРСИТЕТ “КИЇВСЬКИЙ АВІАЦІЙНИЙ ІНСТИТУТ”  
ФАКУЛЬТЕТ НАУК ПРО ЗДОРОВ’Я  
КАФЕДРА БІОТЕХНОЛОГІЇ

ДОПУСТИТИ ДО ЗАХИСТУ  
Завідувач випускової кафедри

\_\_\_\_\_ Олексій БОЛДИРЄВ

“ \_\_\_\_\_ ” \_\_\_\_\_ 2025 р.

## КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА

(ПОЯСНЮВАЛЬНА ЗАПИСКА)

ЗДОБУВАЧА ВИЩОЇ ОСВІТИ ОСВІТНЬОГО СТУПЕНЯ “МАГІСТР”  
ЗІ СПЕЦІАЛЬНОСТІ 162 “БІОТЕХНОЛОГІЯ ТА БІОІНЖЕНЕРІЯ”  
ОСВІТНЬО-ПРОФЕСІЙНА ПРОГРАМА “ФАРМАЦЕВТИЧНА БІОТЕХНОЛОГІЯ”

**Тема: “ ВПЛИВ КОНДИЦІОНОВАНОГО СЕРЕДОВИЩА  
КУЛЬТИВУВАННЯ МЕЗЕНХІМАЛЬНИХ СТОВБУРОВИХ КЛІТИН З  
ЖИРОВОЇ ТКАНИНИ НА РЕГЕНЕРАТИВНІ ЗДІБНОСТІ *DANIO RERIO*”**

Виконавець: студентки групи М-162-24-1-ФБ

Владлена СТЬОБІНА

Керівник: к.б.н., доцент

Ольга МАСЛОВА

Консультант розділу “Охорона праці”:

Олександр ВАЛЬЧЕНКО

Консультант розділу “Охорона навколишнього середовища”: Лариса ЧЕРНЯК

Нормоконтролер: к.т.н., доцент

Олена КУЗНЄЦОВА

# ДЕРЖАВНИЙ УНІВЕРСИТЕТ «КИЇВСЬКИЙ АВІАЦІЙНИЙ ІНСТИТУТ»

Факультет наук про здоров'я

Кафедра біотехнології

Спеціальність 162 «Біотехнології та біоінженерія»

Освітньо-професійна програма «Фармацевтична біотехнологія»

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри

\_\_\_\_\_ Олексій БОЛДИРСЬВ

«\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2025 р.

## ЗАВДАННЯ

### З КВАЛІФІКАЦІЙНОЇ РОБОТИ

Стьобіної Владлени Олександрівни

1. Тема кваліфікаційної роботи: «Вплив кондиціонованого середовища культивування мезенхімальних стовбурових клітин з жирової тканини на регенеративні здібності *Danio rerio*» затверджена ректором від «29» серпня 2025 р. № 1606/ст.
2. Термін виконання роботи: з «1» вересня 2025 р. по «22» грудня 2025 р.
3. Вихідні дані роботи: експериментальні дані, отримані в результаті власних досліджень з оцінки впливу кондиціонованого середовища мезенхімальних стовбурових клітин, отриманих зі стромально-васкулярної фракції жирової тканини людини, на морфофункціональні показники регенерації хвостового плавця *Danio rerio*, а також результати морфометричних вимірювань та статистичної обробки даних.

4. Зміст пояснювальної записки: ВСТУП; РОЗДІЛ 1. ЛІТЕРАТУРНИЙ ОГЛЯД; РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ Й МЕТОДИ; РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ЕКСПЕРИМЕНТУ І ЇХ АНАЛІЗ; РОЗДІЛ 4. ОХОРОНА ПРАЦІ; РОЗДІЛ 5. ОХОРОНА НАВКОЛИШНЬОГО СЕРЕДОВИЩА; ВИСНОВКИ; СПИСОК БІБЛОГРАФІЧНИХ ПОСИЛАНЬ ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.

5. Перелік обов'язкового графічного (ілюстративного) матеріалу: 14 рис., 5 таблиць.

#### 6. Календарний план-графік

№ з/п	Завдання	Термін виконання	Підпис керівника
1	Остаточне формулювання теми кваліфікаційної роботи та її затвердження з науковим керівником	01.09.2025 – 05.09.2025	
2	Визначення мети, завдань, об'єкта та предмета дослідження	08.09.2025 – 10.09.2025	
3	Пошук та підбір наукових джерел за темою кваліфікаційної роботи	11.09.2025 – 18.09.2025	
4	Розробка концепції та плану кваліфікаційної роботи	19.09.2025 – 24.09.2025	
5	Систематизація та критичний аналіз літературних джерел	25.09.2025 – 01.10.2025	
6	Написання теоретичного розділу кваліфікаційної роботи	02.10.2025 – 14.10.2025	
7	Підготовка матеріалів та методів для проведення експериментального дослідження	15.10.2025 – 16.10.2025	
8	Проведення експериментальної частини дослідження	17.10.2025 – 04.11.2025	

9	Статистична обробка експериментальних даних та інтерпретація результатів	04.11.2025 – 10.11.2025	
10	Написання розділу «Результати експерименту та їх аналіз»	11.11.2025 – 20.11.2025	
11	Формулювання загальних висновків та практичних рекомендацій	21.11.2025 – 28.11.2025	
12	Оформлення кваліфікаційної роботи відповідно до вимог	29.11.2025 – 05.12.2025	
13	Перевірка роботи науковим керівником, внесення зауважень	05.12.2025 – 08.12.2025	
14	Перевірка кваліфікаційної роботи на академічну доброчесність (плагіат)	08.12.2025	
15	Підготовка доповіді та презентації до попереднього захисту	11.12.2025 – 14.12.2025	
16	Передзахист кваліфікаційної роботи	15.12.2025	
17	Усунення зауважень після попереднього захисту	16.12.2025 – 18.12.2025	
18	Подання кваліфікаційної роботи до захисту	19.12.2025	
19	Захист кваліфікаційної роботи	22-23.12.2025	

7. Консультанти з окремих розділів:

Назва розділу	Консультанти (посада, ПІБ)	Дата, підпис	
		Завдання видав	Завдання прийняв
Охорона праці	Олександр ВАЛЬЧЕНКО		
Охорона навколишнього середовища	Лариса ЧЕРНЯК		

8. Дата видачі завдання: «1» вересня 2025 р.

Керівник кваліфікаційної роботи \_\_\_\_\_

Ольга МАСЛОВА

Завдання прийняла до виконання \_\_\_\_\_

Владлена СТЬОБІНА

## РЕФЕРАТ

Пояснювальна записка до кваліфікаційної роботи «Вплив кондиціонованого середовища культивування мезенхімальних стовбурових клітин з жирової тканини на регенеративні здібності *Danio rerio*», 94 с., 14 рисунків, 5 таблиць, 80 посилань.

**Об'єкт дослідження** – регенераційні процеси у *Danio rerio* після ампутації хвостового плавця під впливом біологічно активних факторів мезенхімальних стовбурових клітин.

**Предмет дослідження** – морфометричні та морфофункціональні зміни хвостового плавця *Danio rerio* у відповідь на застосування кондиціонованого середовища мезенхімальних стовбурових клітин, отриманого зі стромально-васкулярної фракції жирової тканини людини.

**Мета роботи** – оцінити вплив кондиціонованого середовища, отриманого після культивування мезенхімальних стовбурових клітин людини зі стромально-васкулярної фракції, на динаміку та особливості регенерації хвостового плавця *Danio rerio*.

**Методи дослідження** - біологічні, морфометричні, аналітичні, статистичні.

У роботі досліджено вплив кондиціонованого середовища мезенхімальних стовбурових клітин на регенерацію хвостового плавця *Danio rerio*. Оцінку ефективності регенераційних процесів здійснювали за динамікою відновлення довжини плавця та відсотком регенерації відносно вихідних значень.

Отримані результати підтверджують позитивний вплив кондиціонованого середовища мезенхімальних стовбурових клітин на ранні етапи регенерації, що свідчить про значущу роль паракринних факторів. Наукова новизна та практичне значення роботи полягає у комплексній оцінці морфофункціональних змін регенерації *Danio rerio* під впливом кондиціонованого середовища клітин стромально-васкулярної фракції жирової тканини людини, отриманого на базі

комерційної компанії ReoCell. Таким чином ця робота є частиною великого порівняльного дослідження з метою оптимізації подальших виробничих процесів.

МЕЗЕНХІМАЛЬНІ СТОВБУРОВІ КЛІТИНИ, КОНДИЦІОНОВАНЕ СЕРЕДОВИЩЕ, СТРОМАЛЬНО-ВАСКУЛЯРНА ФРАКЦІЯ, РЕГЕНЕРАЦІЯ ТКАНИН, *Danio rerio*, ХВОСТОВИЙ ПЛАВЕЦЬ, МОРФОМЕТРИЧНИЙ АНАЛІЗ, ПАРАКРИННА ДІЯ

## ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ І СКОРОЧЕНЬ.....	9
ВСТУП.....	10
РОЗДІЛ 1_ЛІТЕРАТУРНИЙ ОГЛЯД .....	13
1.1. Мезенхімальні стовбурові клітини: походження та основні джерела.....	13
1.2. Стромально-васкулярна фракція жирової тканини як перспективне джерело МСК .....	15
1.3. Мезенхімальні стовбурові клітини жирової тканини: біологічні властивості та терапевтичний потенціал .....	19
1.4. Кондиціоноване середовище МСК: склад та механізми дії .....	23
1.5. Модельний організм <i>Danio rerio</i> у дослідженнях регенерації .....	31
Висновки до розділу 1 .....	36
РОЗДІЛ 2_МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ .....	38
2.1. Об'єкти дослідження: риби <i>Danio rerio</i> та умови утримання.....	38
2.2. Утримання риб.....	39
2.3. Розміщення та адаптація риб .....	41
2.4. Годування риб.....	42
2.5. Анестезія риб та методика ампутації хвостового плавця .....	43
2.6. Ампутація хвостового плавця .....	46
2.7. Пробудження та післяопераційний догляд.....	47
2.8. Тривалість операційної сесії .....	48
2.9. Кондиціоноване середовище МСК та дизайн експерименту .....	49
2.10. Експериментальний дизайн.....	51
2.11. Застосування кондиціонованого середовища .....	52
2.12. Фотофіксація та оцінка регенерації плавця.....	54
2.13. Статистична обробка даних .....	57
Висновки до розділу 2 .....	58
РОЗДІЛ 3 РЕЗУЛЬТАТИ ЕКСПЕРИМЕНТУ І ЇХ АНАЛІЗ.....	59
3.1. Динаміка регенерації хвостового плавця <i>Danio rerio</i> .....	59

3.2. Обговорення результатів .....	63
Висновки до розділу 3 .....	65
РОЗДІЛ 4 ОХОРОНА ПРАЦІ .....	67
4.1. Вступ.....	67
4.2. Аналіз умов праці на робочому місці.....	68
4.2.1. Організація робочого місця.....	68
4.2.2. Перелік шкідливих та небезпечних виробничих чинників.....	69
4.3. Аналіз шкідливих та небезпечних виробничих чинників.....	70
4.3.1. Електробезпека та пожежна безпека .....	70
4.3.2. Виробниче освітлення.....	71
4.3.3. Мікроклімат робочої зони .....	72
4.3.4. Механічні фактори .....	72
4.3.5. Хімічні чинники .....	73
4.4. Розробка заходів з охорони праці.....	73
4.4.1. Технічні та організаційні заходи безпеки.....	74
4.4.2. Заходи щодо усунення комбінованого біо-механічного ризику .....	75
4.5. Розрахункова частина: розрахунок штучного освітлення .....	76
Висновки до розділу 4 .....	77
РОЗДІЛ 5 ОХОРОНА НАВКОЛИШНЬОГО СЕРЕДОВИЩА .....	78
5.1. Вступ.....	78
5.2. Можливі впливи дослідження на навколишнє середовище та джерела впливу .....	78
5.3. Аналіз найбільш вагомого впливу та його наслідків .....	79
5.4. Рекомендації щодо мінімізації негативного впливу на довкілля .....	80
Висновки до розділу 5 .....	82
ВИСНОВКИ.....	83
СПИСОК БІБЛІОГРАФІЧНИХ ПОСИЛАНЬ ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	85

## ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ І СКОРОЧЕНЬ

МСК	Мезенхімальні стовбурові клітини
КС	Кондиціоноване середовище
СВФ	Стромально-васкулярна фракція
КУО-Ф	Колонієутворюючі фібробластні одиниці
ЛЗПТ	Лікарський засіб передової терапії
МСК ЖТ	Мезенхімальні стовбурові клітини жирової тканини
ДФ	Дермальні фібробласти
ІФА	Імуноферментиний аналіз
ФБС	Фетальна бичача сироватка

## ВСТУП

**Актуальність роботи.** Регенерація тканин є одним із ключових напрямів сучасної біомедичної науки, оскільки здатність організму відновлювати ушкоджені структури без формування рубцевої тканини відкриває перспективи для розроблення нових терапевтичних підходів у регенеративній медицині. Особливе значення має вивчення зовнішніх факторів, здатних модулювати регенераційні процеси, серед яких все більшу увагу привертає секретом мезенхімальних стовбурових клітин (МСК). Кондиціоноване середовище (КС), отримане після культивування МСК, містить комплекс біологічно активних молекул — екзосом, цитокінів, факторів росту, регуляторних білків, — які здатні впливати на клітинну проліферацію, диференціацію, ангіогенез та протизапальні механізми.

Вибір *Danio rerio* як модельного об'єкта зумовлений високою регенеративною здатністю цього виду, простотою утримання та наявністю добре охарактеризованих моделей ампутації хвостового плавця. Завдяки прозорості тканин і швидкому темпу регенерації *Danio rerio* дозволяє отримати достовірні морфофункціональні показники вже протягом перших днів експерименту, що робить його одним із найзручніших об'єктів для вивчення впливу зовнішніх біологічних чинників на процеси відновлення.

Актуальність цієї роботи визначається необхідністю поглиблення розуміння біологічної дії кондиціонованого середовища МСК, отриманих зі стромально-васкулярної фракції (СВФ) жирової тканини людини. У науковій літературі існують численні дані щодо терапевтичного потенціалу секретому МСК, проте вплив КС на регенерацію тканин модельних організмів досліджений недостатньо. Особливо актуальним є використання КС замість трансплантації самих клітин, що зменшує ризики імунної відповіді, підвищує безпеку та спрощує стандартизацію майбутніх терапевтичних препаратів.

Таким чином, дослідження впливу КС МСК на регенерацію хвостового плавця *Danio rerio* є важливим як з позицій фундаментальної біології, так і з точки зору прикладних аспектів регенеративної медицини та біотехнології.

**Мета роботи** – оцінити вплив кондиціонованого середовища, отриманого після культивування мезенхімальних стовбурових клітин людини зі стромально-васкулярної фракції, на динаміку та особливості регенерації хвостового плавця *Danio rerio*.

**Завдання для виконання кваліфікаційної роботи:**

1. Проаналізувати сучасні літературні дані щодо властивостей мезенхімальних стовбурових клітин та регенераційних механізмів *Danio rerio*.
2. Провести експеримент з ампутації хвостового плавця *Danio rerio* та подальшою фотофіксацією регенерації.
3. Здійснити морфометричний аналіз регенерації хвостового плавця у контрольній та дослідній групах.
4. Провести статистичну обробку результатів та оцінити вплив кондиціонованого середовища МСК зі СВФ жирової тканини людини на регенерацію.

**Об'єкт дослідження** – регенераційні процеси у *Danio rerio* після ампутації хвостового плавця під впливом біологічно активних факторів мезенхімальних стовбурових клітин.

**Предмет дослідження** – морфометричні та морфофункціональні зміни хвостового плавця *Danio rerio* у відповідь на застосування кондиціонованого середовища мезенхімальних стовбурових клітин, отриманого зі стромально-васкулярної фракції жирової тканини людини.

**Методи дослідження** - біологічні, морфометричні, аналітичні, статистичні.

**Практичне значення результатів** – отримані результати можуть бути використані для подальших експериментальних досліджень у сфері регенеративної медицини та біотехнології, зокрема для оцінки впливу

кондиціонованого середовища клітинного походження на регенераційні процеси. Матеріали роботи доцільно використовувати в навчальному процесі при викладанні дисциплін біотехнологічного спрямування.

**Наукова новизна дослідження** - полягає у комплексній морфометричній оцінці регенерації хвостового плавця *Danio rerio* під впливом кондиціонованого середовища мезенхімальних стовбурових клітин, отриманих зі стромально-васкулярної фракції жирової тканини людини, на різних етапах відновлення.

**Особистий внесок випускника** - здійснено аналіз наукової літератури, проведено експериментальну частину дослідження, включаючи обробку експериментальних даних, морфометричні вимірювання та статистичний аналіз результатів, а також узагальнення та інтерпретацію отриманих даних і оформлення кваліфікаційної роботи.

# РОЗДІЛ 1

## ЛІТЕРАТУРНИЙ ОГЛЯД

### 1.1. Мезенхімальні стовбурові клітини: походження та основні джерела

Мезенхімальні стовбурові (стромальні) клітини (МСК) — це мультипотентні клітини, що виявляються у різних тканинах та здатні до диференціації в різноманітні типи клітин, що відіграють ключову роль у загоєнні тканин та регенеративній медицині. Вперше МСК були відкриті у кістковому мозку, але згодом були знайдені й в інших тканинах організму, таких як жирова тканина, амніотична рідина, синовіальна тканина кістки, печінка, легені, підшлункова залоза, м'язи та кров пуповинної вени (рис. 1.1) [1,2]. МСК з різних джерел відрізняються доступністю, вмістом, здатністю до проліферації, імуномодулюючою активністю та спектром секретованих цитокінів, а також мають різний терапевтичний потенціал щодо окремих патологій [3].

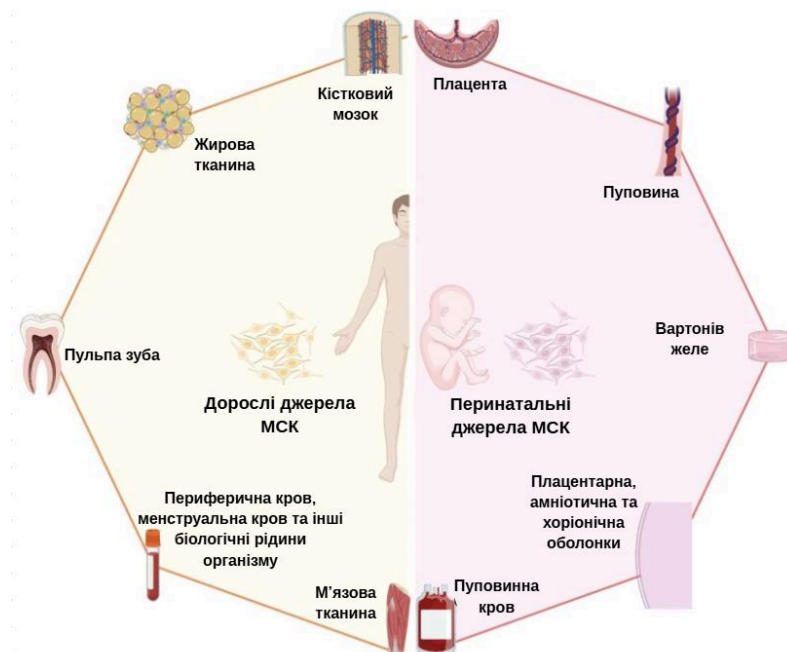


Рис. 1.1. Схематична діаграма, що ілюструє два основні джерела мезенхімальних стовбурових клітин: дорослого та перинатального походження

[3]

З моменту відкриття МСК у кістковому мозку Юліусом Конгейном у 1867 році, їх почали розглядати як важливий компонент регенерації шкіри та загоєння ран. У 1991 році професор Арнольд Каплан вперше запропонував термін «мезенхімальні стовбурові клітини» та підкреслив їх потенціал до багатонаправленої диференціації [4].

Крім того, було встановлено, що МСК мають різні біологічні функції, такі як імуномодуляція, протизапальна дія, антиапоптичний ефект та стимуляція ангиогенезу [5,6]. У 1995 році професор Каплан виділив та культивував МСК з кісткового мозку пацієнтів з онкогематологічними захворюваннями, після чого реінфузував їх пацієнтам з метою оцінки клінічного ефекту та підтвердження безпечності таких матриксів [7]. Відтоді клінічне застосування МСК активно розширюється щодо широкого спектра захворювань, включаючи серцево-судинні, неврологічні, кістково-суглобові, автоімунні патології, хвороби печінки, цукровий діабет тощо [8].

МСК здатні до самовідновлення та диференціації у декілька напрямів, і широко застосовуються у клітинній терапії переважно завдяки своїм антифібротичним та імунорегуляторним властивостям, що вважаються основою їх регенеративного потенціалу. МСК здійснюють свою дію шляхом секреції біологічно активних молекул — факторів росту, хемокінів і цитокінів, які можуть бути у розчиненому вигляді або вміщені в позаклітинні везикули.

Аналіз секретому МСК привертають значну увагу з медичної точки зору через їх здатність відтворювати усі терапевтичні ефекти МСК (наприклад, ендогенне відновлення тканин та регуляція імунної відповіді) [9].

МСК характеризуються здатністю диференціюватись у три основні лінії — остео-, хондро- та адипоцити. Ці клітини експресують маркери мезенхімальної лінії, включаючи CD90, CD73, CD105 та CD44, і не експресують маркери гемопоетичної лінії, такі як CD45 та CD14, а також ендотеліальний маркер CD31 [10].

Вони здатні адгезувати до пластику та формувати колонієутворюючі фібробластні одиниці (КУО-Ф) у стандартних умовах культивування [11].

Адгезія до пластику є важливою характеристикою МСК і спрощує їх ізоляцію. МСК не є гомогенною популяцією, і джерело тканини, таке як жирова тканина, кістковий мозок або пуповина, зумовлює відмінності в експресії генів, що може визначати специфічні терапевтичні властивості клітин [12]. Додатково на терапевтичну ефективність впливають індивідуальні особливості донора, включаючи стан здоров'я, генетику, стать і вік [13], характеристика клітинної популяції та час введення МСК. Також шлях введення може впливати на терапевтичний результат, зокрема при серцевих захворюваннях [14].

Отже, із розширенням застосування МСК у клініці важливо оптимізувати шлях введення та механізми їх дії [15].

## **1.2. Стромально-васкулярна фракція жирової тканини як перспективне джерело МСК**

Стромально-васкулярна фракція (СВФ) жирової тканини містить гетерогенну популяцію клітин, включаючи регенеративні клітини, такі як стовбурові клітини жирової тканини, макрофаги, перицити, фібробласти, кров'яні клітини та клітини, що формують судини, включаючи ендотеліальні та гладком'язові клітини, та їхні попередники [16]. Ця популяція клітин також включає клітини зі стовбуровими властивостями, які, як вважається, мають синергічний ефект з мезенхімальними стовбуровими клітинами жирової тканини (МСК-ЖТ) [17].

СВФ була уперше ідентифікований у 60-х роках як фракція неадипоцитарних клітин, після чого вона була широко охарактеризована і застосована у різних клінічних умовах, головним чином завдяки регенеративним та протизапальним властивостям [18]. СВФ виділяється з жирової тканини після видалення адипоцитів і містить усі не-жирові клітини, що утворюють стромальну та судинну фракцію тканини. Нині терапія, що базується на використанні СВФ, розглядається як перспективна стратегія регенеративної

медицини, оскільки СВФ є доступним джерелом мультипотентних клітин і факторів для регенерації тканин.

Для виділення СВФ з жирової тканини найчастіше застосовується ферментативна обробка — ензиматичне перетравлення подрібненої жирової тканини колагеназою з подальшим центрифугуванням. Стромально-васкулярну фракцію осаджують і висівають у культуральні флакони (рис 1.2), що призводить до формування відносно однорідної популяції веретеноподібних фібробластоподібних клітин, відомих як ADSCs, після кількох пасажів (13, 36) [16].

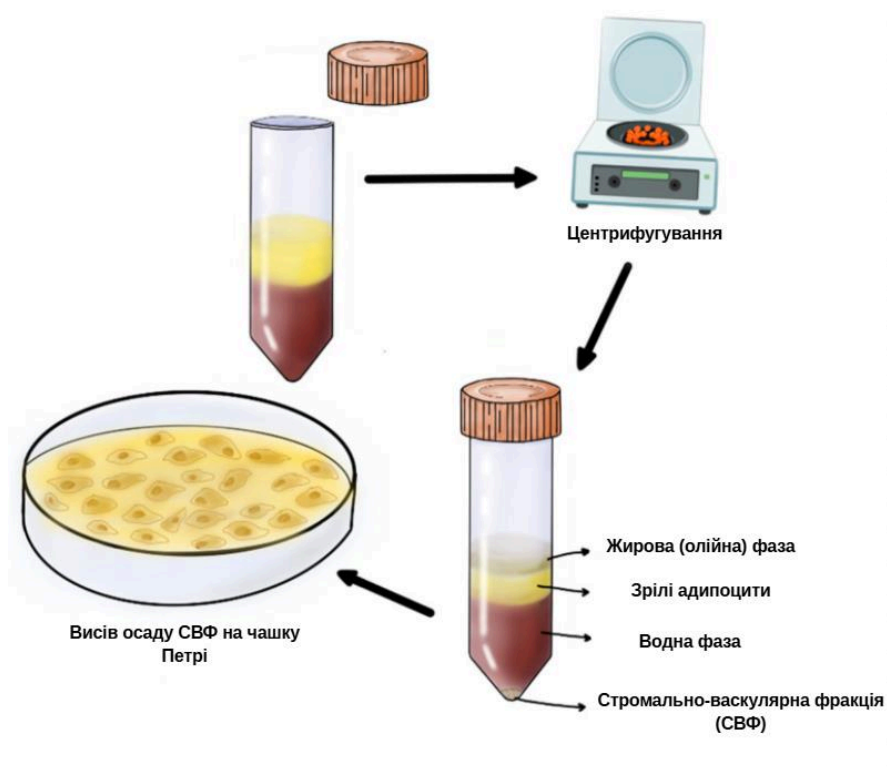


Рис. 1.2. Схема виділення стромально-васкулярної фракції (СВФ) методом центрифугування та подальшого культивування [18]

Цей метод було вперше проведено у 2006 році професором Йошімурою та колегами шляхом інкубації тканини у розчині колагенази при 37 °С, після чого виконували кілька етапів центрифугування та промивання, що дозволяло здійснити диференційне розділення перетравленої тканини на водну фазу, збагачену клітинами СВФ, і ліпідну фазу [16]. Ферментативний метод дозволяє

отримати суспензію окремих клітин з вищим виходом порівняно з суто механічними методами дезагрегації тканини [19].

Протокол ферментативної обробки був значно вдосконалений і стандартизований протягом десятиліть у зв'язку з класифікацією СВФ як Лікарський засіб передової терапії (ЛЗПТ) через те, що процес її отримання включає суттєву маніпуляцію (ферментативний лізис). Оскільки СВФ вважається ЛЗПТ, її потрібно виділяти відповідно до вимог GMP, щоб забезпечити найвищу стерильність і якість кінцевого продукту.

Альтернативними є механічні методи отримання СВФ без використання ензимів (наприклад, подрібнення, емульсифікація жиру тощо), проте вони часто дають нижчий вихід ізольованих клітин і можуть залишати клітинні агрегати. Відомо, що після механічної дезагрегації у препараті можуть зберігатися кластери клітин, що ускладнює рівномірне введення і може призводити до мікрокальцифікації та некрозу в тканинах. Ферментативний метод забезпечує більш однорідну суспензію клітин, проте його недоліком є необхідність суворого дотримання регуляторних вимог і відносно висока вартість ферментів та обладнання [19].

Однак відповідно до нещодавнього систематичного огляду Угутена та колег, як механічні, так і ферментативні методи виділення показали порівнянні результати, як це показано на рис. 1.3. Зокрема, було порівняно 21 різних протокол виділення (як ферментативний, так і механічний) із діапазоном виходу клітин: від  $2.3 \times 10^5$  до  $18 \times 10^5$  для ферментативного процесу і від  $0.3 \times 10^4$  до  $26.7 \times 10^5$  для механічних процесів. Життєздатність коливалася від 70% до 99% у ферментативних процедурах і була дещо нижчою в механічних процесах, варіюючись від 46% до 97.5% [20].

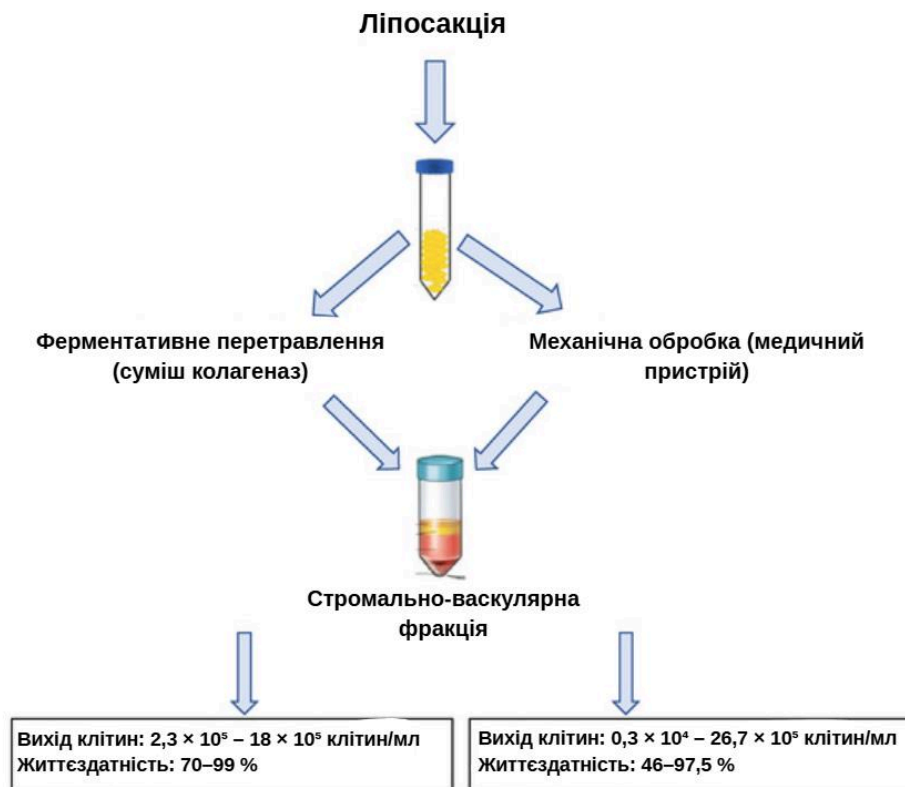


Рис. 1.3. Вплив різних підходів до виділення СВФ [16]. Дані, представлені на рисунку, взяті з такого джерела [20]

Підсумовуючи, як ферментативні, так і механічні методи мають свої сильні сторони, і вибір оптимальної техніки залежить від конкретних потреб процедури.

Показники життєздатності клітин та їх загальна кількість на мілілітр, визначені в кожній пробі жирової тканини, вважаються основними характеристиками кінцевого продукту. Вони відображають ефективність екстракції та якість обробленого зразка, що слугує оптимальною основою для досягнення максимального терапевтичного ефекту. Було показано, що як і відсоток життєздатності клітин, так і загальна кількість залежать від техніки забору жирової тканини та різних протоколів виділення, що виконуються різними підходами — ручними, автоматизованими, ензиматичними або механічними [21]. Флуоресцентна проточна цитометрія, тест колонієутворення та диференціаційні тести є основними методами, що використовуються для підтвердження стовбурових властивостей МСК жирової тканини. [10].

За сприятливих умов із 100 мл ліпоаспірату можна отримати десятки мільйонів клітин СВФ, придатних для подальшого використання [22]. Залежно від методу виділення, місця забору та віку донора, життєздатні ядровмісні клітини СВФ оцінюються на рівні  $0,2-7 \times 10^6$  клітин/г жирової тканини. Мезенхімальні стовбурові клітини жирової тканини становлять приблизно 1–10% популяції клітин СВФ, що приблизно у  $2 \times 10^3$  разів більше, ніж кількість, яку можна отримати з кісткового мозку [10].

Загалом жирова тканина забезпечує у сотні разів більший вихід стовбурових клітин, ніж кістковий мозок. За даними досліджень, СВФ з однакового об'єму містить приблизно у 500 разів більше МСК, ніж мононуклеарна фракція кісткового мозку [19].

Високий вміст стовбурових клітин у СВФ пов'язаний з тим, що співвідношення адипоцитів та МСК у жировій тканині є відносно стабільним для кожної людини, а більший об'єм жирової тканини забезпечує більший абсолютний вихід МСК.

### **1.3. Мезенхімальні стовбурові клітини жирової тканини: біологічні властивості та терапевтичний потенціал**

Особливу цінність СВФ становлять саме присутні в ній мезенхімальні стовбурові клітини жирової тканини (МСК ЖТ), які складають значну частину клітинної популяції СВФ і відповідають за більшість її регенеративних ефектів [18].

МСК ЖТ, виділені зі СВФ (також відомі як жирові стромальні клітини), за своїми властивостями подібні до МСК кісткового мозку: вони здатні до самооновлення і мультилінійної диференціації (в тому числі остеогенної, хондрогенної, адипогенної).

МСК ЖТ були широко застосовані в галузі тканинної інженерії та клітинної терапії завдяки їхній здатності диференціюватися в кілька ліній клітин, а також їхнім потужним протизапальним, антифібротичним, антиапоптозичним

та проангіогенним ефектам як *in vitro*, так і *in vivo* [10]. Клінічне застосування МСК ЖТ продемонструвало успіх у лікуванні багатьох захворювань та ушкоджень, включаючи серцево-судинні [23], запальні захворювання кишечника [24], цукровий діабет [25,26], ураження нирок і спинного мозку [27], реконструкції кісток та краніофасціальних структур [28], цироз печінки [29], розсіяний склероз [30], системний червоний вовчак [31] та реакцію «трансплантат проти хазяїна» [16].

Було показано, що МСК ЖТ диференціюють у адипогенну лінію у порівнянні з МСК кісткового мозку та пуповинної тканини, однак їхню мультипотентність високо цінують при відновленні тканин ектодермального та ендодермального походження [32]. МСК ЖТ відрізняються від МСК кісткового мозку експресією транспортера жирних кислот CD36 та відсутністю експресії маркера клітинної адгезії CD106 [10].

Крім того, дослідження показали, що МСК ЖТ, ізольовані з підшкірної жирової тканини, мають вищу швидкість проліферації та здатність до диференціації в адипоцити та хондроцити, але нижчу остеогенну здатність порівняно з МСК ЖТ з вісцеральної жирової тканини [10].

Попри відмінності у генній експресії та диференціаційному потенціалі, обидва типи продемонстрували однакову ефективність у лікуванні серцевої недостатності. МСК ЖТ, ізольовані з підшкірної жирової тканини, однак, виявили більшу ефективність у лікуванні остеоартриту завдяки здатності до імуносупресії та зменшення експресії генів запалення [33].

За даними більшості досліджень, МСК ЖТ здатні секретувати багатий секретом, унаслідок чого відбувається проліферація та диференціація клітин, міграція, а також покращення захисту клітин та мікрооточення [34,35]. Секретом цих клітин містить різні трофічні фактори — цитокіни, фактори росту та хемокіни. Завдяки цьому МСК ЖТ впливають на навколишні тканини переважно через паракринні сигнали, а не через пряме заміщення клітин [36].

Очікується, що ці клітини відіграватимуть важливу роль у регуляції регенерації шкіри та вікових морфологічних порушень і структурних дефіцитів.

МСК ЖТ відомі здатністю проліферувати й диференціюватися у клітини шкіри для відновлення ушкоджених або загиблих клітин, а також діяти ауто- та паракринним шляхом для активації регенерації клітин і процесу загоєння (рис.1.4).

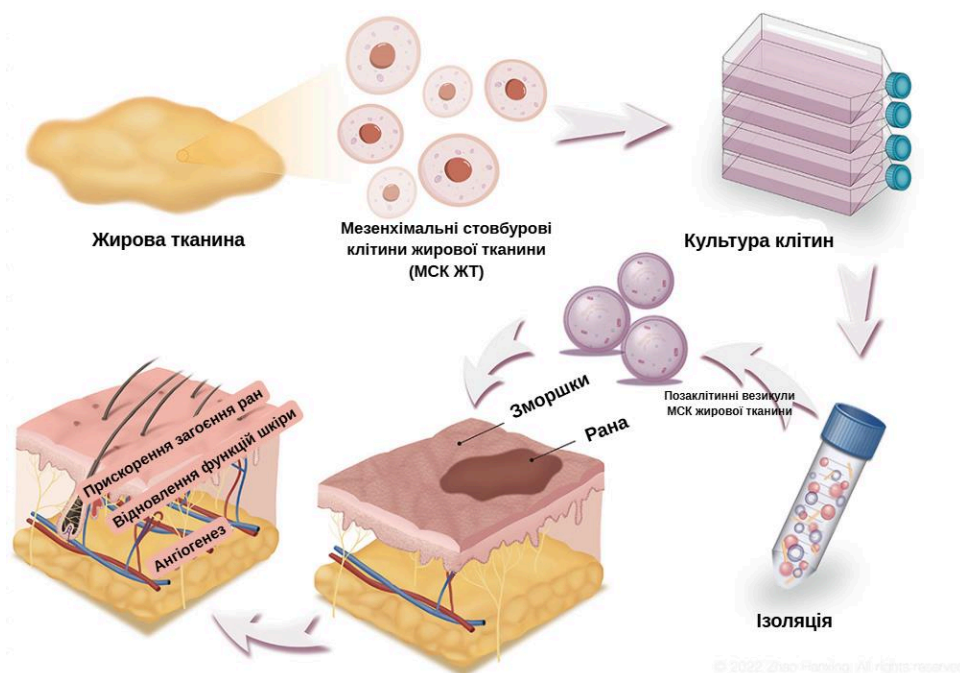


Рис. 1.4. Схема отримання МСК із жирової тканини та їх подальшого використання в регенеративних процесах

Під час загоєння ран МСК ЖТ мають значну здатність до міграції та швидкого рекрутування в місце ушкодження, а також до диференціювання в дермальні фібробласти (ДФ), ендотеліальні клітини та кератиноцити. Крім того, МСК ЖТ і ДФ є основними джерелами білків позаклітинного матриксу, що підтримують структуру та функцію шкіри. Їхня взаємодія зі шкірними клітинами бере участь у регуляції гомеостазу шкіри та процесів загоєння. Докази свідчать, що їхні секретони забезпечують зміну запального фенотипу макрофагів, залучених до запальної фази; формування нових кровоносних судин, стимулюючи ангіогенез шляхом збільшення диференціювання ендотеліальних клітин і міграції клітин; а також формування грануляційної тканини, клітин шкіри та синтез білків позаклітинного матриксу, що забезпечує проліферативну та ремоделюючу фази [32].

СВФ привернув значну увагу в регенеративній медицині завдяки антиапоптотичним, антиоксидантним, протизапальним та проангіогенним властивостям мезенхімальних компонентів [16]. Ці характеристики зумовили його терапевтичне використання в різних клінічних умовах.

Недавні дослідження підкреслюють широкий потенціал СВФ у клінічній медицині. Зокрема, СВФ застосовують в ортопедії для лікування остеоартриту колінного суглоба, що приводить до зменшення болю, регенерації хряща та покращення рухливості [37,38,39].

СВФ також демонструє перспективні результати у ранніх клінічних дослідженнях для лікування ішемії міокарда [40].

У реконструктивній хірургії СВФ-терапія була застосована для реконструкції носа та грудей, покращуючи естетичні результати та розширюючи можливості лікування складних ділянок.

Крім того СВФ-терапія охоплює широкий спектр застосувань — від естетичної медицини до лікування неврологічних та нейродегенеративних захворювань (Паркінсон, Альцгеймер), аутоімунних захворювань, безпліддя та ушкоджень голосових зв'язок [41].

Наростаюча кількість доказів ефективності та безпеки СВФ-терапії стимулює подальші дослідження її можливостей. Майбутні дослідження мають зосередитися на відтворюваності результатів та розробці стандартизованих протоколів виділення СВФ.

Стандартизація процесів СВФ все ще має багато викликів через фізіологічну варіабельність (вік, стать, індекс маси тіла, стан здоров'я), клітинну гетерогенність СВФ, варіабельність процесів та відсутність регуляторних стандартів [37].

Попри це, було досягнуто суттєвих успіхів у стандартизації, зокрема створення автоматизованих систем обробки, що зменшило технічні помилки та варіабельність ізоляції СВФ, а також дозволило узгодити різні протоколи та опублікувати точні рекомендації для мінімізації варіабельності та підвищення відтворюваності між лабораторіями [42].

Ключовий прогрес у проточній цитометрії та молекулярних методах імунного фенотипування забезпечив кращу роздільність для точної ідентифікації субпопуляцій клітин [16].

Попри це, різні хірургічні підходи та умови обробки жирової тканини створюють низку невирішених питань щодо стандартизації навіть через більше ніж два десятиліття після початку використання СВФ у терапевтичних цілях.

#### **1.4. Кондиціоноване середовище МСК: склад та механізми дії**

Кондиціоноване середовище — це багата поживними речовинами рідина, зібрана з клітинних культур після того, як клітини вирощувалися в ній протягом певного періоду. Це середовище містить суміш секретованих білків, факторів росту та інших сигнальних молекул, що виділяються клітинами, відображаючи їхню метаболічну активність та фізіологічний стан [43].

Іншими словами, секретом мезенхімальних стовбурових клітин або кондиціоноване середовище МСК — це комбінація біомолекул та факторів росту в середовищі для культивування клітин, що секретуються МСК, і є вихідним матеріалом для кількох похідних продуктів [44].

КС МСК — це культуральне середовище, властивості якого формуються під впливом паракринної секреції мезенхімальних стовбурових клітин. Це середовище містить різні фактори росту, цитокіни та інші молекули, що секретуються МСК, і може використовуватися для різних цілей, таких як сприяння росту та диференціації клітин, вивчення клітинних сигнальних шляхів та оцінка терапевтичного потенціалу МСК [10].

Найпоширенішими джерелами стовбурових клітин, що використовуються для «виготовлення» КС МСК, є МСК кісткового мозку, МСК жирової тканини та МСК пульпи зуба [32].

Першим етапом виробництва КС МСК є виділення та розмноження (експансія) МСК *in vitro* в статичних або динамічних умовах для отримання необхідної кількості клітин перед початком процесу кондиціонування.

Нещодавно була розроблена повністю закрита, автоматизована система розмноження клітин, що відповідає стандартам GMP, яку можна використовувати для великомасштабного виробництва МСК. Після точної характеристики МСК культуральні середовища замінюються на «голодні» безсироваткові базальні середовища. На цьому етапі МСК починають секретувати різні біоактивні молекули та позаклітинні везикули. У деяких випадках МСК культивують за специфічних умов, таких як низький парціальний тиск кисню або додавання специфічних факторів росту, щоб стимулювати секрецію біоактивних молекул у середовище. Через певний проміжок часу, як правило, 24–48 годин, кондиціоновані середовища збирають та фільтрують для видалення клітинного дебрису. Після цього КС МСК можна сконцентрувати для підвищення вмісту біоактивних молекул. Це можна здійснити за допомогою різних методів, таких як центрифугування або ультрафільтрація.

Завершальним етапом є контроль якості виготовленого КС МСК. КС МСК зазвичай аналізують на наявність специфічних біоактивних молекул, таких як фактори росту та цитокіни, використовуючи такі методи, як імуноферментний аналіз (ІФА) або мас-спектрометрія [45].

Отриманий таким чином секреторний продукт МСК може зберігатися (зокрема шляхом заморожування) або застосовуватися безпосередньо. У багатьох дослідженнях саме КС МСК розглядається як перспективний безклітинний терапевтичний засіб, який уникає проблем, пов'язаних із трансплантацією живих клітин. Застосування секрету МСК має ключові переваги над клітинними терапіями – зокрема, значно меншу імуногенність, а також простоту виробництва, зберігання та транспортування порівняно з живими клітинами.

Процес виробництва суттєво впливає на склад секретому, оскільки численні змінні можуть впливати як на кількість, так і на якість секретованих факторів. До цих змінних належать характеристики донора, джерело отримання клітин (наприклад, жирова тканина, кістковий мозок, пульпа зуба), методика виділення клітин, пасаж та конфлюентність клітин на момент продукування

секретому, склад середовища, а також будь-яке фізичне чи біохімічне кондиціонування [47].

МСК виробляють та секретують широкий спектр біоактивних молекул у відповідь на різні умови мікрооточення, через що їх навіть називають «трофічними фабриками». Сукупність усіх трофічних факторів або молекул, що виділяються цими клітинами у позаклітинний простір, відома як *секретом*. Термін «секретом» включає два різні компоненти: розчинну фракцію, що складається переважно з цитокінів, хемокінів, імуномодулюючих молекул та факторів росту, та везикулярну фракцію, що складається з різних типів везикул, які відіграють вирішальну роль у доставці мікроРНК та білків, залучених до міжклітинної комунікації [46].

МСК здатні секретувати різноманітні аутокринні та паракринні фактори, включаючи цитокіни, хемокіни, протеази позаклітинного матриксу та фактори росту, що дає можливість використовувати їх як потенційне джерело терапії на безклітинній основі [15]. Біомолекули, отримані з МСК кісткового мозку, були широко досліджені для кращого з'ясування їх потенціалу [10]. Фактично, протеомний аналіз виявив наявність до 1533 білків [32], які беруть участь у різних біологічних процесах. Короткий огляд цієї інформації наведено на рис. 1.5.

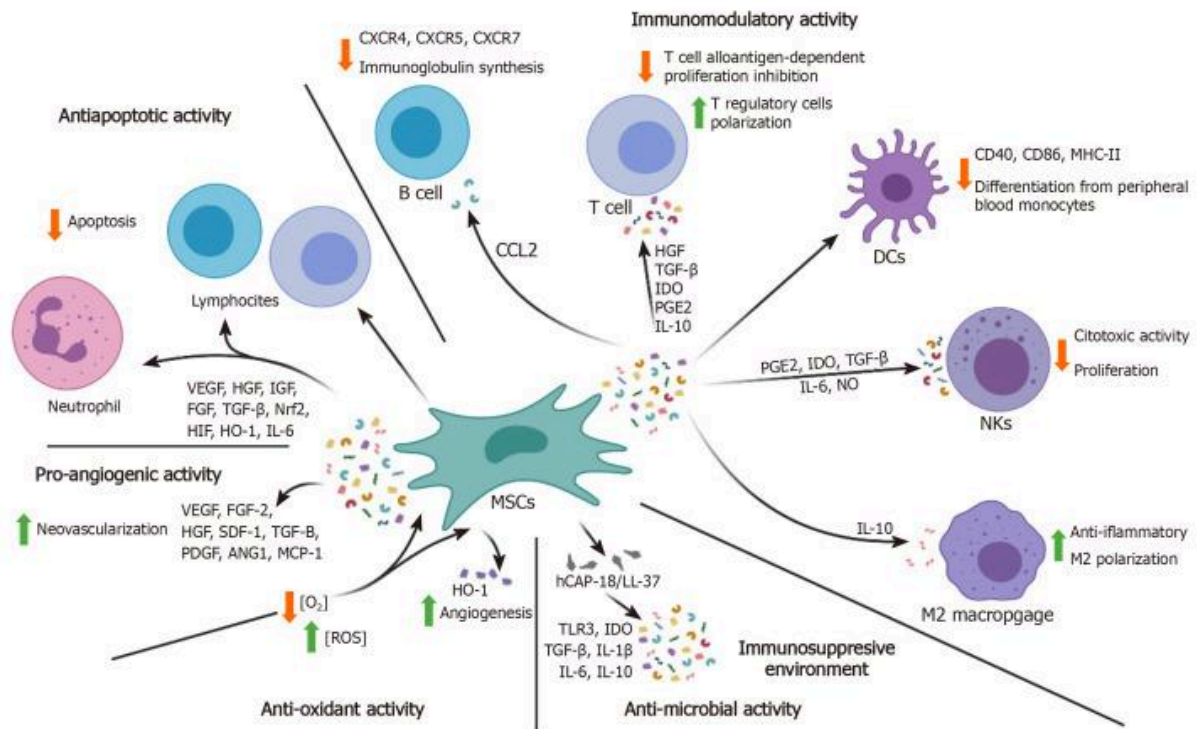


Рис. 1.5. Короткий огляд різноманітних розчинних факторів, що секретуються мезенхімальними стовбуровими клітинами, та їхніх функцій [46]

Серед зазначених компонентів: фактор росту гепатоцитів (HGF), трансформуючий фактор росту- $\beta$  (TGF- $\beta$ ), індоламін-2,3-діоксигеназа (IDO), простагландин E2 (PGE2), інтерлейкін (IL), дендритні клітини (DCs), ліганд СС-хемокіну (CCL), природні кілери (NKs), мезенхімальні стовбурові клітини (MSCs), рецептор хемокінів типу С-Х-С (CXCR), судинний ендотеліальний фактор росту (VEGF), інсуліноподібний фактор росту (IGF), фактор росту фібробластів (FGF), ядерний фактор еритроїдного походження 2 (Nrf2), фактор, індукований гіпоксією (HIF), фактор похідний стромальних клітин (SDF), тромбоцитарний фактор росту (PDGF), ангіопетин-1 (ANG1), моноцитарний хемотаксичний білок-1 (MCP-1), активні форми кисню (ROS), людський антимікробний пептид кателіцидин (hCAP), гемоксигеназа (HO-1) та оксид азоту (NO) [46].

Таким чином, секретом МСК характеризується багатим складом факторів росту, цитокінів та інших розчинних або зв'язаних із везикулами біоактивних медіаторів, що сприяють регенерації тканин та імуномодуляції.

Важливим компонентом кондиціонованого середовища є екзосоми, що представляють різновид малих позаклітинних везикул (приблизно 30–150 нм в діаметрі), які утворюються шляхом внутрішньоклітинного брунькування ендосомальної мембрани і вивільняються клітиною назовні. Екзосоми є ключовим компонентом секретому МСК та переносять у своєму складі білки, ліпіди і нуклеїнові кислоти, здатні впливати на поведінку клітин-мішеней [43].

Окрім екзосом, до складу КС МСК входять десятки розчинних білкових молекул. Наприклад, секрет МСК містить різні цитокіни (інтерлейкіни — ІЛ-6, ІЛ-8, ІЛ-10 тощо; хемокіни — SDF-1 та ін.), фактори росту (VEGF, HGF, bFGF, TGF- $\beta$ , IGF-1 та інші), а також інші регуляторні білки та молекули – такі як протизапальні медіатори простагландин Е<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) і TGF- $\beta$ , фермент індоламін-2,3-діоксигеназа (IDO), білок TSG-6 та інші [45].

В секретомі також виявлено різноманітні мікроРНК, екзосомальні мРНК та ліпідні медіатори, що вносять свій вклад у регуляцію міжклітинних взаємодій. Саме завдяки такому комплексному складу секреторне середовище МСК розглядається як потужний паракринний коктейль з потенціалом для стимуляції відновлення тканин [48].

Найбільш важливими властивостями кондиціонованого середовища МСК є його здатність стимулювати ангіогенез, модулювати імунну відповідь (протизапальна дія) та прискорювати регенерацію пошкоджених тканин. Секретом МСК має ключову роль у міжклітинній комунікації і є активним медіатором імунної модуляції та регенерації як *in vitro*, так і *in vivo* [44]. Зокрема, він містить імуномодулюючі фактори, що здатні регулювати як вроджену, так і адаптивну ланку імунної системи [49]. Це проявляється у пригніченні надмірних запальних реакцій та переключенні імунної відповіді на регенеративний режим. Експериментально показано, що введення КС МСК сприяє зниженню запалення: так, при моделюванні коліту кондиціоноване середовище підвищувало рівень протизапальних медіаторів TGF- $\beta$  та ІЛ-10 і збільшувало частку регуляторних Т-лімфоцитів, одночасно зменшуючи продукцію прозапального цитокіну ІЛ-17.

Секретом МСК також індукує поляризацію макрофагів у протизапальний фенотип M2, активуючи відповідні сигнальні шляхи (NF-κB, STAT3) та стимулюючи експресію протизапальних генів (Arg1, IL-10 тощо) [45].

В результаті таких зрушень запальний процес стихає, що створює сприятливі умови для регенерації пошкоджених тканин. Окрім протизапального ефекту, кондиціоноване середовище МСК стимулює ангиогенез – утворення нових кровоносних судин. Зокрема, у досліджах *in vitro* продемонстровано, що під дією КС МСК значно посилюється утворення капіляроподібних судинних трубочок ендотеліальними клітинами порівняно з контролем. Секретом також виявляє хемотактичний вплив на ендотеліальні клітини, стимулюючи їх міграцію до зони ушкодження. За рахунок виділення ангиогенних факторів, КС МСК забезпечує краще кровопостачання регенеруючих тканин, що критично для успішного загоєння ран та імплантатів

У сукупності паракринні фактори, присутні в кондиціонованому середовищі, активно сприяють регенерації та відновленню тканин. Ряд досліджень показав позитивний вплив КС МСК на загоєння кісткової і хрящової тканини. Зокрема, встановлено, що секретом МСК підвищує активність і диференціацію остеобластів – клітин, відповідальних за формування кістки, – а також стимулює проліферацію і міграцію ендотеліальних клітин, покращуючи васкуляризацію в зоні пошкодження кістки.

Одночасно для хрящової тканини було показано, що фактори КС МСК стимулюють розмноження хондроцитів і синтез ними позаклітинного матриксу, сприяючи формуванню нової хрящової тканини. Важливо, що протизапальні властивості секретому допомагають зменшити запалення у суглобах, що також підсилює регенерацію хряща. Таким чином, кондиціоноване середовище МСК комплексно впливає на різні ланки відновного процесу – від пригнічення надмірного запалення до стимуляції ангиогенезу та клітинної диференціації – що пояснює його виражений терапевтичний ефект у моделях пошкодження тканин. Практично було продемонстровано, що місцеве застосування гідрогелів або губок, насичених КС МСК, значно покращує загоєння кісткових дефектів і ран

*in vivo* порівняно з контролем. Отже, біологічні ефекти секрету МСК багатогранні: він одночасно діє як про-ангіогенний, імуномодулюючий та регенеративний агент, який реалізує основні лікувальні властивості самих стовбурових клітин, але без їх прямої трансплантації. Недарма сьогодні вважається, що саме паракринна активність лежить в основі терапевтичної дії МСК, а секретом МСК розглядається як перспективний замітник клітин у регенеративній медицині [45].

Секретом стовбурових клітин жирової тканини має значні перспективи для щелепно-лицевої медицини завдяки своєму багатому складу факторів росту, цитокінів та інших розчинних або вбудованих у везикули біоактивних медіаторів, що сприяють регенерації тканин та імуномодуляції. Потенційні сфери застосування включають покращення загоєння ран, зменшення запалення та стимуляцію регенерації твердих і м'яких тканин. Це може призвести до покращення результатів таких процедур, як кісткова пластика, реконструкція м'яких тканин та лікування дефектів ротової порожнини та обличчя. Використовуючи регенеративні властивості секретому МСК ЖТ, клініцисти можуть досягти ефективнішого відновлення тканин, що в кінцевому підсумку позитивно вплине на одужання пацієнтів та якість їхнього життя [47].

Попри перспективність підходу, широке впровадження кондиціонованого середовища МСК у біомедичні дослідження і терапію пов'язане з низкою викликів. Насамперед, склад секретому є вкрай складним і варіабельним. МСК секретують цілий “коктейль” різнорідних біоактивних факторів, що становить серйозну перешкоду для відтворюваності ефектів та ускладнює оцінку безпеки такого препарату. Існують суттєві проблеми стандартизації: різні партії кондиціонованого середовища можуть відрізнятися за концентрацією і складом чинників залежно від джерела МСК, умов культивування та методів отримання секретому. На сьогодні у науковій спільноті відзначають брак уніфікованих підходів до стандартизації складу КС МСК, недостатню характеристику його активних компонентів, а також невизначеність оптимального дозування і режимів введення [50]. Відтак, для успішного перекладу цього підходу в клініку

потрібні додаткові дослідження з метою чіткого визначення ключових компонентів секретому, відповідальних за терапевтичний ефект, і встановлення контрольованих протоколів його виробництва. Ще одним обмеженням є масштабування виробництва: отримання великих об'ємів секретому потребує значної кількості вихідних МСК. Клітини доводиться експандувати *in vitro* до високих кількостей, що може призводити до змін їх біологічних властивостей (наприклад, втрати “стовбуровості” з часом) [50]. Це ускладнює економічно вигідне та відтворюване виготовлення секретому в умовах, наближених до клінічних.

Додатково, не до кінця з'ясованими лишаються і самі механізми дії компонентів КС МСК. Хоча ряд шляхів (проангіогенний, імуномодулюючий, антиапоптозичний тощо) вже ідентифіковані, повна картина того, як секретом взаємодіє з клітинами організму і координує регенерацію, ще формується. Ця невизначеність утруднює прогнозування можливих побічних ефектів або ризиків нетипових реакцій. Проте, варто наголосити, що з точки зору безпеки клітинно-вільні препарати секретому мають певні переваги над трансплантацією клітин. Оскільки кондиціоноване середовище не містить живих проліферуючих клітин, воно не несе ризику утворення пухлин чи емболізації судин тканин клітинними агрегатами [51]. Алогенний секретом зазвичай не викликає вираженої імунної відмови і не потребує імуносупресії, адже позбавлений клітинних поверхневих антигенів, що провокують реакцію відторгнення [52]. До того ж, методи стерильного очищення (фільтрація) можуть бути застосовані до секретому, що знижує ризик мікробної контамінації препарату. Таким чином, у аспекті інфекційної та онкологічної безпеки секретом МСК є привабливим інструментом.

Незважаючи на низьку імуногенність та відсутність пухлинного потенціалу, впровадження КС МСК в клінічну практику вимагає суворого контролю якості та додаткових досліджень. Необхідно забезпечити відтворюваність складу та ефектів різних партій секретому, дотримання стандартів GMP при його виробництві, а також провести комплексні доклінічні

та клінічні оцінки безпечності. Лише за умови подолання зазначених обмежень кондиціоноване середовище МСК зможе перейти із площини експериментальних досліджень до широкого застосування у регенеративній медицині. Загалом, сучасні наукові дані останніх років демонструють великий потенціал КС МСК як потужного терапевтичного засобу завдяки наявності екзосом, цитокінів, факторів росту та інших регуляторних молекул у його складі. Водночас, для реалізації цього потенціалу необхідно розв'язати питання стандартизації, механістичного розуміння дії та безпечного клінічного використання цього багатокomпонентного біопрепарату [50].

### 1.5. Модельний організм *Danio rerio* у дослідженнях регенерації

Даніо реріо (*Danio rerio*) (рис. 1.6) є надзвичайно цінною модельною твариною завдяки своїй вражаючій здатності до регенерації багатьох органів (серця, плавців, сітківки, спинного мозку, мозку). На відміну від ссавців, рибки здатні відновлювати втрачені структури з мінімальним або відсутнім рубцюванням, що тісно пов'язано з активацією стовбурових та імунних клітин [53].



Рис. 1.6. *Danio rerio*

Серед моделей хребетних тварин, доступних для досліджень регенерації, *D. rerio* — прісноводна риба довжиною 2–5 см є однією з найбільш широко

використовуваних. Після того, як цей вид утвердився як генетично та експериментально доступна модельна система для вивчення розвитку, ранні дослідження регенерації показали, що данію реріо, подібно до багатьох інших риб, здатні повністю відновлювати багато тканин і органів. Ці новаторські дослідження переконали наукову спільноту використовувати цей модельний організм як для вивчення регенерації органів, так і для вивчення їх розвитку. До тканин та органів, які найчастіше досліджуються на предмет регенерації, належать спинний мозок, головний мозок і мозочок, сітківка, волоскові клітини, серце, хвостовий плавець, нирки та печінка.

Вивчення природних механізмів регенерації у таких високорегенеративних видів, як *D. rerio*, допомагає розробити стратегії відновлення тканин у організмів з низькою здатністю до регенерації (наприклад, у людини) [54].

До анатомо-фізіологічних особливостей *Danio rerio*, що обумовлюють вибір цього виду як моделі, належать малий розмір і невибагливість, зовнішнє запліднення та розвиток ембріонів, а також висока плодючість, що дозволяє працювати з великою кількістю особин. Риби зебра мають високу регенеративну здатність і є модельними хребетними, яких легко утримувати у великій кількості при відносно низьких затратах. Крім того, доступні потужні засоби генетичної інженерії, повна геномна секвенція, а фізіологічні параметри (наприклад, частота серцевих скорочень) близькі до людських. Усі ці риси роблять *D. rerio* зручним і ефективним об'єктом для вивчення процесів регенерації людини на модельних організмах.

Однією з головних переваг данію реріо є можливість візуалізації морфогенетичних процесів. Під час ембріогенезу використання флуоресцентних репортерних ліній полегшує візуалізацію тканин та органів на клітинному та субклітинному рівнях. Мікроскопічні методи, такі як мікроскопія світлового листа, дозволяють проводити тривалу візуалізацію з мінімальним втручанням у фізіологічні процеси, що відбуваються як під час регенерації, так і під час розвитку. Личинка данію реріо також є достатньо прозорою, що дозволяє

використовувати прижиттєву візуалізацію для відстеження регенеративних процесів в органах і тканинах у личинок віком до 5 днів або старше, залежно від органу. Переважною моделлю пошкодження на цих стадіях є генетична абляція, яка особливо добре підходить з огляду на малий розмір тварин у цьому віці. Наразі розробляються автоматизовані системи для візуалізації личинок, які полегшують збір та аналіз даних і дозволяють проводити високопродуктивний скринінг.

Завдяки цьому, а також розробленню численних біосенсорних трансгенних ліній, *Danio rerio* є надзвичайно корисним інструментом для дослідження молекулярних механізмів регенерації *in vivo* [55].

Основні експериментальні моделі регенерації у даніо реріо включають відновлення плавців, серця та нервової тканини. Класичним дослідом є ампутація хвостового плавця: після ушкодження за кілька годин рану покриває епідермальний «чохол», під яким клітини рани дедиференціюються та утворюють багатоклітинну бластему – скупчення активно проліферуючих незрілих клітин. Протягом наступних діб ці дедиференційовані клітини інтенсивно проліферують і повторно диференціюються у потрібні типи, регенеруючи всі втрачені структури плавця [54].

Таким чином, хвостовий плавець рибки зебри після ампутації здатен повністю відновитись – як за розміром, так і за формою та функцією – впродовж лише кількох тижнів (для порівняння, у ссавців відсутня здатність до регенерації кінцівок або плавців). Висока регенеративна здатність плавця в поєднанні з його відносно простою анатомією та доступністю для маніпуляцій зробили його популярною моделлю для вивчення клітинно-молекулярних механізмів відновлення [56].

Серце дорослого *Danio rerio* також має виняткову здатність до відновлення після тяжких ушкоджень, що кардинально відрізняє його від серця ссавців. Зокрема, на відміну від людини (в якій після інфаркту практично не відбувається утворення нових кардіоміоцитів і формується необоротний рубець), рибки зебра можуть повністю відновити функцію серця після різноманітних ушкоджень

міокарда [57]. Класичні експерименти показали, що *Danio rerio* здатна регенерувати до ~20% маси шлуночка після його часткової резекції: протягом перших ~7–9 діб на місці рани утворюється тимчасовий фібриновий згусток, який надалі заміщується новими м'язовими клітинами, і вже через ~60 діб структура та насосна функція серця повністю відновлюються [55].

Ряд подальших досліджень продемонстрував, що серце риб може регенерувати і після ушкодження, подібного до інфаркту міокарда – наприклад, після кріоіндукованої загибелі приблизно третини кардіоміоцитів шлуночка, вихідна кількість серцевих клітин відновлюється приблизно за 30 діб [58].

В основі цього феномену лежить унікальний механізм: регенерація серця у даніо реріо відбувається за рахунок дедиференціації та проліферації вцілілих зрілих кардіоміоцитів, які повторно входять у клітинний цикл та заміщують загиблий міокард [58]. Такий шлях забезпечує повну репарацію серця без формування постійного рубця. Після початкового колагенового зарубцювання включаються механізми ремоделювання – рубцева тканина поступово розсмоктується та заміщується новими скоротливими кардіоміоцитами [55]. Ці унікальні властивості роблять серце рибки зебри ключовою моделлю для пошуку регенеративних механізмів, потенційно придатних для стимуляції відновлення серця у ссавців.

Нервова система рибок також зберігає високий регенеративний потенціал протягом усього життя, на відміну від ссавців, у яких здатність до відновлення центральної нервової системи різко обмежена. Дорослі особини *Danio rerio* можуть успішно регенерувати як периферичну, так і центральну нервову тканину – зокрема спинний мозок після повної травми, а також нейрони головного мозку (наприклад, теленцефалона) та сітківки ока [59].

Показово, що після пошкодження спинного мозку у риб вже протягом ~6 тижнів відновлюється рухомість і функція, тоді як у ссавців така травма призводить до незворотної втрати функцій. Також *Danio rerio* використовується як модель для дослідження регенерації спинного мозку. Встановлено, що успішне загоєння та відновлення рухових функцій у цих риб залежить від

довічного збереження мультипотентних нейральних прогеніторних клітин та залучення про-регенеративних сигналів від інших клітин як всередині, так і поза межами спинного мозку [60].

Дійсно, у регенерації нервових тканин рибок вирішальну роль відіграють власні тканинні стовбурові клітини. Наприклад, при пошкодженні переднього мозку (теленцефалону) нові нейрони утворюються з субпопуляції радіальних гліальних клітин, які в нормі виконують роль нейральних стовбурових клітин у дорослому мозку [54]. Таким чином, модель регенерації нервової тканини у *Danio rerio* дає цінну інформацію про те, як можна стимулювати сплячі регенеративні механізми мозку та сітківки в умовах травми або нейродегенеративних хвороб.

У дослідженнях на данію реріо було виявлено низку ключових загальних механізмів регенерації тканин, таких як контрольоване запалення, активація клітинного поділу, повторна диференціація та ремоделювання позаклітинного середовища.

Загалом процес відновлення у риб (як і у інших організмів) можна умовно поділити на кілька фаз. Початкова фаза після травми – це запальна реакція. У пошкоджену зону швидко мігрують імунні клітини (нейтрофіли, макрофаги), які поглинають загиблі клітини та запобігають інфекції.

Майже паралельно відбувається закриття рани тимчасовим епітеліальним покривом і відкладення позаклітинного матриксу фібробластами – цей процес створює структурну підтримку для тканини, що загоюється, але також призводить до формування початкового фіброзного рубця. Якщо ж реалізується повноцінна регенерація, рубцювання носить тимчасовий характер. Ушкоджена область починає заміщуватись новою тканиною у багатокроковому процесі, що зазвичай включає дедиференціацію деяких зрілих клітин, їх активну проліферацію та наступну ре-диференціацію у потрібні клітинні типи. Паралельно зникають ознаки фіброзу – тимчасовий рубець поступово розсмоктується, оскільки новоутворені клітини відновлюють нормальну

архітектоніку тканини. У кінцевому підсумку регенерована ділянка набуває тієї ж морфології та функціональності, що й до ушкодження [54].

Важливо зазначити, що стадія проліферації є вирішальною для відбудови втрачених структур – саме в цей період загоєння відбувається масована проліферація паренхіматозних клітин та їх диференціювання під впливом факторів росту, що частково продукуються імунними клітинами. Фаза ремоделювання завершує процес регенерації. У цей час відбувається перебудова позаклітинного матриксу та архітектури новоствореної тканини. Зокрема, макрофаги та фібробласти стимулюють синтез і впорядковане відкладення нових компонентів позаклітинного матриксу, а також секретують матриксні металопротеїнази, що модифікують та організують матрикс, сприяючи відновленню нормальної структури тканини [61].

У результаті узгодженої роботи цих механізмів регенерована тканина набуває повної функціональної цінності та інтегрується в орган, як рівноправна заміна втраченої ділянки.

## **Висновки до розділу 1**

У ході аналізу літературних джерел було встановлено, що мезенхімальні стовбурові клітини (МСК) є перспективним інструментом регенеративної медицини завдяки здатності до самовідновлення, мультипотентної диференціації та вираженої паракринної активності. Особливу увагу приділено мезенхімальним стовбуровим клітинам жирової тканини, які характеризуються високою доступністю, значним клітинним виходом та широким терапевтичним потенціалом.

Показано, що стромально-васкулярна фракція (СВФ) жирової тканини є цінним джерелом МСК та інших регенеративно активних клітин, а методи її отримання можуть суттєво впливати на кількісні та якісні характеристики клітинної популяції. Проаналізовано біологічні властивості МСК жирової

тканини та їхню роль у процесах ангіогенезу, імуномодуляції та відновлення тканин.

Окрему увагу в літературному огляді приділено кондиціонованому середовищу МСК як перспективному безклітинному підходу, що реалізує терапевтичні ефекти МСК через комплекс біологічно активних факторів, зокрема цитокінів, факторів росту та позаклітинних везикул. Показано, що застосування кондиціонованого середовища може мати низку переваг порівняно з клітинною терапією, зокрема знижену імуногенність та кращу стандартизованість.

Обґрунтовано доцільність використання *Danio rerio* як модельного організму для вивчення регенеративних процесів завдяки його високій здатності до регенерації, експериментальній доступності та можливості морфофункціональної оцінки відновлення тканин. Таким чином, проведений літературний аналіз підтверджує актуальність і наукову обґрунтованість дослідження впливу кондиціонованого середовища МСК зі СВФ жирової тканини людини на регенерацію хвостового плавця *Danio rerio*.

## РОЗДІЛ 2

### МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

#### 2.1. Об'єкти дослідження: риби *Danio rerio* та умови утримання

У даній роботі експериментальною моделлю виступали тропічні акваріумні рибки Даніо реріо (*Danio rerio*), відомі також як зебрафіш. Важливо зазначити, що в ході експерименту використовувалися трансгенні флуоресцентні особини комерційної лінії GloFish (рис.2.1).



Рис 2.1. *Danio rerio* GloFish

Генетично модифіковані GloFish мають флуоресцентний білок (отриманий від коралів або медуз) у своєму геномі, що надає їм яскравого неонового забарвлення. Окрім наявності цього гена і забарвлення, GloFish за біологічними та морфологічними характеристиками не має суттєвих відмінностей від звичайних Даніо реріо. У них аналогічна тривалість життя, рівень здоров'я та вимоги до утримання, як і у диких форм зебрафіш. Це мирні зграйні рибки розміром ~5 см, які широко використовуються як модельні організми в дослідженнях завдяки високій здатності до регенерації тканин і значній схожості

їх органів з органами ссавців на анатомічному, фізіологічному і молекулярному рівнях. Зокрема, дорослі особини Даніо здатні повністю відновлювати пошкоджені або втрачені частини тіла – серце, сітківку ока, спинний мозок, а також плавці [62]. Така виняткова здатність до регенерації зробила зебрафіш популярною моделлю для вивчення процесів відновлення тканин у хребетних. Протягом останніх десятиліть ампутація хвостового плавника *Danio rerio* стала стандартним тестом для дослідження регенерації. Дорослий хвостовий (каудальний) плавець зебрафіш має майже необмежену здатність до відновлення і після ампутації регенерує повністю, відтворюючи втрачену структуру [63]. Ця модель регенерації є простою у виконанні, недорогою і високопродуктивною, що сприяло її широкому застосуванню у різних дослідженнях, у тому числі при скринінгу генів, лікарських речовин та різних факторів, які можуть впливати на процес загоєння і відновлення тканин [62].

## **2.2. Утримання риб**

Рибки були розміщені в лабораторії на базі Арктичного центру України. Використовувалися скляні акваріуми об'ємом 25 л, встановлені на металевому стелажі. Для забезпечення належних умов життєдіяльності риб в акваріуми було встановлено необхідне обладнання: внутрішні фільтри для механічної та біологічної очистки води, компресори (аератори) для насичення води киснем, а також терморегулятори з термометрами для підтримання стабільної температури (рис.2.2). Підтримувалася оптимальна для даніо температура води  $\sim 28^{\circ}\text{C}$  (в межах  $26\text{--}29^{\circ}\text{C}$ ), що відповідає літературним рекомендаціям (стандартна температура утримання зебрафіш у лабораторіях становить  $\sim 28,5^{\circ}\text{C}$ . Допустимі добові коливання температури не перевищували  $\pm 2^{\circ}\text{C}$ . Освітлення акваріумів здійснювалося в автоматичному режимі, дотримуючись штучного фотоперіоду 14 годин світла / 10 годин темряви, що також відповідає прийнятим стандартам утримання цих [64]. Такий світловий режим (14:10) сприяє нормальній

активності та розмноженню данію, і широко використовується в практиці акваріумного розведення та експериментів.



Рис. 2.2. Загальний вигляд експериментальної установки та акваріальної системи

Якість води контролювалася протягом усього періоду експерименту. В якості середовища, де перебували риби, використовували відстояну водопровідну воду, яка перед заселенням риб відстоювалася не менше 3 діб при кімнатній температурі. Для підготовки води застосовували комерційні кондиціонери: *Tetra AquaSafe* у дозі 12,5 мл на 25 л та *Tetra SafeStart* у дозі 16,6 мл на 25 л (відповідно до інструкцій виробника). *Tetra AquaSafe* нейтралізує шкідливі домішки водопровідної води, зокрема хлор і важкі метали, та захищає зябра і слизову риб завдяки додаванню колоїдів і вітамінів. Крім того, до складу *AquaSafe* входить оптимізований комплекс вітамінів групи В, що знижує стрес у риб під час підмін води. *Tetra SafeStart* містить живі нітрифікуючі бактерії, які миттєво створюють в акваріумі біологічно активне середовище. Внесення цього препарату прискорює встановлення біофільтра, розщеплення амонію та нітритів,

що дозволяє запускати риб у новий акваріум одразу після обробки води. Таким чином, використання AquaSafe та SafeStart забезпечувало безпечне середовище для риб і зменшувало стрес адаптації.

Перед запуском риб, підготовлена вода доводилася до необхідних параметрів та температури. У період адаптації регулярно перевірялися основні гідрохімічні показники: температура, рівень рН, вміст азотистих сполук та кисню. Водневий показник підтримувався на рівні рН  $\sim 7,0$  (в межах 6,8–7,5), що є оптимальним діапазоном для виду *Danio rerio* [3]. Згідно з рекомендаціями з утримання зебрафіш, нейтральний або слабколужний рН 7,0–7,5 є найбільш сприятливим для їх здоров'я і для функціонування біофільтра. Періодично (раз на тиждень) здійснювали часткову підміну  $\sim 20\%$  об'єму води на свіжу відстояну, щоб запобігти накопиченню нітратів та забезпечити стабільність хімічного складу. В акваріумах використовувалася постійна аерація. Концентрація розчиненого кисню утримувалась на рівні не менше 6–7 мг/л (що перевищує мінімально необхідний для даніо рівень  $\sim 5$  мг/л) [65]. Жорсткість води та інші параметри відповідали умовам тропічного прісноводного акваріума (загальна твердість  $\sim 100$  мг/л  $\text{CaCO}_3$ , відсутність хлору, відсутність аміаку та нітриту, нітрати  $< 50$  мг/л), згідно зі стандартами якості води для зебрафіш.

### **2.3. Розміщення та адаптація риб**

Після підготовки акваріумів і води, у них було запуснено риб. Риб доставили до лабораторії та випустили у два акваріуми: один призначений для експериментальної групи, інший – для контрольної. Густота посадки становила 20 особин на 25-літровий акваріум ( $\approx 1$  риба на 1,25 л), що відповідало рекомендованим нормам утримання дрібних коропових. Перед випуском кожної партії риб проводилася поступова акліматизація до нової води (методом поетапного змішування води протягом  $\sim 30$  хв), щоб уникнути різкого шоку від можливих відмінностей параметрів. Після заселення рибкам було надано адаптаційний період тривалістю 10 діб (з 8.10 до 18.10) перед початком будь-

яких процедур. У цей час вони знаходилися у спокої, звикали до умов утримання та відновлювалися після стресу транспортування. Умови середовища підтримувалися стабільними, а риби щоденно оглядалися на ознаки стресу чи захворювань. На етапі адаптації не спостерігалось жодного випадку загибелі, рибки активно плавали, брали корм, що свідчило про успішне акліматизування.

#### **2.4. Годування риб**

Раціон і режим годівлі відповідав природним потребам та забезпечував швидкий ріст і відновлення сил риб. Дорослих даніо годували 2 рази на добу високоякісним сухим кормом для даніо (*JBL ProNovo Danio Grano*, гранульований). Годівлю здійснювали вранці о ~9:00 та ввечері о ~19:00 ( $\pm 30$  хв). Такий інтервал між годуваннями імітує природний режим харчування й дозволяє риbam повністю перетравити корм між прийомами. Корм вносили порціями, які риби повністю з'їдали за 2–3 хвилини, щоб уникнути надлишку їжі та забруднення води. *JBL ProNovo Danio* – це збалансований корм, спеціально розроблений для родини коропових (до якої належать даніо); він містить >40% протеїну, якісний риб'ячий жир, вітаміни і мікроелементи, необхідні для здоров'я риб та регенерації тканин. Орієнтовна норма годування становила ~5% маси тіла риби на добу, розподілена на два прийоми (вранці і ввечері), що відповідає літературним даним для даного виду. Один раз на тиждень (щонеділі) влаштовували розвантажувальний день – риб не годували протягом 24 годин. Така періодична пауза в годівлі рекомендується акваріумною практикою для покращення травлення та профілактики ожиріння у риб. Загалом, обрана схема годівлі та дієта забезпечували риб достатньою енергією та поживними речовинами, необхідними для успішного перебігу процесів загоєння і регенерації плавців.

## 2.5. Анестезія риб та методика ампутації хвостового плавця

Використання риб *Danio rerio* у даному дослідженні розглядалося з урахуванням етичних принципів поводження з лабораторними тваринами. Проведення експериментальних маніпуляцій ґрунтувалося на міжнародно визнаному принципі 3R (Replacement, Reduction, Refinement), що передбачає обґрунтований вибір модельного організму, мінімізацію кількості тварин та зниження рівня больових відчуттів і стресу. Усі процедури виконувалися із застосуванням адекватної анестезії, що відповідає вимогам Директиви Європейського Союзу 2010/63/EU щодо захисту тварин, які використовуються в наукових цілях, а також рекомендаціям ARRIVE Guidelines 2.0 щодо етичного планування та проведення експериментів. Такий підхід забезпечує гуманне поводження з тваринами та етичну прийнятність отриманих результатів.

Основним експериментальним втручанням у даній роботі була часткова ампутація хвостового плавника *Danio rerio* для подальшого спостереження за регенерацією. Щоб мінімізувати больові відчуття та стрес у риб під час цієї процедури, застосовувалася загальна анестезія. В якості анестетика використовували ефірну гвоздичну олію – натуральний засіб, відомий своїми седативними і знеболювальними властивостями у риб. Гвоздична олія містить 70–95% евгенолу (активний компонент), який діє як інгаляційний анестетик і широко використовується для анестезії риб різних видів [66]. Перевагами гвоздичної олії є її доступність, низька вартість та відсутність необхідності складного обладнання; тому вона стала популярною альтернативою традиційному анестетику MS-222 (tricaine) у дослідах на даніо-репіо.

Гвоздична олія є гідрофобною речовиною, тому перед додаванням у воду її розчиняли в етанолі (96%) для утворення стабільного розчину-носія (рис.2.3). Було приготовлено маточний розчин гвоздичної олії у спирті: 1 мл 100% ефірної олії гвоздики змішували з 1,5 мл 95% етилового спирту, після чого додавали 7,5 мл дистильованої води при інтенсивному збовтуванні. Таким чином, загальний об'єм маточного розчину становив 10 мл; концентрація гвоздичної олії в ньому

~10% (об/об). Використання етанолу (15% від об'єму) сприяє рівномірному розподілу евгенолу у водному середовищі. Така методика відповідає літературним джерелам, де рекомендовано спершу розчинити гвоздичну олію в етиловому спирті у співвідношенні 1:9 або 1:10, а далі отриманий концентрат розводити водою до потрібної концентрації перед застосуванням [67].



Рис. 2.3. Ефірна олія гвоздики, застосована як анестетик для риб

Перед проведенням основних операцій на плавниках була здійснена пробна анестезія на 3 рибках, щоб визначити ефективне та безпечне дозування. Спочатку в якості тестової дози було використано 0,6 мл маточного розчину на 1 л води. Це відповідає концентрації ~0,06 мл чистої гвоздичної олії на літр, тобто приблизно 60 ppm евгенолу, що знаходиться в межах рекомендованого діапазону для глибокої анестезії данію. За даними літератури, для досягнення хірургічної (глибокої) стадії анестезії у зебрафіш необхідна концентрація евгенолу 60–100 ppm протягом кількох хвилин [66], тому обрана нами початкова доза (~60 ppm) очікувано мала викликати достатнє знеболення. Риби поміщалися в ємність з анестезувальним розчином (ємність ~1 л) і уважно спостерігалися. При концентрації 0,6 мл/л через 1–2 хвилини експозиції у риб з'являлися ознаки седативного ефекту: уповільнення рухів, порушення рівноваги і зниження

реакції на зовнішні подразники. За ~2–3 хвилини досягалася легка анестезія – риби переставали активно плавати, реагували лише на сильні стимули, але при цьому їх дихання (рухи зябер) залишалось ритмічним. Цього рівня було достатньо для проведення маніпуляцій.

Отже, для подальших процедур ми використовували гвоздичний анестетик у концентрації 0,6 мл маточного розчину на 1 л води. Оскільки експеримент тривав кілька тижнів і передбачав повторні анестезії тих самих риб, було відзначено поступове підвищення толерантності: після декількох експозицій час індукції анестезії збільшувався. Тому, починаючи з другого тижня експерименту, дозу дещо підвищили – до 0,8 мл маточного розчину на 1 л (тобто ~80 ppm евгенолу). Це знаходиться все ще в безпечному діапазоні, оскільки літературно допустимі концентрації евгенолу для короткочасної анестезії даніо сягають 100 ppm без летальних наслідків [67]. Збільшення концентрації дозволило компенсувати ефект звикання і підтримувати необхідну глибину анестезії протягом всього експерименту.

Для анестезії кожен рибку виловлювали з акваріуму сачком і переносили у невеликий окремий контейнер (ємністю ~1 л) з підготовленим розчином гвоздичної олії. Температура цього розчину підтримувалася на рівні ~27 °C (аналогічній, як і в основному акваріумі), щоб уникнути температурного шоку. Риб залишали в анестетику до настання необхідної стадії. Ми орієнтувалися на III стадію наркозу (хірургічну) – коли риба лежить на боці, не плаває та не реагує на дотик до хвоста або плавців, але зяброві кришки ще повільно рухаються (дихання сповільнене, але не зупинене). Час досягнення такої стадії варіював від 30 секунд до ~2,5 хвилин, залежно від індивідуальної чутливості та того, перша це анестезія для риби чи повторна. Ми намагалися не перевищувати 3 хв експозиції, оскільки передозування гвоздичною олією може призводити до дихальної депресії у риб та зупинки серця [68]. Після досягнення необхідного рівня анестезії рибина негайно переносилася на підготовлену вологу поверхню для проведення операції. На час маніпуляцій рибу періодично зрошували водою з акваріуму, щоб зволожувати зябра і шкіру. Загальний час, який кожна рибка

проводила поза водою під час операції, не перевищував 30–60 секунд, що безпечно за умови глибокої анестезії (даніо здатні переносити короткочасне знаходження поза водою при зволжених зябрах). Після закінчення процедури рибу негайно переміщали у відновлювальний контейнер з чистою акваріумною водою без анестетика.

## 2.6. Ампутація хвостового плавця

Операцію проводили у стерильних умовах (робоче місце, інструменти) з дотриманням правил асептики, щоб запобігти інфікуванню раневої поверхні. Для візуальної фіксації стану плавця безпосередньо до втручання здійснювали фотографування. Після цього виконували відсічення дистальної частини хвостового плавця. Орієнтовно ампутували близько 50% довжини хвостового плавця – тобто відрізали половину хвоста, рахуючи від кінчика до основи (до рівня приблизно середини променів хвостового скелету) (рис.2.4). Такий обсяг резекції був обраний на підставі попереднього досвіду та літературних протоколів, де зазвичай відсікають 40–50% площі плавця для моделювання регенерації [62].

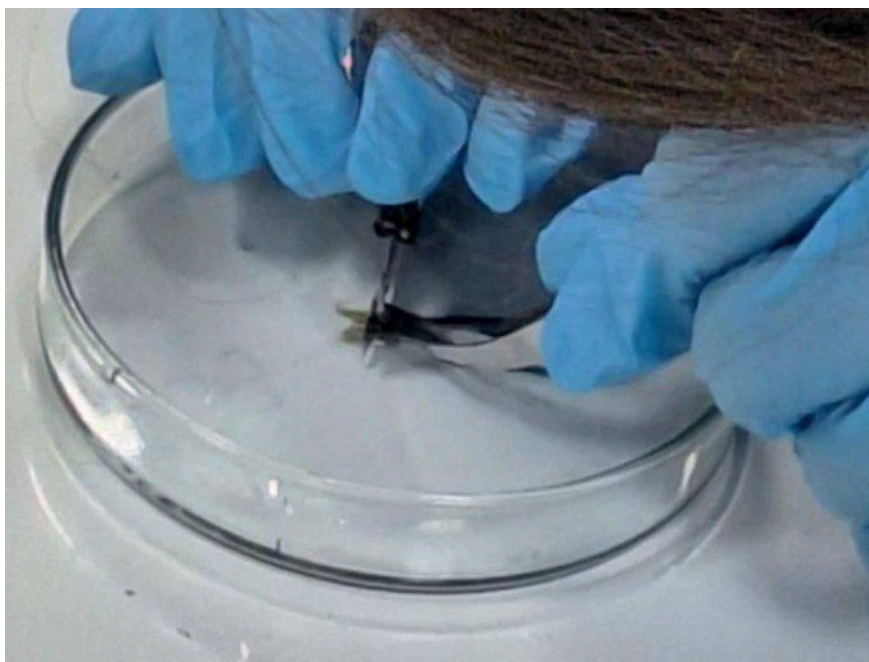


Рис. 2.4. Процес часткової ампутації хвостового плавця *Danio rerio* після анестезії

Така велика рана гарантує запуск повноцінної регенераційної відповіді, але при цьому не зачіпає життєво важливих структур і не є летальною для риби. Ампутацію проводили поперек осі тіла (перпендикулярно краніокаудальній осі риби) одним чітким рухом, щоб краї рани були рівними. Для розрізання тканини плавця випробовували різні інструменти – маленькі хірургічні ножиці, скальпель, лезо безпечної бритви. Найбільш зручним виявилось стерильне бритвене лезо: воно забезпечувало дуже гострий і рівний зріз, мінімально травмуючи тканини. Тому основна маса операцій виконувалася саме лезом. Для забезпечення умов стерильності використовувалась спиртівка і безпосередньо сам спирт для дезінфекції. При розрізанні товщі хвостового плавця (який складається з променів – кісткових сегментів, оточених сполучною і епітеліальною тканинами) спостерігалася незначна кровотеча або взагалі її не було, оскільки дрібні судини плавця швидко спазмуються. Одразу після відсікання хвоста здійснювали повторну фотофіксацію ранки (стан “відразу після ампутації”) для подальших вимірювань довжини регенованого сегменту. Потім рибку негайно повертали у акваріумну воду для відновлення від наркозу.

## **2.7. Пробудження та післяопераційний догляд**

Після повернення у чисту воду, зазвичай за 5–10 хвилин рибки повністю приходили до тями: відновлювали рівновагу, активне дихання та плавання. Як тільки риба впевнено попливла і реагувала на зовнішні подразники, її випускали назад в основний акваріум. Впродовж перших годин після операції рибки спостерігалися на предмет ускладнень. У більшості випадків вони швидко поверталися до нормальної поведінки – плавали в зграї, виявляли апетит уже при наступному годуванні. На хвостовому плавці була помітна свіжа ранка з рівним зрізом. Жодних ознак інфекції чи грибкового ураження ран протягом експерименту не відзначено. Загалом, процедуру ампутації перенесли практично всі риби без летальних випадків, за винятком однієї особини з контрольної групи, яка загинула через ~24 години після операції (ймовірно внаслідок індивідуальної

слабкості або ускладнень наркозу). В експериментальній групі смертність була нульовою. Слід зазначити, що за даними літератури, при правильній техніці і забезпеченні асептики, ампутація плавця у данію не призводить до значної летальності. Проте були знайдено дані, що подовжений наркоз або вторинні інфекції можуть викликати загибель деяких особин [62]. У нашому досліді втрати були мінімальними, що підтверджує низьку травматичність обраної методики.

## **2.8. Тривалість операційної сесії**

Комплекс заходів від вилову риби до її повернення в акваріум займав приблизно 30 хвилин для групи з 20 осіб. Це включало анестезію (до 3 хв на рибу), фотофіксацію, ампутацію (~0,5 хв), повторне фото та пробудження у воді (5–10 хв). Процес проводився почергово для кожної риби, щоб усі маніпуляції виконати за один наркоз. Таким чином, вся партія (20 риб) була прооперована в один день на початку експерименту. В подальшому, при контрольних вимірюваннях на 7, 14 і 21 добу, теж застосовували короткочасну анестезію для фотографування плавців, але без хірургічних втручань. Такі сеанси тривали менше – близько 15 хвилин (анестезія + фотографування декількох риб та їх пробудження). Ми прагнули мінімізувати тривалість та частоту впливу анестетика, зважаючи на те, що повторні наркози можуть мати кумулятивний стресовий ефект [8]. Проте в нашому протоколі частота була невисокою (1 раз на тиждень) і концентрації еугенолу помірні, тому негативного впливу на здоров'я риб не зафіксовано – навпаки, контрольні риби в нашому досліді продемонстрували нормальне загоєння плавця протягом трьох тижнів, що свідчить про те, що застосування гвоздичної анестезії не завадило регенераційним процесам.

## 2.9. Кондиціоноване середовище МСК та дизайн експерименту

Жирова тканина людини складається із стромально-васкулярної фракції (СВФ), зрілих адипоцитів та позаклітинного матриксу; СВФ включає мезенхімальні стовбурові клітини (МСК ЖТ), прекурсори адипоцитів, ендотеліальні клітини та макрофаги. Колагеназа зазвичай застосовується для ферментативного розщеплення жирової тканини з метою ізоляції СВФ або безпосередньо МСК ЖТ. МСК ЖТ як різновид МСК здатні до самовідновлення, мультипотентної диференціації та секреції сотень цитокінів. Завдяки своїй чисельності та доступності МСК ЖТ розглядаються як один із найперспективніших типів дорослих стовбурових клітин для клінічного застосування, широко використовуючись у тканинній інженерії та регенеративній медицині. Відомо, що паракринні цитокіни, екзосоми та інші активні речовини є основними чинниками, через які МСК ЖТ реалізують свої біологічні ефекти. В цьому контексті все більшу увагу привертають позаклітинні похідні МСК ЖТ – кондиціоноване середовище та екзосоми – як альтернативні підходи до прямої клітинної терапії.

Для культивування ізольованих МСК ЖТ *in vitro* використовують поживні середовища, збагачені сироваткою. Згідно з протоколами отримання КС МСК ЖТ, клітини спочатку висівають у базальне середовище із додаванням 10% фетальної бичачої сироватки (ФБС) і культивують до досягнення моношаром ~70–80% конфлуентності. ФБС забезпечує необхідні фактори росту для проліферації. Водночас його присутність на етапі збору кондиціонованого середовища є небажаною через можливість контамінації сторонніми екзосомами. Зокрема, ФБС є поширеною добавкою для культур клітин, але також слугує джерелом контамінантів – таких як екзогенні бичачі позаклітинні везикули, РНК та білкові агрегати – що можуть потрапляти у зразки везикул, отриманих із клітин. Тому при досягненні необхідної густини культури ФБС вилучають: живильне середовище замінюють на безсироваткове і продовжують культивування протягом 48–72 годин. Альтернативно, застосовують середовище

з екзосом-деплетованою сироваткою – для цього ФБС піддають попередньому ультрацентрифугуванню (напр., 100 000×g, 18 год) з метою видалення екзогенних екзосом. Після інкубації без ФБС зібране кондиціоноване середовище (супернатант) піддають очищенню від клітин та решток: центрифугують при 1000 g протягом 5 хв, після чого фільтрують через мембранний фільтр порозмірами 0,22 мкм. Для усунення з кондиціонованого середовища мікроезосом, зокрема екзосом, додають етапи високошвидкісного центрифугування. Зокрема, протоколи передбачають послідовне центрифугування зразків при 300 g (10 хв), 2 000 g (10 хв) та 10 000 g (30 хв) для вилучення клітин і уламків, а далі ультрацентрифугування надосаду при ~100 000 g протягом ~1 години. В результаті отримують очищене кондиціоноване середовище МСК ЖТ, що містить лише секреторні фактори клітин без домішок ФБС чи сторонніх екзосом, яке придатне для подальшого використання у дослідженнях або терапевтичних застосуваннях.

У даній роботі для отримання кондиціонованого середовища використовували мезенхімальні стовбурові клітини жирової тканини людини, що зумовлено трансляційною спрямованістю дослідження та орієнтацією на потенційне біомедичне застосування отриманих результатів. Порівняно з МСК тваринного походження (зокрема свиней чи великої рогатої худоби), МСК людини характеризуються найбільшою клінічною релевантністю, оскільки їх секреторний профіль, склад паракринних факторів і біологічна активність відповідають фізіологічним умовам організму людини та не потребують додаткової міжвидової екстраполяції результатів.

Отримання та культивування МСК жирової тканини людини, а також формування кондиціонованого середовища, здійснювалося профільною медичною установою Reocell, яка спеціалізується на дослідженнях і клінічному застосуванні стовбурових клітин. У межах даної роботи використовувалося готове кондиціоноване середовище, надане установою, без безпосереднього залучення авторки до процедур забору біологічного матеріалу чи первинного культивування клітин.

Отримання донорського матеріалу в медичній установі Reocell здійснюється відповідно до чинних етичних норм та законодавчих вимог, з обов'язковим інформованим добровільним погодженням донорів. Таким чином, етична відповідальність за дотримання біоетичних принципів та наявність відповідних дозволів покладається на спеціалізовану медичну установу, тоді як у межах даної роботи проводилася виключно експериментальна оцінка біологічної активності кондиціонованого середовища та його впливу на регенераційні процеси у модельному організмі *Danio rerio*.

## **2.10. Експериментальний дизайн**

Для оцінки впливу кондиціонованого середовища на регенерацію плавця риб було сформовано дві групи по 20 особин: контрольна група та дослідна група. Усі риби обох груп пройшли через процедуру стандартної ампутації хвостового плавця, описану вище, щоб задати однаковий стартовий рівень травми. Далі протягом 21 дня регенерації дослідна група піддавалася впливу КС, а контрольна – ні.

Перед початком впливу було вирішено перевірити безпечність вибраної концентрації КС для риб. Хоча кондиціоноване середовище є біологічним продуктом і очікувано нетоксичне, важливо було впевнитись, що додавання його у воду не спричинить гострої інтоксикації або загибелі риб (наприклад, через можливу зміну рН, осмотичного тиску чи наявність залишків реагентів). Для цього за 4 дні до ампутації було проведено пробне занурення кількох риб у розчин з невеликою концентрацією КС. Ми взяли 3 риби з контрольної групи (на випадок, якщо б стався негативний ефект, це б не позначилося на основній дослідній групі) і помістили їх у окремий акваріум з об'ємом ~1 л, де концентрація кондиціонованого середовища становила 1%. Тобто, до ~990 мл акваріумної води було додано 10 мл КС. Риби перебували у цьому розчині протягом 24 годин, після чого їх повернули до основного акваріуму. Упродовж експозиції та наступних днів спостережень не було відзначено жодних

негативних наслідків: всі три рибки були живі, активні, зовні здорові, апетит не погіршився. Це підтвердило, що навіть 1% КС є нешкідливим для даніо. За таких умов ми запланували використовувати основну робочу концентрацію у 5%, яка, ймовірно, теж безпечна. У літературі зустрічаються експерименти з додаванням значно більшої долі КС у середовище зебрафіш – аж до 50–75% для ембріонів [2]. Зокрема, Руссі et al. застосовували 75% КС в середовищі інкубації личинок без летальності, назвавши його “нетоксичною дозою”. Таким чином, наша обрана частка 5% була у багато разів нижчою, і ми очікували повної безпеки.

### **2.11. Застосування кондиціонованого середовища**

Починаючи з другого дня після ампутації плавця (тобто з 2-ї доби регенерації), дослідні риби регулярно зазнавали впливу КС. Відповідно до нашого протоколу, перше занурення риб у розчин з КС відбулося на 2-й день після ампутації. Надалі процедуру повторювали тричі на тиждень з приблизно рівними інтервалами (у понеділок, середу і п'ятницю кожного тижня). Загалом за 14 днів регенерації кожна рибка дослідної групи отримала 6 експозицій КС.

Кожен сеанс полягав у наступному: усіх 20 риб дослідної групи одночасно виловлювали з основного акваріуму і переносили у підготовлений резервуар з розчином кондиціонованого середовища (об'єм ~1 л). Концентрація КС становила 5%: на 950 мл акваріумної води додавали 50 мл концентрату середовища МСК і перемішували. Температура розчину підтримувалася на рівні 27–28 °С. Риби перебували у цьому розчині протягом 1 години. За обраний час риби не виснажуються і не потребують аерації за умови невисокої щільності посадки. Ми забезпечували слабку аерацію під час експозиції, щоб підтримувати вміст кисню. Після закінчення одногодинного періоду всіх риб повертали назад

у їх акваріум, де вони перебували до наступної процедури або кінця експерименту (рис.2.5).



Рис 2.5. Риби дослідної групи, занурені у 5% розчин КС МСК

Протягом експозицій з КС ми спостерігали за поведінкою риб: жодних ознак дискомфорту або токсичного впливу не відзначалося. Кондиціоноване середовище дещо забарвлювало воду у рожевуватий, але це не впливало на прозорість сильно. Після повернення в основний акваріум риби поводитися звично. Таким чином, режим 5%-го КС тричі на тиждень було втілено успішно.

Важливим моментом є час початку регенерації у наших умовах. Формально, за “нульову точку” брали момент одразу після операції. Вже через кілька годин після ампутації у зебрафіш запускається процес загоєння рани: протягом першої доби ранева поверхня покривається багатошаровим епітелієм, а під ним клітини мезенхімального походження утворюють так звану бластему – тканинний зачаток, з якого виростатиме новий плавець. Далі йде стадія інтенсивного росту регенерату: від 2–3 доби до ~2 тижнів постампутації

спостерігається швидке подовження плавця за рахунок проліферації клітин бластами та диференціювання їх у різні тканини (епідерміс, кісткові промені, судини тощо) [63]. Як правило, до кінця першого тижня відновлюється приблизно половина втраченої довжини плавця, а на 2–3 тижень регенерат майже наздоганяє початковий розмір плавця. Ми обрали термін спостереження 21 день, очікуючи, що за цей період хвостові плавці риб практично повністю відновляться (як показують і літературні дані, і наші попередні досліді). Це підтверджено, зокрема, роботами, де демонструється завершення регенерації хвоста зебрафіш приблизно за 3–4 тижні [62]. При такій тривалості можна оцінити не лише початкову швидкість відростання, а й кінцевий результат відновлення.

Протягом тритижневого періоду регенерації стан риб і плавців моніторилися як візуально щоденно, так і за допомогою фотофіксації раз на тиждень. За весь час не було зареєстровано жодного випадку загибелі у дослідній групі. Риби, що отримували КС, виглядали настільки ж активними і здоровими, як і контрольні. Це свідчить про біобезпеку застосованого кондиціонованого середовища, тобто відсутність токсичних або згубних домішок у ньому при використаних концентраціях. Такий результат узгоджується з нещодавніми дослідженнями з використанням КС на зебрафіш. Єдиний летальний випадок, як вже згадувалось, трапився у контролі – одна слабка рибка не пережила операцію. Решта 39 риб успішно завершили експеримент.

## **2.12. Фотофіксація та оцінка регенерації плавця**

Для кількісного оцінювання регенерації хвостових плавців використовували метод фотодокументації з подальшим вимірюванням довжини регенерованої частини. Цей підхід полягає в тому, що кожен експериментальну рибку фотографують у стандартизованих умовах до і після ампутації, а також через певні інтервали часу під час відростання плавця. Потім за фото здійснюють точні виміри метрики регенерації (довжини або площі відновленого фрагменту)

за допомогою графічного аналізу. Такий підхід широко застосовується у дослідженнях регенерації зебрафіш, оскільки дозволяє неінвазивно відстежувати динаміку відновлення у тих самих особин та мінімізує суб'єктивність оцінок [62].

Зйомка проводилася камерою високої роздільності. Для стандартизації умов фотодокументації та подальшого морфометричного аналізу хвостових плавців *Danio rerio* використовували чашку Петрі, яку розташовували на аркуші міліметрового паперу. Це забезпечувало наявність масштабної сітки на кожному зображенні та можливість точної калібрації у програмі ImageJ. Смартфон-камера був жорстко зафіксований на штативі на сталій висоті та куті зйомки, що мінімізувало варіабельність між знімками. Додатково застосовувалося рівномірне штучне освітлення для усунення тіней та покращення якості контурів анатомічних структур (рис. 2.6).

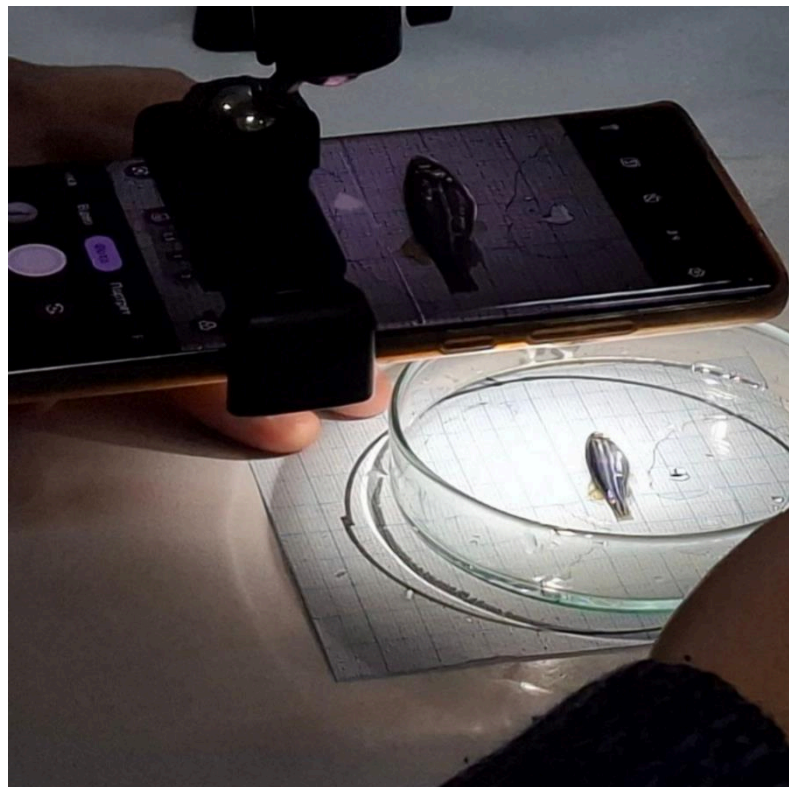


Рис. 2.6. Фотофіксація

Анестезовану рибку (після досягнення потрібного рівня наркозу) акуратно викладали на вологу чашку Петрі. Орієнтували рибку горизонтально, випрямляючи хвостовий плавець так, щоб він лежав плоско, так як це критично для точності вимірів, аби мінімізувати перспективні спотворення. Надлишок

води обережно промокали серветкою, щоб не було відблисків і плавець не був вкритий плівкою води. Після цього швидко, протягом 10–15 секунд, здійснювали фотографування: кілька кадрів з різним фокусом, щоб принаймні один був ідеально різким у ділянці хвоста. Потім рибку негайно повертали у воду для пробудження. Кожна рибка за одну сесію (наприклад, на 7-й день) фотографувалася один раз. Щоб розрізнити особин при подальшому аналізі, ми використовували природний малюнок на тілі GloFish та локальні мітки на плавцях (деякі риби мали незначні відмінності – наприклад, форма крайового променя, пігментні плями тощо). У групі з 20 риб вдалося розрізнити принаймні 5–6 унікальних “індивідуумів” за зовнішніми ознаками. Проте для статистичного узагальнення ми переважно оцінювали середні показники по групі, тому індивідуальний трекінг був необов’язковим. Тим не менш, намагалися по можливості фотографувати одних і тих самих риб для послідовного порівняння.

Знімки робили на таких етапах:

- До ампутації (початковий стан, Day 0 pre) – незадовго до операції, щоб знати вихідну повну довжину плавця у кожної риби.
- Одразу після ампутації (Day 0 post) – для фіксації лінії відрізу і фактично початкової довжини регенераційного зачатку (залишку плавця після відрізання ~50-70 %).
- Через 7 діб після ампутації (7 dpa) – оцінка проміжного результату першого тижня регенерації.
- Через 14 діб (14 dpa) – оцінка на другому тижні.
- Через 21 добу (21 dpa) – кінцева оцінка регенерації.

Таким чином, у нас було по 5 знімків на кожну рибу. Отримані зображення зберігалися у форматі JPEG найвищої якості з вказанням дати та ідентифікатора групи.

## 2.13. Статистична обробка даних

Для кількісного аналізу регенерації було застосовано комп'ютерне планіметричне вимірювання довжини плавців за цифровими зображеннями. Зокрема, використано відкрите програмне забезпечення ImageJ, яке широко застосовується в біологічних дослідженнях для аналізу зображень. Фотографії ампутованих хвостових плавців *Danio rerio* калібрували за відомою масштабною лінійкою і вимірювали довжину регенерату за допомогою інструменту лінійного вимірювання (від площини ампутації до кінчика відновленого фрагмента плавця). Кожне вимірювання проводилося повторно декілька разів для підвищення точності. За підсумком розраховували середнє значення та стандартне відхилення ( $\text{Mean} \pm \text{SD}$ ) для кожної групи на кожній часовій точці.

Отримані дані впорядковували в електронних таблицях MS Excel, де виконувалися первинні обчислення та підготовка даних до статистичного аналізу. Excel як інструмент біостатистики надає необхідний функціонал для розрахунку описової статистики та критеріїв значущості.

Для перевірки статистичних гіпотез щодо різниці середніх значень між контрольною та дослідною вибірками використано двовибірковий t-критерій Стьюдента для незалежних вибірок. Застосування цього параметричного критерію обґрунтоване тим, що порівнювані вибірки мають приблизно нормальний розподіл і близькі дисперсії, а також відповідають умові незалежності, так як кожна рибка належить лише до однієї з груп. Такий t-тест є одним із найпоширеніших методів статистичної перевірки гіпотез при порівнянні двох груп. Розраховували емпіричне значення t-статистики та відповідне значення  $p$  за двостороннім критерієм. Якщо  $p \leq 0,05$ , нульову гіпотезу відхиляли і робили висновок про статистично значущу різницю між групами.

## Висновки до розділу 2

Отже, у розділі “Матеріали і методи” було описано комплекс заходів, спрямованих на дослідження впливу кондиціонованого середовища МСК на регенерацію хвостового плавника *Danio rerio*. Ми створили стандартизовані умови утримання та живлення експериментальних риб, безпечні та ефективні методи анестезії і ампутації плавця, а також регулярне застосування факторів МСК шляхом іммерсії риб у розчин КС. Для кількісного оцінювання результатів використано сучасний безпечний підхід – фотофіксацію та цифровий морфометричний аналіз відновленої довжини плавця. Усі описи методики підтверджуються літературними джерелами та узгоджуються з загальноприйнятими протоколами роботи із зебрафіш. Це забезпечує надійність і відтворюваність наших подальших результатів.

## РОЗДІЛ 3

### РЕЗУЛЬТАТИ ЕКСПЕРИМЕНТУ І ЇХ АНАЛІЗ

#### 3.1. Динаміка регенерації хвостового плавця *Danio rerio*

У результаті експерименту отримано дані (табл. 3.1; табл. 3.1.1) щодо регенерації хвостового плавця у контрольній та дослідній групах риб протягом 21 доби після ампутації.

Таблиця 3.1

Довжина відрегенованої частини хвостового плавця *Danio rerio* (мм) у контрольній та дослідній групах на 1, 7, 14 та 21 добу після ампутації

№	День 1			
	До відрізання		Після відрізання	
	Контрольна	Дослідна	Контрольна	Дослідна
1	14,177	6,861	3,098	1,192
2	12,288	7,287	3,293	1,929
3	9,913	6,912	4,7	3,174
4	6,635	8,308	1,838	2,325
5	7,684	7,185	2,685	1,644
6	7,175	9,4	3,771	3,336
7	7,986	6,103	2,43	2,893
8	6,621	8,074	2,598	3,311
9	5,438	6,35	2,986	1,747
10	7,098	6,617	2,71	2,889
11	6,805	7,252	3,262	3,793
12	6,593	7,026	1,624	2,447
13	5,855	7,595	2,54	2,323
14	6,282	7,917	2,202	2,265
15	7,133	7,584	2,877	1,47
16	6,175	6,597	2,741	2,224
17	9,866	7,705	4,328	2,218
18	6,665	6,547	2,364	2,446
19	7,098	6,49	2,145	2,669
20	9,913	6,504	2,015	1,919

Таблиця 3.1.1

Довжина відрегенованої частини хвостового плавця *Danio rerio* (мм) у контрольній та дослідній групах на 1, 7, 14 та 21 добу після ампутації  
(продовження)

№	День 7		День 14		День 21	
	Контрольна	Дослідна	Контрольна	Дослідна	Контрольна	Дослідна
1	4,853	4,685	5,852	6,66	7,131	5,348
2	3,965	5,137	6,351	7,064	10,295	6,946
3	4,939	6,051	5,695	5,997	7,809	8,705
4	4,287	5,718	6,503	6,653	6,629	7,62
5	4,834	6,19	5,68	5,316	7,173	7,918
6	4,363	5,439	6,814	6,179	7,74	6,78
7	6,222	5,966	5,617	6,543	6,323	7,305
8	5,717	6,293	6,367	5,947	5,621	6,831
9	5,058	5,686	5,28	6,337	6,344	7,182
10	4,978	6,001	6,37	6,633	6,827	6,152
11	6,142	5,472	6,737	6,915	7,274	6,132
12	4,391	5,422	5,875	5,92	6,203	6,926
13	4,343	5,804	6,623	6,278	6,945	6,894
14	4,866	6,99	6,01	6,546	7,894	6,957
15	4,618	7,172	6,201	6,018	7,35	6,709
16	4,119	6,557	6,253	6,604	6,98	6,743
17	5,548	6,455	6,129	6,373	7,08	6,005
18	4,533	5,99	5,942	6,243	6,534	6,83
19	4,695	5,173	5,875	7,558	5,928	7,246
20		5,325		5,793		6,737

На рисунку 3.1 узагальнено динаміку регенерації хвостового плавця у двох групах: наведені середні значення довжини регенованої частини плавця (в

міліметрах) з 1-ї по 21-шу добу, а також вихідна довжина до ампутації для порівняння. Видно, що вже в перший день після відрізання довжина плавця становила в середньому  $\sim 2,5\text{--}3$  мм і була співставною у обох груп (різниця недостовірна,  $p > 0,05$ ). Протягом наступних днів відбувалося поступове відростання тканин плавця як у контролі, так і в досліді, але швидкість цього процесу виявилася різною.

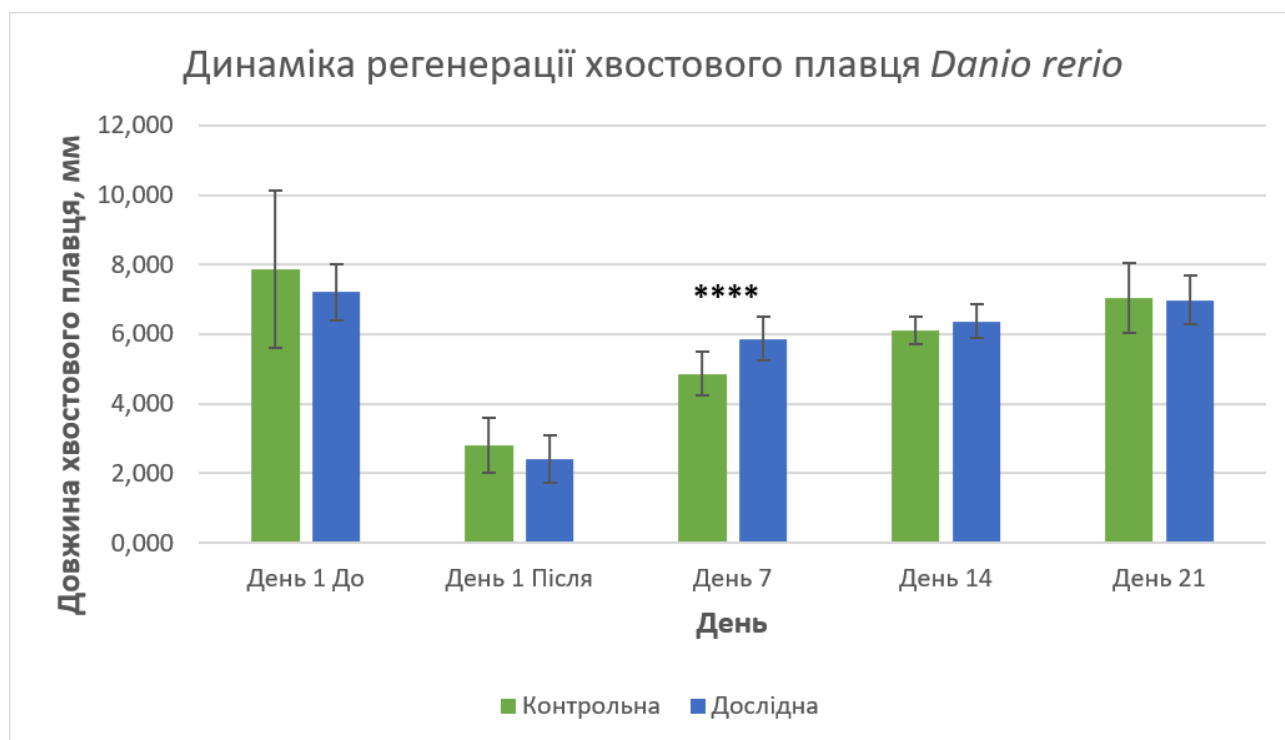


Рис. 3.1. Динаміка регенерації хвостового плавця *Danio rerio*

На 7-му добу після ампутації спостерігалася суттєва різниця між групами: у дослідній групі (риби, яким було додано кондиціоноване середовище) довжина відрегенованого фрагмента плавця була помітно більшою, ніж у контрольних риб. Згідно з даними вимірювань, середня довжина регенерату на 7-й день у контролі становила 4,867 мм, тоді як у досліді – 5,876 мм (табл. 3.2).

Таблиця 3.2.

Показники середньої довжини хвостового плавця (мм) у контрольній та дослідній групах на часових точках

	День 1 До відрізання	День 1 Після відрізання	День 7	День 14	День 21
Контрольна	7,870	2,81	4,867	6,114	7,057
Дослідна	7,216	2,411	5,876	6,379	6,989

Різниця між групами на 7-му добу статистично значуща ( $p < 0,05$ ; табл. 3.3).

Таблиця 3.3.

Порівняння морфометричних показників хвостового плавця (t-критерій Стьюдента) між контрольною та дослідною групами на різних етапах експерименту

	День 1 До	День 1 Після	День 7	День 14	День 21
T критерій	0,23125498	0,092233991	0,000015	0,07768693	0,57437952

На рисунку 3.2 наведено порівняння розподілу довжин регенерованих сегментів плавця на 7-й день у вигляді boxplot-діаграми.

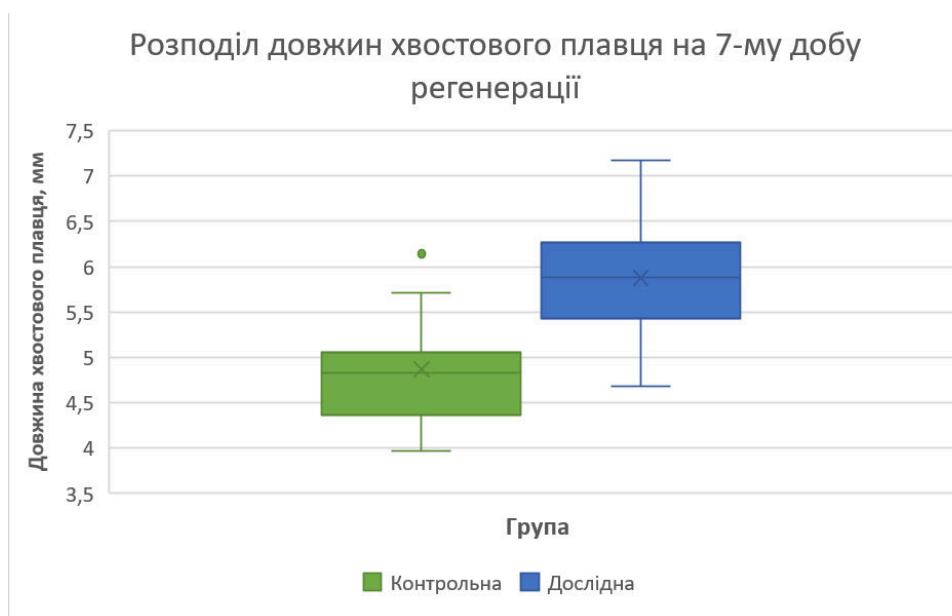


Рис. 3.2. Boxplot-діаграма розподілу довжин регенерованих сегментів хвостового плавця на 7-й день у контрольній та дослідній групах

Видно, що медіана в дослідній вибірці значно вища за контроль, міжквартильний розмах у груп лише частково перекривається, і жодне значення в контрольній групі не досягає рівня верхнього квартилю експериментальної групи. Це вказує на виразний ефект додавання біологічно активних речовин з кондиціонованого середовища на ранніх етапах регенерації. Уже через тиждень

після травми плавці риб, що отримували такий вплив, відросли значно більше, ніж у риб без впливу.

На 14-ту добу регенерації хвостовий плавець зростав в обох групах до більших значень. У контрольній групі середня довжина регенованого плавця досягла 6,114 мм, а в дослідній – близько 6,379 мм (табл. 3.2). Хоча абсолютні значення залишалися дещо більшими в експерименті, різниця між групами на 14-й день вже була статистично недостовірною ( $p > 0,05$ ; табл. 3.3). Тобто, між 7-ю та 14-ю добами швидкість відновлення в контрольних рибах зросла і практично наздогнала риб дослідної групи.

На 21-шу добу спостерігалось майже повне відновлення хвостового плавця в обох групах. Середня довжина регенованого відростка у контрольних риб становила близько 7,057 мм, що дорівнює 89,67% вихідній довжині плавця до ампутації (табл. 3.4). У дослідній групі середня довжина сягнула приблизно 6,898 мм, що становить 96,85 % від вихідної довжини.

Таблиця 3.4

Відсоток регенерації хвостового плавця *Danio rerio* відносно вихідної довжини у контрольній та дослідній групах на різних часових етапах експерименту

	День 7	День 14	День 21
Контрольна	61,842	77,6874206	89,669632
Дослідна	81,430155	88,4007761	96,854213

Однак різниця між групами на 21-шу добу також статистично незначуща ( $p > 0,05$ ). Отже, різниця, що спостерігалася на першому тижні, згодом згладилася: контрольні риби досягли тієї ж кінцевої довжини плавця, що й риби, оброблені кондиціонованим середовищем.

### 3.2. Обговорення результатів

Отримані результати демонструють, що застосування кондиціонованого середовища, збагаченого біологічно активними речовинами, може прискорювати

ранні етапи регенерації хвостового плавця у *Danio rerio*. Зокрема, на 7-й день після ампутації було виявлено статистично значуще збільшення довжини регенерату в дослідній групі порівняно з контролем. Це свідчить про стимулюючий вплив компонентів кондиціонованого середовища на процес загоєння рани та формування регенераційної бластемі протягом першого тижня. Імовірно, такі компоненти включають різноманітні фактори росту, цитокіни та інші сигнальні молекули, що секретуються мезенхімальними стромальними клітинами (МСК) у середовище культивування.

Важливо відзначити, що до 14-ї та тим більше 21-ї доби різниця між дослідною та контрольною групами зникла. Обидві групи досягли високих результатів відновлення плавця за три тижні. Такий результат узгоджується із загальновідомою високою регенераційною здатністю *D. rerio*: за сприятливих умов їхні хвостові плавці здатні повністю відновитися протягом ~2–3 тижнів після ампутації. Згідно джерел ампутовані хвостові плавці дорослих особин відновлюють свою вихідну довжину, форму та внутрішню структуру приблизно за 14–21 день. Наші контрольні риби підтверджують цей феномен. Хоча їхня регенерація спочатку відбувалася повільніше, до кінця третього тижня вони досягли такого ж рівня відновлення, як і риби, стимульовані додатковими факторами. Відсутність достовірної різниці на 14-ту та 21-шу добу свідчить про те, що внутрішні механізми регенерації у *Danio rerio* є надзвичайно ефективними і дозволяють “наздогнати” початкове відставання. Ймовірно, ключовим є те, що кондиціоноване середовище впливає найбільше на ранні стадії – загоєння рани та утворення бластемі. Після того, як бластема сформована і вступає в фазу активного росту та диференціації, темпи росту визначаються переважно внутрішньою програмою регенерації, притаманною виду.

Таким чином, значуща різниця на 7-й день може бути пояснена прискоренням початкових процесів регенерації під впливом біологічно активних молекул із кондиціонованого середовища (наприклад, факторів росту, цитокінів, екзосом тощо). У нашому випадку мезенхімальні стромальні клітини, імовірно, секретували в середовище ряд факторів, що спочатку підвищили клітинну

активність у зоні регенерації (проліферацію клітин бластами, неоваскуляризацію, зниження запалення), але надалі, після вичерпання або деградації цих факторів, темпи регенерації вирівнялися в обох групах. Не виключено також, що на пізніших етапах відновлення (2–3-й тиждень) лімітуючим фактором стала швидкість диференціації та інтеграції новоутворених тканин, яка є подібною у всіх риб і не може бути істотно прискорена зовнішніми впливами понад певну межу.

Додатково слід обговорити можливу роль імунної системи. Мезенхімальні стовбурові клітини відомі своїми імуномодулюючими властивостями: вони зменшують надмірне запалення і сприяють «про-регенераційному» фенотипу макрофагів. У контексті регенерації хвостового плавця це могло означати швидше очищення рани та створення сприятливого середовища для росту бластемних клітин у дослідній групі. Однак, після завершення фази запалення різниця нівелюється, і максимальний обсяг регенерату визначається генетично запрограмованими можливостями. Дані літератури свідчать, що у *D. rerio* регенерація має неабиякий запас міцності: навіть багаторазові повторні ампутації не вичерпують регенераційного потенціалу плавця. Наші спостереження підтверджують цю тезу – контрольні риби зрештою досягли повного відновлення, хоч і з невеликою затримкою.

### **Висновки до розділу 3**

Додавання кондиціонованого середовища, отриманого від MSC, достовірно прискорює ранні стадії регенерації хвостового плавця *Danio rerio*, що проявляється збільшенням довжини регенерату на 7-му добу. Це, вірогідно, зумовлено впливом біологічно активних молекул (факторів росту, цитокінів, екзосом тощо), які стимулюють клітинне розмноження та пригнічують апоптоз у регенеруючих тканинах. На пізніших етапах (14–21 доба) внутрішні механізми регенерації забезпечують майже повне відновлення плавця і нівелюють початкову різницю між групами. Отримані результати узгоджуються з

існуючими уявленнями про високу регенераційну здатність *Danio rerio* та підтверджують перспективність використання кондиціонованих середовищ з MSC для стимуляції репаративних процесів у моделях регенерації. У подальших дослідженнях планується детальніше дослідити молекулярні механізми цього впливу та ідентифікувати ключові фактори секретому MSC, відповідальні за прискорення регенерації.

## РОЗДІЛ 4

### ОХОРОНА ПРАЦІ

#### 4.1. Вступ

У цьому розділі висвітлюються питання пов'язані із забезпеченням безпечних, здорових та нешкідливих умов праці під час розробки та впровадження заходів, які корелюють з основною тематикою дослідницької роботи.

Тематика даної кваліфікаційної роботи — "Вплив кондиціонованого середовища культивування мезенхімальних стовбурових клітин, отриманих зі стромально-васкулярної фракції жирової тканини людини на морфофункціональні особливості регенерації *Danio rerio*" — передбачає виконання комплексних біотехнологічних маніпуляцій, які супроводжуються впливом специфічних виробничих чинників. Ці чинники включають роботу з біологічними агентами (кондиціоноване середовище культивування мезенхімальних стовбурових клітин (МСК) та живі організми), використання хімічних речовин (евгенол, спирт) та відкритий вогонь (спиртівка).

Отже, зміст розділу буде сфокусований на детальному аналізі цих чинників, порівнянні їх із чинними гігієнічними нормативами та розробці конкретних заходів, спрямованих на поліпшення системи управління охороною праці та нормалізацію умов праці.

Забезпечення безпечних умов виконання лабораторних робіт є важливою частиною біотехнологічних процесів, оскільки дозволяє мінімізувати вплив шкідливих та небезпечних факторів, попередити травматизм, забезпечити коректне виконання маніпуляцій та зберегти достовірність результатів експерименту.

Суб'єктом виступає студент - виконавець експериментальної частини досліджень. Необхідність розробки конкретних заходів безпеки обґрунтовується

наявністю як потенційних небезпечних факторів (наприклад, відкрите полум'я, електрообладнання в умовах підвищеної вологості), так і шкідливих виробничих чинників, здатних спричинити професійно-обумовлену захворюваність (біологічні та хімічні агенти).

## 4.2. Аналіз умов праці на робочому місці

### 4.2.1. Організація робочого місця

Робоче місце дослідника поєднує зони для мікрохірургічних маніпуляцій, роботи з акваріумами та обробки даних за допомогою електронних пристроїв. Організація цього місця повинна відповідати ергономічним вимогам, що дозволяють мінімізувати стомлення та підвищити точність маніпуляцій.

Згідно з Вимогами щодо безпеки та захисту здоров'я працівників під час роботи з екранними пристроями (Наказ № 207), навіть при епізодичному використанні смартфонів або ПК для фотографування та обробки результатів, повинні дотримуватись базові ергономічні стандарти [70].

Природне світло має падати збоку, переважно зліва. Світлові прорізи рекомендовано орієнтувати переважно на північ чи північний схід, що забезпечує стабільніше та менш інтенсивне сонячне світло.

Дослідження проводилися у спеціалізованому лабораторному приміщенні Арктичного центру. Приміщення має площу 30 м<sup>2</sup> та висоту 3,0 м. Ці параметри відповідають санітарно-гігієнічним нормам, забезпечуючи не менше 4,5 м<sup>2</sup> площі та 15 м<sup>3</sup> об'єму на одне робоче місце згідно з Гігієнічною класифікацією праці Наказ МОЗ № 248. Стіни та підлога оздоблені вологостійкими матеріалами, що дозволяє проводити регулярне вологе прибирання та дезінфекцію [71].

Робоче місце включало зону утримання об'єктів - металевий стелаж, на якому розміщені акваріуми з дослідною та контрольною групами риб *Danio rerio*. Акваріуми обладнані системою життєзабезпечення, підключеною до

електромережі, яка містить електричні фільтри, компресори для аерації, теплонагрівачі води та світлодіодну стрічку для забезпечення необхідного освітлення.

Для безпосереднього проведення маніпуляцій з рибами використовувався робочий стіл. На столі розміщувався необхідний інструментарій для ампутації: ножиці, скальпель, лезо, а також спиртівка для термічної стерилізації інструментів. Для знерухомлення риб були підготовлені ємності з розчинами анестетиків. Для фотографування результатів використовувався штатив для фіксації телефону. Додатково для забезпечення необхідного рівня освітленості під час операцій використовувалась настільна лампа.

За характером виконуваних завдань, тип робіт - лабораторні дослідження без важкого фізичного навантаження. Категорія за ступенем тяжкості робіт, відповідно до ДСН 3.3.6.042-99, Іб [72].

#### 4.2.2. Перелік шкідливих та небезпечних виробничих чинників

Відповідно до Наказу МОЗ України від 08.04.2014 № 248, під час проведення експерименту на студента можуть впливати такі потенційно шкідливі та небезпечні фактори:

Електробезпека, а саме небезпека ураження електричним струмом виникає через роботу з електрообладнанням акваріумів (нагрівачі, фільтри, компресор) у приміщенні з підвищеною вологістю (вологе/сире приміщення). Висока вологість знижує опір ізоляції обладнання та опір шкіри дослідника, що значно підвищує ризик ураження струмом [ПУЕ, ДСТУ Б В.2.5-82:2016] [71, 73].

Також можливі механічні травми з ризиком біоконтамінації. Це можуть бути різані травми, спричинені гострими інструментами (скальпель, ножиці, лезо) під час ампутації хвостового плавця. Небезпека посилюється одночасним контактом з біологічним матеріалом (кондиціоноване середовище культивування мезенхімальних стовбурових клітин), що перетворює травму на потенційний шлях інфікування чи контамінації [74].

Вплив парів легкозаймистого етанолу та евгенолу (4-алліл-2-метоксифенолу) , які використовуються для анестезії виступають як хімічні чинники. Евгенол може мати подразнювальну або токсичну дію.

Використання відкритого вогню (спиртівка) та зберігання/застосування легкозаймистих рідин (етанол), що створює ризик пожежі або займання в лабораторії [ДБН В.1.1-7:2016], що призводить до пожежної небезпеки [75].

Також важливим фактором є недостатнє/неякісне освітлення та зорова напруга. Недотримання вимог до освітлення (низький рівень, високий коефіцієнт пульсації) спричиняє швидке зорове стомлення та може призвести до зниження точності маніпуляцій [ДБН В.2.5-28:2018, Наказ № 207] [76, 70].

### **4.3. Аналіз шкідливих та небезпечних виробничих чинників**

#### **4.3.1. Електробезпека та пожежна безпека**

Робота з акваріумами, що містять електричні прилади, в умовах підвищеної вологості класифікує цю діяльність як роботу в умовах підвищеної електричної небезпеки.

Електрообладнання акваріумів може мати прямий контакт із водою. Враховуючи класифікацію приміщення як вологе або сире, це вимагає застосування посиленних заходів, що регламентуються ДСТУ Б В.2.5-82:2016 «Електробезпека в будівлях і спорудах. Вимоги до захисних заходів від ураження електричним струмом» [73].

Необхідне забезпечення захисту від прямого та непрямого контакту з електричним струмом. Захист від замикання (захист від ураження, спричиненого виникненням замикання) є критично важливим. Електроустановки (низької напруги) повинні регулярно перевірятися згідно з Правилами технічної експлуатації електроустановок споживачів (ПТЕЕС).

В експериментальній роботі використовується спирт (етанол) як компонент анестезійного розчину та для стерилізації, а також спиртівка як джерело відкритого вогню.

Етанол є легкозаймистою рідиною (ЛЗР), що підвищує категорію приміщення за вибухопожежною та пожежною небезпекою, відповідно до ДСТУ Б В.1.1-36:2016. Робота зі спиртівкою, як джерелом відкритого вогню, вимагає суворого контролю [77].

Вимоги до пожежної безпеки під час використання спирту (особливо його зберігання) повинні відповідати нормативно-правовим актам, що регулюють облік та обіг спиртовмісних речовин. Це включає дотримання ДБН В.1.1-7:2016 «Пожежна безпека об'єктів будівництва» [76].

#### 4.3.2. Виробниче освітлення

Дослідження включає візуальний контроль та високоточні маніпуляції, що вимагають високого класу зорових робіт.

Відповідно до ДБН В.2.5-28:2018 «Природне і штучне освітлення», необхідно забезпечити нормовану освітленість, достатню для запобігання зоровому стомленню. При недостатньому освітленні або високому коефіцієнті пульсації світлового потоку може виникати швидка втома очей та зниження точності рухів, що знову ж таки посилює ризик механічної травми.

Освітленість є важливим фактором для забезпечення точності маніпуляцій та отримання якісних фотознімків. Загальне освітлення лабораторного приміщення зазвичай не забезпечує достатнього рівня видимості для хірургічних процедур із біологічними об'єктами, розмір яких становить менше 1 мм (зокрема, при роботі з плавцями *Danio rerio*). Недостатня освітленість спричиняє швидке зорове стомлення та підвищує ризик механічних травм, таких як порізи.

З огляду на це, під час виконання маніпуляцій застосовують локальне освітлення, що забезпечує концентрований світловий потік у зоні роботи. Відповідно до вимог ДБН В.2.5-28:2018, рівень загального освітлення в

біологічних лабораторіях має становити 300–500 лк, тоді як локальне освітлення дозволяє підтримувати достатню візуальну чіткість при роботі з дрібними структурами [76].

#### 4.3.3. Мікроклімат робочої зони

Мікроклімат лабораторії повинен відповідати вимогам ДБН В.2.5-67:2013. Однак ключовою особливістю даного експерименту є необхідність утримання акваріумів з *Danio rerio* та культури клітин, що призводить до локального підвищення вологості та випаровування [78].

Згідно з Правилами улаштування електроустановок (ПУЕ) , приміщення класифікується як вологе, якщо відносна вологість повітря тривалий час перевищує 60 %, але не перевищує 75 %. Якщо ж вологість тривалий час перевищує 75 %, приміщення класифікується як сире.

В обох випадках (вологе чи сире приміщення) ризик ураження електричним струмом значно зростає. Вологість знижує опір ізоляції електрообладнання (нагрівачів, фільтрів, аераторів акваріумів), а також знижує опір шкіри людини, що робить ураження струмом більш ймовірним та небезпечним. Цей взаємозв'язок мікроклімату та електробезпеки вимагає першочергового застосування посиленних технічних заходів захисту, прописаних для особливо небезпечних приміщень [79].

Акваріуми з підігрівом води спричиняють локальне підвищення вологості, проте значного перевищення встановлених норм не зафіксовано.

#### 4.3.4. Механічні фактори

Механічні ризики в лабораторії виникають переважно під час проведення мікрохірургічних операцій (ампутація хвостового плавця) із застосуванням скальпеля, ножиць та леза.

Операції з ріжучими та гострими інструментами вимагають високої концентрації та стабільної пози. Найбільш небезпечним сценарієм є отримання

різаної травми, оскільки в умовах роботи з біологічним матеріалом травмована ділянка стає потенційним шляхом проникнення біологічних агентів в організм дослідника. Це переводить звичайну механічну небезпеку в категорію комбінованої біо-механічної небезпеки.

#### 4.3.5. Хімічні чинники

Дослідження передбачає використання етанолу та евгенолу (4-алліл-2-метоксифенол) для приготування розчину анестезії для *Danio rerio*. Ці речовини є летючими і можуть впливати на повітря робочої зони.

Пари етилового спирту мають встановлені гігієнічні регламенти допустимого вмісту в повітрі робочої зони, які містяться в Наказі МОЗ України № 1596. Недотримання гранично допустимої концентрації (ГДК) може призвести до інтоксикації та подразнення слизових оболонок.

Евгенол, хоча і використовується в малих концентраціях, є легкою хімічною сполукою. Аналіз чинного Наказу МОЗ № 1596 показує, що прямий Гігієнічний Регламент допустимого вмісту для евгенолу може бути відсутній у поточному переліку речовин. Цей регуляторний пробіл підкреслює необхідність застосування превентивного підходу. Оскільки встановлена ГДК відсутня, основним механізмом захисту має бути не моніторинг перевищення ГДК, а організаційне усунення джерела впливу шляхом проведення всіх операцій з евгенолом (приготування, застосування) виключно під місцевою витяжною вентиляцією, гарантуючи мінімальне випаровування в робочу зону [80].

#### 4.4. Розробка заходів з охорони праці

Для забезпечення безпечних умов праці студента-дослідника та мінімізації ідентифікованих ризиків необхідно впровадити комплекс технічних, організаційних та санітарно-гігієнічних заходів. Згідно з аналізом умов праці, найбільш несприятливими чинниками є ризик ураження електричним струмом у

вологодому середовищі та комбінований біо-механічний ризик (травми гострими інструментами в поєднанні з роботою з біологічним матеріалом людини). Заходи зосереджено на нейтралізації цих двох пріоритетних небезпек.

#### 4.4.1. Технічні та організаційні заходи безпеки

Технічні заходи електробезпеки є критично важливими, оскільки робота проводиться з акваріумним електрообладнанням у приміщенні з підвищеною вологістю. Для захисту від струмів витоків лінія живлення акваріумного стелажа має бути обов'язково обладнана пристроєм захисного вимкнення ПЗВ зі струмом спрацювання, що не перевищує 30 мА. Усі кабелі, що йдуть від акваріумного обладнання нагрівачів, фільтрів, компресорів, повинні бути прокладені з формуванням так званої «крапельної петлі». Це означає, що кабель має провисати нижче рівня розетки, запобігаючи потраплянню води, що може стікати по дроту, безпосередньо у електричний контакт. Металевий стелаж, на якому розміщені акваріуми, а також металеві корпуси електроприладів мають бути надійно заземлені. Для підтримання безпеки необхідно проводити регулярну перевірку опору ізоляції електрообладнання, як мінімум один раз на рік [79].

Організаційні заходи електробезпеки вимагають суворого дотримання правил під час взаємодії з водою та електрикою. Категорично забороняється занурювати руки в акваріум для вилову риб, проведення прибирання або інших маніпуляцій без попереднього та повного відключення всього електрообладнання фільтрів, компресорів, нагрівачів від мережі живлення. Так само забороняється торкатися будь-якого електрообладнання або розеток мокрими руками [71].

У зв'язку з використанням спиртівки для стерилізації інструментів, особлива увага приділяється пожежній безпеці. Заправляти спиртівку дозволяється лише у вимкненому стані, при температурі приладу, що виключає самозаймання, та подалі від будь-яких джерел відкритого вогню чи нагріву.

Спиртівки повинні використовуватись виключно на негорючій підставці, наприклад, керамічній плитці або металевому піддоні, та на безпечній відстані від легкозаймистих предметів та матеріалів. Гасити полум'я необхідно тільки шляхом накривання ковпачком, категорично забороняється задувати полум'я. Зберігання запасу етилового спирту повинно здійснюватися у щільно закритій тарі у спеціальній металевій шафі, ізольовано від місця безпосереднього проведення робіт зі спиртівкою [75].

Для забезпечення першої допомоги у лабораторії має бути розміщена аптечка, обов'язково укомплектована необхідними засобами для обробки порізів перекис водню, пластир, бинт, а також засобами для надання допомоги при термічних опіках, зокрема Пантенолом або його аналогами.

#### 4.4.2. Заходи щодо усунення комбінованого біо-механічного ризику

Ці заходи спрямовані на запобігання травмам ріжучими інструментами та недопущення інфікування або контамінації при роботі з біологічним матеріалом (кондиціоноване середовище культивування мезенхімальних стовбурових клітин (МСК) та живі організми).

Перед початком роботи слід переконатися у справності інструментів. Необхідно дотримуватися правил поводження з гострими та ріжучими предметами (скальпелі, ножиці, леза), використовуючи їх обережно. Зберігання та перенесення інструментів має відбуватися виключно у захисних чохлах або лотках. Утилізація використаних гострих предметів (лез, одноразових скальпелів) повинна здійснюватись у спеціалізовані, марковані, стійкі до проколів контейнери.

Студент-дослідник повинен бути забезпечений та зобов'язаний використовувати засоби індивідуального захисту (ЗІЗ): лабораторний халат, нітрилові або латексні рукавички (особливо при роботі з біологічним матеріалом), а також захисні окуляри або щитки при роботі з ріжучими інструментами. Хоча МСК не є патогенними агентами, робота з ними вимагає

дотримання правил біологічної безпеки, щоб контролювати ризики, пов'язані з непередбаченою контамінацією [74].

#### 4.5. Розрахункова частина: розрахунок штучного освітлення

З огляду на те, що виконання операцій з ампутації та подальшої фотофіксації за допомогою камери смартфона потребує високої точності та достатнього рівня освітленості, було проведено розрахунок штучного освітлення за методом коефіцієнта використання світлового потоку. Недостатній рівень освітлення підвищує ймовірність травмування гострим інструментом та негативно впливає на якість отриманих цифрових зображень, що може призвести до втрати об'єктивності експериментальних даних. Тому основним завданням було визначення необхідної кількості світильників для забезпечення нормативної освітленості в зоні, де виконується точна зорова робота.

Для розрахунку було використано такі параметри приміщення: довжина  $A = 6$  м, ширина  $B = 5$  м, висота  $H = 3$  м. Площа лабораторії становить  $S = A \times B = 30$  м<sup>2</sup>. Висота робочої поверхні прийнята на рівні  $h_p = 0,8$  м, тому розрахункова висота підвісу світильників складає  $h = H - h_p = 2,2$  м.

Відповідно до вимог ДБН В.2.5-28:2018, для лабораторних приміщень, де виконуються роботи середньої та високої точності, нормована освітленість повинна становити  $E_n = 400$  лк. Як джерело освітлення обрано світлодіодні панелі зі світловим потоком однієї лампи  $F_l = 3200$  лм. Під час розрахунку враховано коефіцієнт запасу  $k = 1,4$  (пов'язаний зі старінням ламп та можливим забрудненням світильників), коефіцієнт нерівномірності освітлення  $z = 1,1$  та коефіцієнт використання світлового потоку  $\eta = 0,5$  [76].

Необхідна кількість світильників (N) = 
$$\frac{E_n \times S \times k \times z}{F_l \times \eta} = \frac{400 \times 30 \times 1,4 \times 1,1}{3200 \times 0,5} = 11,55.$$

За результатами розрахунку визначено, що для забезпечення необхідної рівномірної освітленості лабораторного приміщення потрібно встановити 12 світильників.

## Висновки до розділу 4

Аналіз умов праці студента-дослідника під час виконання експериментальної частини магістерської роботи виявив сукупність небезпечних та шкідливих виробничих чинників, що вимагають комплексного контролю.

Умови праці, що поєднують гострі інструменти, леткі хімічні речовини (евгенол, спирт) та роботу з електрообладнанням у приміщенні з підвищеною вологістю (сире або вологе приміщення), потребують належних заходів так як існує ризик функціональних змін в організмі дослідника, що перевищують фізіологічні норми.

Найбільш критичними є ризики ураження електричним струмом, посилені підвищеною вологістю, та механічні травми гострими інструментами, які можуть стати шляхом проникнення біологічних агентів. Для їх мінімізації необхідне обов'язкове використання пристроїв захисного відключення (УЗО), надійного заземлення та суворого дотримання протоколів безпеки при поводженні з ріжучими предметами.

У зв'язку з потенційною відсутністю встановленого ГДК для евгенолу, превентивний контроль шляхом використання витяжної вентиляції є єдиним надійним технічним заходом для хімічної безпеки. Робота з МСК та *Danio rerio* вимагає застосування ЗІЗ (халати, рукавички, окуляри) та забезпечення належної утилізації біологічних відходів відповідно до ДСТУ ISO 14001:2015.

Розрахунковим шляхом підтверджено необхідність встановлення системи загального освітлення, яка складається з 12 LED-світильників. Загалом, реалізація всіх запропонованих технічних та організаційних заходів безпеки забезпечує повну відповідність умов праці чинним нормативам, значно знижує ризики травматизму та гарантує високий рівень безпеки під час проведення всіх експериментальних робіт.

## РОЗДІЛ 5

### ОХОРОНА НАВКОЛИШНЬОГО СЕРЕДОВИЩА

#### 5.1. Вступ

Сучасні біотехнологічні дослідження, що охоплюють культивування клітин людини, застосування хімічних анестетиків, використання поживних середовищ та модельних організмів, створюють потребу в суворому контролі та аналізі їхнього можливого впливу на навколишнє середовище. У контексті даної роботи, що включає маніпуляції з кондиціонованим середовищем (КС) з мезенхімальних стовбурових клітин (МСК) людини та експерименти на *Danio rerio* (рибках-зебра), екологічна безпека набуває першочергового значення. Це пов'язано з можливим утворенням змішаних відходів, що можуть мати хімічне навантаження (евгенол, етанол) та органічне/біологічне (метаболіти, цитокіни, фрагменти тканин).

Порушення встановлених процедур поводження з цими матеріалами або правил утилізації може призвести до неконтрольованого потрапляння біологічно активних речовин та токсичних хімікатів у системи каналізації. Це може становити потенційну загрозу забруднення ґрунтів і водних ресурсів, а також формування біологічних ризиків для навколишніх екосистем. Таким чином, аналіз та впровадження належних природоохоронних заходів є невід'ємною частиною академічної та професійної відповідальності.

#### 5.2. Можливі впливи дослідження на навколишнє середовище та джерела впливу

У межах виконання дипломної роботи були здійснені дії, що безпосередньо пов'язані з потенційним фізичним, хімічним і біологічним впливом на екосистему.

Використання анестетиків, а саме евгенолу і спирту виступають як хімічні чинники впливу. Евгенол у високих концентраціях токсичний для водних організмів та здатний пригнічувати дихальні ферментні системи риб. Етанол у свою чергу може змінювати рН та окисно-відновний стан води [81].

Джерелами хімічного впливу виступають залишки розчинів після анестезії, вода з акваріумів після завершення циклу регенерації, а також витратні матеріали, що містять реагенти. Навіть незначні кількості евгенолу, потрапивши у природне середовище, можуть спричинити загибель дрібних водних організмів, що порушує екологічну рівновагу водойми [82].

Біологічним джерелом забруднення в даній роботі є кондиціоноване середовище, насичене факторами секреції МСК, біоматеріали тваринного походження (фрагменти хвостових плавців риб) та мікробіологічні забруднення акваріумної води, що з'являються у результаті життєдіяльності *Danio rerio*.

Навіть при відсутності патогенних мікроорганізмів, такі відходи класифікуються як біоактивні та не повинні потрапляти у загальну каналізаційну систему без попередньої дезактивації [83].

У межах роботи фізичний вплив мінімальний. До потенційних факторів належать лише підвищене використання штучного освітлення під час проведення фотофіксації. Шумові та вібраційні фактори не створювалися та не є характерними для методики.

### **5.3. Аналіз найбільш вагомого впливу та його наслідків**

Найбільш вагомим екологічним чинником у межах цієї роботи визначено біологічно-хімічний вплив, що пов'язаний з утилізацією кондиціонованого середовища та води, в якій утримувалися *Danio rerio*. Незважаючи на те, що ці матеріали не є патогенними, їхня біологічна активність не зникає при потраплянні в довкілля. небезпека полягає у здатності біологічно активних речовин впливати на клітини інших організмів. У природному середовищі екзосоми та цитокіни можуть стати регуляторами росту мікроорганізмів,

стимулювати колонізацію або пригнічувати певні види бактерій, що здатне змінити склад мікробіоти водойми, сприяючи непередбачуваним змінам у біохімічних циклах [84].

До можливих наслідків потрапляння відходів у довкілля відносять:

- зміну біоцінозу водойм, розвиток мікроводоростей (евтрофікація);
- зниження кисневого балансу, що призводить до гіпоксії риби та загибелі планктону;
- порушення балансу між мікробними популяціями;
- потенційний селективний вплив білкових факторів на клітини інших гідробіонтів;
- зростання навантаження на систему очисних споруд.

Тому безпечне поводження з рідинами, що містять біологічні фактори, є обов'язковим.

#### **5.4. Рекомендації щодо мінімізації негативного впливу на довкілля**

З огляду на те, що найбільш критичним екологічним чинником у межах проведеного дослідження є утилізація кондиціонованого середовища мезенхімальних стовбурових клітин та води, у якій утримувалися *Danio rerio*, ключовим напрямом екологічного контролю стає попереднє знезараження та правильна утилізація біологічно-активних розчинів.

Щоб запобігти потенційним наслідкам впливу на навколишнє середовище, рідини перед утилізацією доцільно піддавати обробці фізичними або хімічними методами знезараження. Найбільш доступним і безпечним методом є автоклавовання при температурі 121 °С, що забезпечує денатурацію білкових молекул та руйнування вмісту екзосом [85].

У разі відсутності автоклаву ефективним є застосування хлорвмісних або перекисних дезінфектантів у концентраціях, придатних для інактивації біологічно активних молекул, з подальшим витримуванням протягом

регламентованого часу. Така попередня обробка знижує біологічну активність середовища і мінімізує ризик впливу на водні екосистеми.

Важливим етапом екологічно відповідального поводження з відходами досліду є розділення потоку рідких відходів залежно від їхнього походження. Вода після утримання *Danio rerio* не повинна зливатися у відкриті каналізаційні системи без попередньої фільтрації та знезараження, адже в ній можуть міститись не лише біологічні фактори, а й продукти метаболізму риб та залишки кормів, що здатні сприяти евтрофікації природних водойм [85].

Рекомендується проводити механічне відділення твердих частинок, після чого здійснювати хімічну обробку дезінфікуючими розчинами або знезараження за допомогою ультрафіолетового випромінювання. Такий підхід знижує мікробне навантаження та усуває ризик перенесення активних біомолекул у довкілля.

З метою зменшення обсягів рідких відходів доцільно оптимізувати робочі протоколи: використовувати мінімально необхідні об'єми середовища, проводити планування експериментів таким чином, щоб уникати утворення надлишкових розчинів, а також впроваджувати замкнуті системи культивування та оборотні цикли води для утримання *Danio rerio*, якщо це дозволяє методика.

Перехід на концентровані буфери з розведенням перед використанням зменшує кількість пластикової тари, а застосування багаторазових ємностей зі скла або автоклавованого пластику знижує навантаження на систему утилізації. Додатково бажано проводити екологічний моніторинг — реєстрацію обсягів відходів, оцінку ефективності знезараження та аналіз результатів з метою подальшої оптимізації системи поводження з біоматеріалами.

Таким чином, мінімізація екологічного впливу при роботі з кондиціонованим середовищем МСК та водою після експериментів з *Danio rerio* базується на попередньому знезараженні, виключенні прямого потрапляння біологічно активних рідин у довкілля, впровадженні роздільного збору та відповідальній утилізації лабораторних відходів. Впровадження цих рекомендацій дозволить значно знизити ризики порушення гідробіоценозу та

забезпечить екологічно безпечне проведення подальших біотехнологічних досліджень.

## **Висновки до розділу 5**

Проведення експериментів із використанням кондиціонованого середовища з мезенхімальних стовбурових клітин та модельного об'єкта *Danio rerio* супроводжується утворенням хімічних, біологічних та змішаних лабораторних відходів.

У межах експерименту встановлено, що головний екологічний ризик пов'язаний із поводженням з кондиціонованим середовищем МСК та водою після утримання *Danio rerio*. Хоча матеріал не є патогенним, наявність у ньому екзосом, цитокінів та інших активних молекул може впливати на водні екосистеми, порушувати мікробний баланс, сприяти евтрофікації та зниженню кисневого рівня у водоймах.

Запропоновано комплекс заходів щодо зменшення впливу на довкілля: попереднє знезараження рідких відходів (автоклавування або хімічна інактивація), роздільний збір та утилізація, а також оптимізація об'ємів використовуваних середовищ. Виконання цих рекомендацій мінімізує екологічні ризики та забезпечує екологічно безпечне проведення досліджень.

## ВИСНОВКИ

1. У результаті аналізу сучасних літературних джерел встановлено, що мезенхімальні стовбурові клітини характеризуються високим паракринним потенціалом і здатністю секретувати комплекс біологічно активних молекул, зокрема цитокінів, факторів росту та екзосом, які беруть участь у регуляції процесів відновлення ушкоджених тканин. Проаналізовані дані свідчать, що регенерація у *Danio rerio* відбувається за участю чітко скоординованих клітинних і молекулярних механізмів, включаючи формування бластем, активну клітинну проліферацію та ремоделювання тканин, що робить цей об'єкт доцільним для експериментального вивчення впливу біологічно активних факторів на регенераційні процеси.

2. У межах експериментальної частини роботи проведено ампутацію хвостового плавця *Danio rerio* з дотриманням умов біоетики та стандартів роботи з лабораторними тваринами. Здійснено поетапну фотофіксацію процесів регенерації у визначені часові точки, що дозволило простежити динаміку відновлення хвостового плавця від моменту ушкодження до пізніх етапів регенерації та забезпечило формування репрезентативного масиву експериментальних даних для подальшого аналізу.

3. Проведений морфометричний аналіз хвостового плавця у контрольній та дослідній групах дав змогу кількісно оцінити перебіг регенераційних процесів. Визначено показники відновлення довжини хвостового плавця та відсоток регенерації відносно вихідних значень, що дозволило охарактеризувати темпи та особливості регенерації на різних етапах експерименту. Отримані результати свідчать про наявність відмінностей у динаміці регенерації між групами, що вказує на можливий вплив досліджуваного чинника.

4. Статистична обробка отриманих результатів підтвердила доцільність застосованих морфометричних показників для оцінки регенерації

хвостового плавця *Danio rerio*. Аналіз даних дозволив оцінити вплив кондиціонованого середовища мезенхімальних стовбурових клітин, отриманих зі стромально-васкулярної фракції жирової тканини людини, на перебіг регенераційних процесів. Встановлено, що застосування кондиціонованого середовища сприяло більш вираженим регенераційним змінам на ранніх етапах відновлення, що підтверджує перспективність використання безклітинних підходів у дослідженнях регенерації та обґрунтовує необхідність подальших поглиблених досліджень.

## СПИСОК БІБЛІОГРАФІЧНИХ ПОСИЛАНЬ ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Costela-Ruiz V. J., Melguizo-Rodriguez L., Bellotti C., Illescas-Montes R., Stanco D., Arciola C. R., Lucarelli E. Different Sources of Mesenchymal Stem Cells for Tissue Regeneration: A Guide to Identifying the Most Favorable One in Orthopedics and Dentistry Applications. *International Journal of Molecular Sciences*. 2022. Vol. 23. P. 6356. DOI: 10.3390/ijms23116356.
2. Zhou J., Shi Y. Mesenchymal stem/stromal cells (MSCs): Origin, immune regulation, and clinical applications. *Cellular and Molecular Immunology*. 2023. Vol. 20, No 3. P. 555–557. DOI: 10.1038/s41423-023-01094-2.
3. Wu S., Sun S., Fu W., Yang Z., Yao H., Zhang Z. The Role and Prospects of Mesenchymal Stem Cells in Skin Repair and Regeneration. *Biomedicines*. 2024. Vol. 12, No 4. P. 743. DOI: 10.3390/biomedicines12040743.
4. Hernigou P. Bone transplantation and tissue engineering, part IV. Mesenchymal stem cells: history in orthopedic surgery. *International Orthopaedics*. 2015. Vol. 39, No 4. P. 807–817. DOI: 10.1007/s00264-015-2716-8.
5. Naji A., Eitoku M., Favier B., Deschaseaux F., Rouas-Freiss N., Suganuma N. Biological functions of mesenchymal stem cells and clinical implications. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2019. Vol. 76, No 11. P. 3323–3348. DOI: 10.1007/s00018-019-03056-3.
6. Tang H., Luo H., Zhang Z., Yang D. Mesenchymal Stem Cell-Derived Apoptotic Bodies: Biological Functions and Therapeutic Potential. *Cells*. 2022. Vol. 11. P. 3879. DOI: 10.3390/cells11233879.
7. Caplan A. I. Osteogenesis imperfecta, rehabilitation medicine. *Connective Tissue Research*. 1995. Vol. 31. P. S9–S14. DOI: 10.3109/03008209509017086.
8. Margiana R., Markov A., Zekiy A. O., Hamza M. U., Al-Dabbagh K. A. et al. Clinical application of mesenchymal stem cell in regenerative medicine: A narrative review. *Stem Cell Research & Therapy*. 2022. Vol. 13. P. 366. DOI: 10.1186/s13287-022-03078-1.

9. Sandonà M., Di Pietro L., Esposito F. et al. Mesenchymal Stromal Cells and Their Secretome: New Therapeutic Perspectives for Skeletal Muscle Regeneration. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 2021. Vol. 9. P. 652970. DOI: 10.3389/fbioe.2021.652970.
10. Al-Ghadban S., Bunnell B. A. Adipose Tissue-Derived Stem Cells: Immunomodulatory Effects and Therapeutic Potential. *Physiology*. 2020. Vol. 35, No 2. P. 125–133. DOI: 10.1152/physiol.00021.2019.
11. Yang Y. H., Lee A. J., Barabino G. A. Coculture-driven mesenchymal stem cell-differentiated articular chondrocyte-like cells. *Stem Cells Translational Medicine*. 2012. Vol. 1, No 10. P. 843–854. DOI: 10.5966/sctm.2012-0043.
12. Yang Y. K., Ogando C. R., Wang See C., Chang T. Y., Barabino G. A. Changes in phenotype and differentiation potential. *Stem Cell Research & Therapy*. 2018. Vol. 9. P. 131. DOI: 10.1186/s13287-018-0876-3.
13. Li B., Ouchi T., Cao Y., Zhao Z., Men Y. Dental-Derived Mesenchymal Stem Cells: State of the Art. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 2021. Vol. 9. P. 654559. DOI: 10.3389/fcell.2021.654559.
14. Chen Y., Huang H., Li G., Yu J., Fang F., Qiu W. Dental-derived mesenchymal stem cell sheets. *Stem Cell Research & Therapy*. 2022. Vol. 13. P. 38. DOI: 10.1186/s13287-021-02716-4.
15. Bagno L. L., Salerno A. G., Balkan W., Hare J. M. Mechanism of Action of Mesenchymal Stem Cells. *Expert Opinion on Biological Therapy*. 2022. Vol. 22, No 4. P. 449–463. DOI: 10.1080/14712598.2022.2016695.
16. Cremona M., Gallazzi M., Rusconi G., Mariotta L., Gola M., Soldati G. State of the Art in the Standardization of Stromal Vascular Fraction Processing. *Biomolecules*. 2025. Vol. 15, No 2. P. 199. DOI: 10.3390/biom15020199.
17. Arthroscopic Implantation of Adipose-Derived SVF Improves Cartilage Regeneration. *Arthroscopy, Sports Medicine, and Rehabilitation*. 2023. Vol. 5, No 3. P. e707–e716. DOI: 10.1016/j.asmr.2023.03.013.

18. Goncharov E. N., Koval O. A., Igorevich E. I., Encarnacion Ramirez M. D. J. et al. Analyzing the Clinical Potential of Stromal Vascular Fraction. *Medicina*. 2024. Vol. 60. P. 221. DOI: 10.3390/medicina60020221.
19. Karadağ Sarı E. Ç., Ovalı E. Factors Affecting the Population of Mesenchymal Stem Cells. *Balkan Medical Journal*. 2022. Vol. 39, No 6. P. 386–392. DOI: 10.4274/balkanmedj.galenos.2022.2022-5-50.
20. Uguten M., van der Sluis N., Vriend L., Coert J. H., Harmsen M. C. et al. Comparing mechanical and enzymatic isolation procedures. *Wound Repair and Regeneration*. 2024. Vol. 32. P. 1008–1021. DOI: 10.1111/wrr.13090.
21. François P., Rusconi G., Arnaud L., Mariotta L., Giraud L., Minonzio G., Veran J., Bertrand B., Dumoulin C., Grimaud F. et al. Inter-center comparison of GMP-compliant stromal vascular fraction and proposal for release acceptance criteria: A review of 364 productions. *Stem Cell Research & Therapy*. 2021. Vol. 12. P. 373. DOI: 10.1186/s13287-021-02564-2.
22. Trivisonno A., Alexander R. W., Baldari S., Cohen S. R., Di Rocco G., Gentile P., Magalon G. et al. Intraoperative Strategies for Minimal Manipulation of Autologous Adipose Tissue. *Stem Cells Translational Medicine*. 2019. Vol. 8, No 12. P. 1265–1271. DOI: 10.1002/sctm.19-0166.
23. White I. A., Sanina C., Balkan W., Hare J. M. Mesenchymal stem cells in cardiology. *Methods in Molecular Biology*. 2016. Vol. 1416. P. 55–87. DOI: 10.1007/978-1-4939-3584-0\_5.
24. De Francesco F., Romano M., Zarantonello L., Ruffolo C., Neri D., Bassi N., Giordano A., Zanusi G., Ferraro G. A., Cillo U. The role of adipose stem cells in inflammatory bowel disease. *Cancer Biology & Therapy*. 2016. Vol. 17, No 9. P. 889–898. DOI: 10.1080/15384047.2016.1210711.
25. Amer M. G., Embaby A. S., Karam R. A., Amer M. G. Role of adipose tissue derived stem cells differentiated into insulin producing cells in the treatment of type I diabetes mellitus. *Gene*. 2018. Vol. 654. P. 87–94. DOI: 10.1016/j.gene.2018.02.028.

26. Takahashi H., Sakata N., Yoshimatsu G., Hasegawa S., Kodama S. Regenerative and transplantation medicine: cellular therapy using adipose-derived MSCs for Type 1 diabetes mellitus. *Journal of Clinical Medicine*. 2019. Vol. 8. P. 249. DOI: 10.3390/jcm8020249.
27. Crigna A., Daniele C., Gamez C., Balbuena S. M., Pastene D., Nardozi D., Brenna C., Yard B., Gretz N., Bieback K. Stem/stromal cells for treatment of kidney injuries. *Frontiers in Medicine*. 2018. Vol. 5. P. 15. DOI: 10.3389/fmed.2018.00015.
28. Ciuffi S., Zonefrati R., Brandi M. L. Adipose stem cells for bone tissue repair. *Clinical Cases in Mineral and Bone Metabolism*. 2017. Vol. 14. P. 217–226.
29. Kwak K.-A., Cho H.-J., Yang J.-Y., Park Y.-S. Current perspectives regarding stem cell-based therapy for liver cirrhosis. *Canadian Journal of Gastroenterology and Hepatology*. 2018. P. 4197857. DOI: 10.1155/2018/4197857.
30. Bowles A. C., Wise R. M., Gerstein B. Y., Thomas R. C., Ogelman R., Manayan R. C., Bunnell B. A. Adipose stromal vascular fraction attenuates TH1 cell-mediated pathology. *Journal of Neuroinflammation*. 2018. Vol. 15. P. 77. DOI: 10.1186/s12974-018-1108-3.
31. Wei S., Xie S., Yang Z., Peng X., Gong L., Zhao K., Zeng K., Lai K. Allogeneic adipose-derived stem cells suppress mTORC1 pathway. *Lupus*. 2019. Vol. 28. P. 199–209. DOI: 10.1177/0961203318811206.
32. Mazini L., Rochette L., Admou B., Amal S., Malka G. Hopes and Limits of Adipose-Derived Stem Cells (ADSCs). *International Journal of Molecular Sciences*. 2020. Vol. 21, No 4. P. 1306. DOI: 10.3390/ijms21041306.
33. Tang Y., Pan Z. Y., Zou Y., He Y., Yang P. Y., Tang Q. Q., Yin F. A comparative assessment of adipose-derived stem cells. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. 2017. Vol. 21. P. 2153–2162. DOI: 10.1111/jcmm.13138.
34. Ren S., Chen J., Duscher D., Liu Y., Guo G., Kang Y., Xiong H., Zhan P., Wang Y., Wang C. et al. Microvesicles from human adipose stem cells promote wound healing. *Stem Cell Research & Therapy*. 2019. Vol. 10. P. 47. DOI: 10.1186/s13287-019-1136-z.

35. Lombardi F., Palumbo P., Augello F. R., Cifone M. G., Cinque B., Giuliani M. Secretome of Adipose Tissue-Derived Stem Cells (ASCs). *International Journal of Molecular Sciences*. 2019. Vol. 20. P. 3721. DOI: 10.3390/ijms20153721.
36. Kucharzewski M., Rojczyk E., Wilemska-Kucharzewska K., Wilk R., Hudecki J., Los M. J. Novel trends in application of stem cells in skin wound healing. *European Journal of Pharmacology*. 2019. Vol. 843. P. 307–315. DOI: 10.1016/j.ejphar.2018.11.053.
37. Garza J. R., Pérez-Merino E. M., González-Rodríguez A., Gálvez B. G., López-Herrera G. et al. The stromal vascular fraction of adipose tissue: A promising source for regenerative medicine. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 2021. Vol. 9. P. 683883. DOI: 10.3389/fcell.2021.683883.
38. Zhang P. Q., Tan P. C., Gao Y. M., Zhang X. J., Xie Y., Zheng D. N., Zhou S. B., Li Q. F. The effect of glycerol as a cryoprotective agent. *Stem Cell Research & Therapy*. 2022. Vol. 13. P. 152. DOI: 10.1186/s13287-022-02808-6.
39. Kim Y. S., Oh S. M., Suh D. S., Tak D. H., Kwon Y. B., Koh Y. G. Cartilage lesion size and number of SVF cells. *Journal of Experimental Orthopaedics*. 2023. Vol. 10. P. 28. DOI: 10.1186/s40634-023-00622-z.
40. Gareev I., Beylerli O., Ilyasova T., Ahmad A., Shi H., Chekhonin V. Therapeutic application of adipose-derived SVF in myocardial infarction. *iScience*. 2024. Vol. 27. P. 109791. DOI: 10.1016/j.isci.2024.109791.
41. Andia I., Maffulli N., Burgos-Alonso N. Stromal vascular fraction technologies and clinical applications. *Expert Opinion on Biological Therapy*. 2019. Vol. 19. P. 1289–1305. DOI: 10.1080/14712598.2019.1633944.
42. Bianchi F., Falanga V., Oliviero U., Miele F., Rocco D. et al. Methods and Protocols for the Isolation of Stromal Vascular Fraction cells: A comparison. *Journal of Translational Medicine*. 2020. Vol. 18. P. 1–19. DOI: 10.1186/s12967-020-02329-7.
43. Jafarzadeh A., Hoseini S. S., Behrangi E., Roohaninasab M., Goodarzi A. Effectiveness of regenerative medicine for skin lightening. *Stem Cell Research & Therapy*. 2025. Vol. 16. P. 513. DOI: 10.1186/s13287-025-04592-z.

44. Chouaib B., Haack-Sørensen M., Chaubron F., Cuisinier F., Collart-Dutilleul P.-Y. Towards the Standardization of Mesenchymal Stem Cell Secretome-Derived Product Manufacturing. *International Journal of Molecular Sciences*. 2023. Vol. 24, No 16. P. 12594. DOI: 10.3390/ijms241612594.
45. Ivanisova D., Bohac M., Culenova M., Smolinska V., Danisovic L. Mesenchymal-Stromal-Cell-Conditioned Media and Their Implication for Osteochondral Regeneration. *International Journal of Molecular Sciences*. 2023. Vol. 24, No 10. P. 9054. DOI: 10.3390/ijms24109054.
46. González-González A., García-Sánchez D., Dotta M., Rodríguez-Rey J. C., Pérez-Campo F. M. Mesenchymal stem cells secretome. *World Journal of Stem Cells*. 2020. Vol. 12, No 12. P. 1529–1552. DOI: 10.4252/wjsc.v12.i12.1529.
47. Giannasi C., Cadelano F., Della Morte E., Baserga C., Mazzucato C., Niada S., Baj A. Unlocking the Therapeutic Potential of Adipose-Derived Stem Cell Secretome. *Biology*. 2024. Vol. 13, No 12. P. 1016. DOI: 10.3390/biology13121016.
48. Sandonà M., Di Pietro L., Esposito F., Ventura A., Silini A. R., Parolini O., Saccone V. Mesenchymal Stromal Cells and Their Secretome: New Therapeutic Perspectives. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 2021. Vol. 9. P. 652970. DOI: 10.3389/fbioe.2021.652970.
49. Trigo C. M., Rodrigues J. S., Camões S. P., Solá S., Miranda J. P. Mesenchymal stem cell secretome for regenerative medicine: Where do we stand? *Journal of Advanced Research*. 2025. Vol. 70. P. 103–124. DOI: 10.1016/j.jare.2024.05.004.
50. Gwam C., Mohammed N., Ma X. Stem cell secretome, regeneration, and clinical translation: a narrative review. *Annals of Translational Medicine*. 2021. Vol. 9, No 1. P. 70. DOI: 10.21037/atm-20-5030.
51. Laggner M., Gugerell A., Bachmann C., Hofbauer H., Vorstandlechner V. et al. Reproducibility of GMP-compliant production of therapeutic stressed peripheral blood mononuclear cell-derived secretomes. *Stem Cell Research & Therapy*. 2020. Vol. 11. P. 9. DOI: 10.1186/s13287-019-1524-2.

52. Xu G., Jin J., Fu Z., Wang G., Lei X., Xu J., Wang J. Extracellular vesicle-based drug overview: research landscape, quality control and nonclinical evaluation strategies. *Signal Transduction and Targeted Therapy*. 2025. Vol. 10, No 1. P. 255. DOI: 10.1038/s41392-025-02312-w.
53. Chen J., Sanchez-Iranzo H., Diotel N., Rastegar S. Comparative insight into the regenerative mechanisms of the adult brain in zebrafish and mouse. *FEBS Journal*. 2024. Vol. 291, No 19. P. 4193–4205. DOI: 10.1111/febs.17231.
54. Marques I. J., Lupi E., Mercader N. Model systems for regeneration: zebrafish. *Development*. 2019. Vol. 146, No 18. P. dev167692. DOI: 10.1242/dev.167692.
55. Beffagna G. Zebrafish as a Smart Model to Understand Regeneration After Heart Injury. *Frontiers in Cardiovascular Medicine*. 2019. Vol. 6. P. 107. DOI: 10.3389/fcvm.2019.00107.
56. Sehring I., Weidinger G. Zebrafish Fin: Complex Molecular Interactions and Cellular Mechanisms Guiding Regeneration. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 2022. Vol. 14, No 7. P. a040758. DOI: 10.1101/cshperspect.a040758.
57. Ross Stewart K. M., Walker S. L., Baker A. H., Riley P. R., Brittan M. Hooked on heart regeneration: the zebrafish guide to recovery. *Cardiovascular Research*. 2022. Vol. 118, No 7. P. 1667–1679. DOI: 10.1093/cvr/cvab214.
58. Vasudevarao M. D. et al. BMP signaling promotes zebrafish heart regeneration via alleviation of replication stress. *Nature Communications*. 2025. Vol. 16. P. 1708. DOI: 10.1038/s41467-025-13477-1.
59. Chen J., Sanchez-Iranzo H., Diotel N., Rastegar S. Comparative insight into the regenerative mechanisms of the adult brain in zebrafish and mouse. *FEBS Journal*. 2024. Vol. 291, No 19. P. 4193–4205. DOI: 10.1111/febs.17231.
60. Alper S. R., Dorsky R. I. Unique advantages of zebrafish larvae as a model for spinal cord regeneration. *Frontiers in Molecular Neuroscience*. 2022. Vol. 15. P. 983336. DOI: 10.3389/fnmol.2022.983336.

61. Zhao C., Yang Z., Li Y., Wen Z. Macrophages in tissue repair and regeneration: insights from zebrafish. *Cell Regeneration*. 2024. Vol. 13, No 1. P. 12. DOI: 10.1186/s13619-024-00195-w.
62. Hlushchuk R., Brönnimann D., Correa Shokiche C., Schaad L., Triet R. et al. Zebrafish Caudal Fin Angiogenesis Assay. *PLoS ONE*. 2016. Vol. 11, No 3. P. e0149281. DOI: 10.1371/journal.pone.0149281.
63. Reina C., Cardella C., Lo Pinto M., Pucci G., Acuto S. et al. Antioxidant, Pro-Survival and Pro-Regenerative Effects of Conditioned Medium. *International Journal of Molecular Sciences*. 2023. Vol. 24, No 17. P. 13191. DOI: 10.3390/ijms241713191.
64. Avdesh A., Chen M., Martin-Iverson M. T., Mondal A., Ong D. et al. Regular care and maintenance of a zebrafish laboratory. *Journal of Visualized Experiments*. 2012. No 69. P. e4196. DOI: 10.3791/4196.
65. Longkumer S. et al. Maintenance and Breeding of Zebrafish under Laboratory Conditions for Animal Research. *Agricultural Science Digest*. 2024. Vol. 44, No 3. P. 551–555.
66. Grush J., Noakes D. L., Moccia R. D. The efficacy of clove oil as an anesthetic for zebrafish. *Zebrafish*. 2004. Vol. 1, No 1. P. 46–53. DOI: 10.1089/154585404774101671.
67. Wong D., von Keyserlingk M. A., Richards J. G., Weary D. M. Conditioned place avoidance of zebrafish to chemicals used for euthanasia and anaesthesia. *PLoS ONE*. 2014. Vol. 9, No 2. P. e88030. DOI: 10.1371/journal.pone.0088030.
68. Bownik A. Clove essential oil from *Eugenia caryophyllus* induces anesthesia, alters swimming performance, heart functioning and decreases survival rate during recovery of *Daphnia magna*. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. 2015. Vol. 15. P. 157–166. DOI: 10.4194/1303-2712-v15\_1\_17.
69. Ayala-Soldado N., Mora-Medina R., Molina-López A. M., Lora-Benítez A. J., Moyano-Salvago R. Evaluation of the Effectiveness of Eugenol and MS-222 as

Anesthetics in Zebrafish. *Animals*. 2024. Vol. 14, No 16. P. 2418. DOI: 10.3390/ani14162418.

70. Вимоги щодо безпеки та захисту здоров'я працівників під час роботи з екранними пристроями : наказ Міністерства соціальної політики України від 14.02.2018 № 207.

71. Гігієнічна класифікація праці : наказ МОЗ України від 08.04.2014 № 248.

72. Державні санітарні норми мікроклімату виробничих приміщень : ДСН 3.3.6.042-99. Київ : МОЗ України, 1999.

73. ДСТУ Б В.2.5-82:2016. Електробезпека в будівлях і спорудах. Вимоги до захисних заходів. Впроваджено 01.04.2017.

74. Правила влаштування і безпеки роботи в лабораторіях мікробіологічного профілю : ДСП 9.9.5-080-2002. Київ : МОЗ України, 2002.

75. ДБН В.1.1-7:2016. Пожежна безпека об'єктів будівництва. Загальні вимоги. Впроваджено 01.06.2017.

76. ДБН В.2.5-28:2018. Природне і штучне освітлення. Київ : Мінрегіон України, 2018 (наказ від 03.10.2018 № 264).

77. ДСТУ Б В.1.1-36:2016. Визначення категорій приміщень за вибухопожежною та пожежною небезпекою. Впроваджено 01.01.2017.

78. ДБН В.2.5-67:2013. Опалення, вентиляція та кондиціонування. Київ : Мінрегіон України, 2013.

79. Правила улаштування електроустановок : наказ Міненерговугілля України від 21.07.2017 № 476.

80. Гігієнічні регламенти допустимого вмісту хімічних і біологічних речовин у повітрі робочої зони : наказ МОЗ України від 14.07.2020 № 1596.

81. Somensi C. A., Prestes O. D., Zanella R., Grützmacher A. D. Evaluation of eugenol toxicity in bioassays with test organisms. *Ciência Rural*. 2017. Vol. 47, No. 12. DOI: 10.1590/0103-8478cr20160950.

82. Tao Y., Wang C., Zhang X., Liu Y., Chen J. Eugenol exposure inhibits embryonic development and induces toxicity in *Danio rerio*. *Journal of Hazardous Materials*. 2023. Vol. 441. Art. 129912. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2022.129912.
83. da Silva A. F., Pires A. M. M., Freitas E. C. Sensitivity of aquatic organisms to ethanol and its potential environmental impact. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*. 2016. Vol. 32, No. 1. P. 37–45. DOI: 10.20937/RICA.2016.32.01.04.
84. Rodríguez-Caballero A., Aymerich E., Poch M. Treatment of high ethanol concentration wastewater by anaerobic digestion. *Journal of Environmental Management*. 2012. Vol. 95, No. 1. P. S120–S124. DOI: 10.1016/j.jenvman.2011.08.013.
85. Hernigou P. Bone transplantation and tissue engineering, part IV. Mesenchymal stem cells: history in orthopedic surgery. *International Orthopaedics*. 2015. Vol. 39, No. 4. P. 807–817. DOI: 10.1007/s00264-015-2716-8.
86. Про затвердження Порядку управління медичними відходами : наказ Міністерства охорони здоров'я України від 06.09.2024 № 1938 // *Офіційний вісник України*. 2024.