

ЕКСПРЕСІЯ ЦИТОПЛАЗМАТИЧНИХ БІЛКІВ СТОВБУРОВИМИ КЛІТИНАМИ ІЗ ЖИРОВОЇ ТКАНИНИ СОБАКИ НА РІЗНИХ ПАСАЖАХ КУЛЬТИВУВАННЯ IN VITRO

Л. В. Кладницька¹, канд. вет. наук, доцент,
А. Й. Мазуркевич¹, д-р вет. наук, професор,
Н. О. Безденежних², канд. біол. наук, с. н. с.,
В. Ф. Чехун², д-р мед. наук, академік НАНУ,
С. В. Величко³, канд. біол. наук,
М. О. Малюк¹, д-р вет. наук, доцент,
Т. В. Козицька⁴, канд. біол. наук,
В. В. Ковпак¹, канд. вет. наук, доцент,
В. Б. Данілов¹, канд. вет. наук, доцент,
Ю. О. Харкевич¹, канд. вет. наук, доцент

¹Національний університет біоресурсів і природокористування України,
вул. Героїв Оборони, 15, м. Київ, 03041, Україна

²Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології
імені Р. Є. Кавецького НАН України,
вул. Васильківська, 45, м. Київ, 03022, Україна

³Лікарня ветеринарної медицини,
Голосіївський проспект, 105 б, Київ, 03127, Україна

⁴Київський Національний медичний університет імені О. О. Богомольця,
бульвар Тараса Шевченка, 13, Київ, 01601 Україна

Досліджено експресію цитоплазматичних білків мезенхімальних стовбурових клітин із жирової тканини собаки за різних пасажів культивування. Мезенхімальні стовбурові клітини отримували з жирової тканини собаки методом культивування у CO₂ інкубаторі за температури 37 °C, 5 % вмісту CO₂ у середовищі DMEM (Sigma) з додаванням 10–15 % ембріональної сироватки бугайців, 1 % антибіотика-антимікотика (Sigma). Експресію цитоплазматичних білків стовбурових клітин із жирової тканини собаки отриманих культур IV та X-го пасажів досліджували імуноцитохімічним методом за допомогою моноклональних антитіл.

Встановлено, що жирова тканина собаки містить мультипотентні стовбурові клітини, які характеризуються експресією цитоплазматичних та мембранних білків, характерних для проліферуючих клітин. Стовбурові клітини жирової тканини собаки IV-го пасажу характеризуються максимальними показниками рівня експресії панцитокератину – 299±0,6, актину – 299±0,58, віментину – 265,7±20,7, Е-кадгерину – 298,3±1, що засвідчує високий рівень адгезивних властивостей, проліферації, клітинної сигналізації та взаємодії, а також рухливості. Рівень експресії вказаних білків залишається високим у культурі стовбурових клітин X-го пасажу, хоча і є достовірно нижчим від таких IV-го пасажу. За IV-го пасажу стовбурові клітини жирової тканини характеризувалися середнім значенням показника експресії β-катеніну – 97,7±8,5, та низьким – CD44 – 26,3±3,1 бали з достовірним зниженням їх на X-му пасажі культивування. За результатами дисперсійного аналізу встановлено достовірний вплив пасажування на рівень експресії цитоплазматичних білків стовбурових клітин із жирової тканини собаки.

Ключові слова: МЕЗЕНХІМАЛЬНІ СТОВБУРОВІ КЛІТИНИ, ЖИРОВА ТКАНИНА СОБАКИ, ІМУНОЦИТОХІМІЯ, ЦИТОПЛАЗМАТИЧНІ БІЛКИ.

Отримання біологічного матеріалу, зокрема стовбурових клітин, із метою застосування для корекції стану організму за сучасних умов набуло актуальності у ветеринарній медицині. У стромі жирової тканини було виявлено популяцію стовбурових прогеніторних клітин з мультилінійним потенціалом диференціювання, подібних до мезенхімальних стовбурових клітин (МСК), отриманих з кісткового мозку [1–3]. Враховуючи, що жирову тканину можна отримати з найменшим навантаженням для організму донора, на противагу щодо кісткового мозку, то її можна розглядати як альтернативне джерело МСК, що можуть бути застосовані для трансплантації. Вивчення диференціювання стовбурових клітин дозволяє обґрунтувати застосування і підтвердити клінічну ефективність нових розробок в напрямі ветеринарної медицини. Характеристика культури клітин дає можливість оцінки її біологічних властивостей. Серед сучасних методів дослідження диференціювання стовбурових клітин широко застосовують методи імуноцитохімічного виявлення маркерних білків [4]. Кількість маркерних білків, що використовують при цьому, постійно зростає, причому до цих пір залишається не зрозумілою остаточно їх функціональна роль у клітині.

N-кадгерин чинить вплив на адгезивні контакти і регулює проліферацію і диференціювання нервових клітин [5]. Сигнальний шлях віментин/В-катенін забезпечує активацію самопідтримання клітин-попередників, та стовбурові властивості у клітинах різних тканин. У нестимульованих білками віментину клітинах, більша частина ендogenous β-катеніну знаходиться у міжклітинних контактних з'єднаннях, де він взаємодіє з E-кадгерином і β-катеніном, забезпечуючи взаємодію сусідніх клітин [6]. Віментин – білок проміжних філаментів цитоскелету, який експресується нервовими і гліальними клітинами-попередниками, а також нейронами, фібробластами і гладком'язовими клітинами. Цей білок бере участь у процесах клітинної адгезії, проліферації, міграції та клітинній сигналізації. Висока експресія віментина корелює з прогресією раку [7, 8].

Мета досліджень – дослідити експресію цитоплазматичних білків мезенхімальних стовбурових клітин жирової тканини собаки на різних пасажах культивування.

Матеріали і методи. Робота виконувалась на кафедрі фізіології, патофізіології та імунології Національного університету біоресурсів і природокористування України. Усі дослідження на тваринах були проведені з дотриманням закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» (від 21.02.2006 р.) та принципів «Міжнародної Європейської конвенції по захисту хребетних тварин, які використовуються з експериментальною та іншою науковою метою» (Страсбург, 1986). У стерильних умовах під час планових операцій (оваріогістероектомія, ушивання грижі) у собак, віком до 12-ти місяців, відбирали 10-20 г жирової тканини. Зі зразків жирової тканини шляхом культивування у CO₂ інкубаторі отримували культуру стовбурових клітин [3, 9]. Клітини отриманої культури IV та X-го пасажів висаджували на покривні скельця у чашках Петрі та культивували за стандартних умов у CO₂ інкубаторі за температури 37 °С, 5 % вмісту CO₂ у середовищі DMEM (Sigma) з додаванням 10-15 % ембріональної сироватки бугайців, 1 % антибіотика-антимікотика. За 2-3 доби конфлюентність моношару клітин на покривних скельцях сягала близько 70 %. Клітини на скельцях фіксували розчином метанолу з ацетоном у співвідношенні 1:1 впродовж 2-ох годин за температури -20 °С, промивали фосфатно-буферним розчином, після чого інкубували 20 хв. з 1% розчином бичачого сироваткового альбуміну (БСА). На зафіксовані клітини наносили моноклональні антитіла anti: E-cadherin – EP700Y (REF-R4-2100-SO), Vimentin SP 20 (REF-RM-9120-SO), Beta-Catenin (REF-RB-9035-PO), Keratin, Pan Ab-1 (Clone AE1/AE3, REF-MS-343-PO), Thermo-Scientific, USA, Mouse anti Actin Pan Anibody (REF-235-05), Diagnostic Biosystems, Purified anti-human CD 325 N-cadherin (clone

8C11) Biolegend, USA, Mouse anti CD 44 (clone REF-Mob-256-05), Diagnostic Biosystems), та витримували 1 годину. Після цього застосовували систему візуалізації Ultra Vision LP Value Detection system, яка містить детекційні антитіла, кон'юговані з пероксидазою, активність якої виявляли за допомогою субстрату діамінобензидину (DAB, Thermo-Scientific). Після проведення імуноцитохімічної реакції препарати промивали проточною водою та дофарбовували розчином гематоксилін-еозину (1-2 хвилини), після чого препарати заключали в Faramount Aqueous Mounting Medium [10]. Аналіз результатів проводили за підрахунком клітин з експресією (коричневе забарвлення клітин) за допомогою світлового мікроскопу та оцінювали за допомогою класичного методу H-Score: $S=1xA+2xB+3xC$, де S – показник «H-Score», значення якого знаходяться у межах від 0 (білок не експресується) до 300 (сильна експресія у 100 % клітин); A – відсоток слабо «зафарбованих» клітин, B – відсоток помірно «зафарбованих» клітин, C – відсоток сильно «зафарбованих» клітин [11].

Статистичну обробку отриманих експериментальних результатів проводили за Н. А. Плохинським та з використанням пакету аналізу даних Microsoft Excel. Визначали середні арифметичні величини та їх похибки, встановлювали вірогідність різниці паралельних масивів даних. Для визначення взаємозв'язків пасажування та експресії маркерів відповідних білків проводили кореляційний аналіз, встановлювали вірогідність коефіцієнтів кореляції. Для встановлення ступеня впливу (η^2_x) пасажу на експресію маркерів відповідних білків та вірогідності такого впливу був проведений однофакторний дисперсійний аналіз. В усіх випадках різницю вважали достовірною при $p \leq 0,05$.

Результати й обговорення. Жирову тканину отримували при проведенні планових оперативних втручань (ушивання грижі, овариогістеректомія) у собак, віком до 12-ти місяців. У процесі обробки та культивування первинного матеріалу – жирової тканини собаки було отримано культуру мультипотентних стовбурових клітин за різних пасажів. Для проведення імуноцитохімічного скринінгу було використано стовбурові клітини IV та X-го пасажів (рис.1).

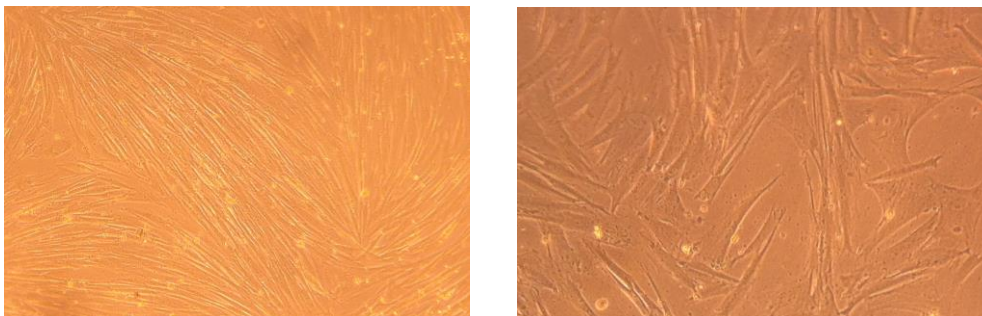


Рис. 1. Культура мультипотентних стовбурових клітин жирової тканини собаки IV та X-го пасажів, x 100

У ході імуноцитохімічних досліджень визначали рівень експресії цитоплазматичних білків мультипотентних стовбурових клітин жирової тканини собаки. Результати досліджень засвідчують достовірні зміни рівня експресії білків при культивуванні стовбурових клітин за IV та X-го пасажів (табл. 1).

Слід відмітити, що за IV-го пасажу зафіксовано високий рівень експресії цитоплазматичних, мембранних, цитоскелету і білків клітинної адгезії, показники яких становлять 266,5-299 балів. Нами було встановлено, що експресія E-кадгерину на четвертому пасажі сягає максимальних значень і на десятому його кількість достовірно знижується, але лишається на досить високому рівні, що засвідчує сталість трансмембранних зв'язків клітин культури (рис. 2).

E-кадгерин відноситься до сімейства трансмембранних глікопротеїнів, що забезпечують кальцій-залежне з'єднання клітин в тканинах. Прикріплення

цитоплазматичного домена E-кадгерину до актинового цитоскелету клітини здійснюється білком β -катеніном через білок A-катенін. β -катенін, окрім адгезійної, виконує в клітині ще і важливу сигнальну функцію, бере участь у процесах проліферації, диференціювання, міграції клітин, і є ключовим білком Wnt-сигнального шляху – ланцюга сигнальних механізмів, який складається із взаємодії лігандів Wnt. Що ж до показника експресії β -катеніну, то його значення достовірно знижується на 35 % у процесі культивування клітин.

Таблиця 1

Експресія цитоплазматичних білків мультипотентних стовбурових клітин із жирової тканини собаки IV та X-го пасажів, ($M \pm m$, $n=3$), у балах H-Score (від 0 до 300)

Антигени	Рівень експресії білків	
	IV пасаж	X пасаж
Віментин	265,7 \pm 20,7	189 \pm 13,4*
Актин	299 \pm 0,58	261,3 \pm 10,8*
E-кадгерин	298,3 \pm 0,97	223 \pm 15,68**
N-кадгерин	0	0
CD44	26,3 \pm 3,1	15,3 \pm 1,9*
Панцитокератин	299 \pm 0,6	109 \pm 9,3***
β -катенін	97,7 \pm 8,5	63,7 \pm 3,7*

Примітка: у цій і наступній таблиці: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ (порівняно з рівнем експресії IV-го пасажу)

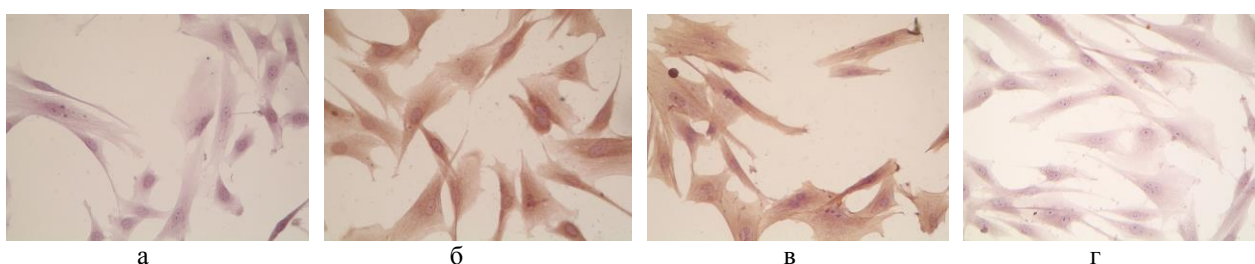


Рис. 2. Експресія E-кадгерину, актину, N-кадгерину мультипотентними стовбуровими клітинами жирової тканини собаки: а – контроль, б – E-кадгерин-позитивні клітини, в – актин-позитивні клітини, г – N-кадгерин-негативні клітини, х 400

Характерним маркером мезенхімальних клітин є віментин – він є білком проміжних філаментів цитоскелету клітини. Під час проведення імуноцитохімічної реакції щодо активності експресії віментину, нами було встановлено значну кількість позитивних клітин із високою активністю експресії цього білку на четвертому пасажі та достовірне зниження його кількості на 29 % впродовж культивування. Така зміна експресії віментина засвідчує, що зі збільшенням кількості пасажів поступово знижується рівень клітинної адгезії, проліферації, клітинної сигналізації і процесів міграції, що певним чином характеризує властивості стовбурових клітин культури.

Нами встановлено максимальний рівень експресії актину на четвертому та досить велику кількість актин-позитивних клітин – на десятому пасажі із зменшенням показника на 13 %. Актин є основою мікрофіламентів, що пронизують цитоплазму клітин і слугують опорним скелетом. За збільшення кількості пасажів, експресія актину лишається на високому рівні, хоча і достовірно знижується на 13 %, у порівнянні з експресією клітинами IV-го пасажу, що засвідчує збереження рухової та скорочувальної функції клітин на високому рівні.

Експресія CD44 у клітинах характеризується низьким показником, і, як ми бачимо з таблиці 1, його кількість достовірно знижується у процесі культивування культури

стовбурових клітин на 42 %. Цей білок бере участь у процесах клітинної міграції та міжклітинній взаємодії.

Відсутність експресії N-кадгерину підтверджує мезенхімальну природу стовбурових клітин з жирової тканини, оскільки цей білок є маркером нейральних стовбурових клітин.

У ході досліджень встановлено достовірні обернені кореляційні зв'язки кількості пасажів культури стовбурових клітин із експресією цитоплазматичних білків ($r = -0,95 - 0,27$; $p < 0,05 - 0,001$). Для визначення причинно-наслідкової залежності було проведено дисперсійний аналіз рівня експресії ядерних та цитоплазматичних білків стовбурових клітин за різних пасажів культивування (табл. 2).

Таблиця 2

Вплив пасажування культури на імунофенотип стовбурових клітин із жирової тканини собаки (η^2 ; $n=3$)

Досліджувані антигени	Сила впливу, η^2
Віментин	0,73*
Актин	0,79*
Е-кадгерин	0,87**
N-кадгерин	0
CD44	0,74*
Панцитокератин	0,99***
В-катенін	0,70*

Як видно з даних таблиці 2, показники засвідчують сильний достовірний вплив кількості пасажів на імунофенотип стовбурових клітин із жирової тканини собаки. На нашу думку, такі зміни імунофенотипу клітин при культивуванні пов'язані з багаторазовим впливом на них хімічних та фізичних факторів та біологічними віковими змінами самих клітин.

ВИСНОВКИ

1. Встановлено, що жирова тканина собаки містить мультипотентні стовбурові клітини, які характеризуються експресією цитоплазматичних білків, характерних для проліферуючих клітин.

2. Стовбурові клітини жирової тканини собаки IV-го пасажу характеризуються максимальними показниками рівня експресії Панцитокератину – $299 \pm 0,6$, Актину – $299 \pm 0,58$, Віментину – $265,7 \pm 20,7$, Е-кадгерину – $298,3 \pm 1$, що засвідчує відповідний рівень адгезивних властивостей, проліферації, клітинної сигналізації та рухливості. Середніх значень сягав показник експресії β -катеніну – $97,7 \pm 8,5$, а низьких – CD44 – $26,3 \pm 3,1$.

3. Рівень експресії вказаних білків залишається високим у культурі стовбурових клітин X-го пасажу, хоч і є достовірно нижчим від таких IV-го пасажу.

4. За результатами дисперсійного аналізу встановлено достовірний вплив пасажування культури клітин на імунофенотип стовбурових клітин із жирової тканини собаки.

Перспективи досліджень. З метою визначення зміни імуногенності стовбурових клітин культури за різних пасажів планується у подальшому визначити імунофенотип клітин ще на більш пізніх пасажах та за різних умов культивування.

THE CYTOPLASMIC PROTEINS EXPRESSION IN DOGS ADIPOSE-DERIVED MESENCHYMAL STEM CELLS ON DIFERENT PASSAGE CULTIVATION IN VITRO

L. V. Kladnytska¹, A. I. Mazurkevich¹, N. O. Bezdyenyehzhnyh², V. F. Chehun², S. V. Velychko³, M. O. Maluk¹, T. V. Kozytyska⁴, V. V. Kovpak¹, V. B. Danilov¹, Y. O. Harkevich¹

¹National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine,
15, Heroyiv Oborony, str., Kiev, 03041, Ukraine

²Institute of Experiential Pathology, Oncology and Radiobiology named after R. E. Kavetsky
of National Academy of Sciences of Ukraine,
25, Vasilkivska str., Kiev, 03022, Ukraine

³Hospital of Veterinary Medicine,
105 b, Holosiivskyi Avenue, Kyiv, 03127, Ukraine

⁴ Kiev National Medical University named after O. O. Bogomolets,
13, boulevard T. Shevchenka, Kiev, 01601, Ukraine

S U M M A R Y

The level of expression of cytoplasmic and nuclear proteins in dogs adipose-derived mesenchymal stem cells in various passages cultivation are shown in the article. Mesenchymal stem cells obtained from dogs adipose tissue by culturing in CO₂ incubator at a temperature 37 °C, 5 % CO₂ in medium DMEM (Sigma) with the addition of 10-15 % fetal bovine serum, 1 % antibiotic-antimycotics (Sigma). Immunophenotype of dogs adipose-derived mesenchymal stem cells in various passages (IV and X-th passages) studied using monoclonal antibodies.

Established that dogs adipose tissue contains multipotent stem cells that are characterized by the expression of cytoplasmic and nuclear membrane proteins specific to proliferating cells. Dogs adipose-derived mesenchymal stem cells IV-th passage characterized by a maximum performance level of expression of pantsytokeratyn – 299±0,6, actin – 299±0,58, vimentin – 265,7±20,7, E-cadherin – 298,3±0,97, which confirms the high level of adhesion properties, cell proliferation, cell signaling and motility. The level of expression of these proteins remains high in the culture of stem cells X-th passage, although it is significantly lower than the IV-th passage. Average values reached in the index β-catenin expression – 97,7 ± 8,5, and low – CD44 – 26,3 ± 3,1. The results of variance analysis showed significant effect cell cultivation on immunophenotype of dogs adipose-derived stem cells.

Keywords: MESENCHYMAL STEM CELL, DOGS ADIPOSE TISSUE, IMMUNOCYTOCHEMISRY, CYTOPLASMIC PROTEINS.

ЭКСПРЕССИЯ ЦИТОПЛАЗМАТИЧЕСКИХ БЕЛКОВ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫМИ СТВОЛОВЫМИ КЛЕТКАМИ ИЗ ЖИРОВОЙ ТКАНИ СОБАКИ НА РАЗНЫХ ПАССАЖАХ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ IN VITRO

Л. В. Кладницкая¹, А. Й. Мазуркевич¹, Н. А. Безденежных², В. Ф. Чехун², С. В. Величко³, М. А. Малюк¹, Т. В. Козицкая⁴, В. В. Ковпак¹, В. Б. Данилов¹, Ю. О. Харкевич¹

¹Национальный университет биоресурсов и природопользования Украины,
ул. Героев Обороны, 15, г. Киев, 03041, Украина

²Институт экспериментальной патологии, онкологии и радиобиологии
им. Р. Е. Кавецкого НАН Украины,
ул. Васильковская, 25, г. Киев, 03022, Украина

³Клиника ветеринарной медицины,
Голосеевский проспект, 105 б, г. Киев, 03127, Украина

⁴Киевский Национальный медицинский университет им. О. О. Богомольца,
бульвар Тараса Шевченко, 13, г. Киев, 01601, Украина

А Н Н О Т А Ц И Я

Определен уровень экспрессии цитоплазматических и ядерных белков мезенхимальных стволовых клеток с жировой ткани собаки на разных пассажах культивирования. Мезенхимальные стволовые клетки получали из жировой ткани собаки методом культивирования в CO₂ инкубаторе при температуре 37 °С, 5 % содержание CO₂ в среде DMEM (Sigma) с добавлением 10-15 % эмбриональной сыворотки бычков, 1 % антибиотика-антимикотика (Sigma). Иммунофенотип стволовых клеток жировой ткани, полученных культур IV– и X–го пассажей, исследовали иммуноцитохимическим методом с помощью моноклональных антител.

Установлено, что жировая ткань собаки содержит мультипотентные стволовые клетки, которые характеризуются экспрессией ядерных, цитоплазматических и мембранных белков, характерных для пролиферирующих клеток. Стволовые клетки жировой ткани собаки IV–го пассажа характеризуются максимальными показателями экспрессии панцитокератина – $299 \pm 0,6$, актина – $299 \pm 0,58$, виментина – $265,7 \pm 20,7$, E-кадгерина – $298,3 \pm 0,97$, что свидетельствует о соответствующем уровне адгезивных свойств, пролиферации, клеточной сигнализации и подвижности клеток культуры. Уровень экспрессии указанных белков остается высоким в культуре стволовых клеток X–го пассажа, хотя и является достоверно меньшим таких IV–го пассажа. Средних значений достигал показатель экспрессии β -катенина – $97,7 \pm 8,5$, а низких – CD44 – $26,3 \pm 3,1$ баллов с достоверным снижением их на X–ом пассаже культивирования. По результатам дисперсионного анализа установлено достоверное влияние количества пассажей культуры на иммунофенотип стволовых клеток из жировой ткани.

Ключевые слова: МЕЗЕНХИМАЛЬНЫЕ СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ, ЖИРОВАЯ ТКАНЬ СОБАКИ, ИММУНОЦИТОХИМИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ, ЦИТОПЛАЗМАТИЧЕСКИЕ БЕЛКИ.

Л І Т Е Р А Т У Р А

1. Neupane M. Isolation and characterization of canine adipose-derived mesenchymal stem cells / M. Neupane, C. Chang, M. Kiupel, V. Yuzbasiyan-Gurkan // Tissue Eng Part A. – 2008. №14(6):1007. – С.15. doi: 10.1089/tea.2007. 02. 07.

2. Bunnell B. Adipose-derived Stem Cells: Isolation, Expansion and Differentiation / B. Bunnell, M. Flaas, C. Gagliardi // Bindhya Patel, Methods. – 2008. – № 45(2). – P. 115–120. doi:10.1016/j.ymeth.2008.03.006.

3. Патент України на корисну модель №109148. Спосіб отримання мезенхімальних стовбурових клітин із жирової тканини собаки / Л. В.Кладницька, А. Й. Мазуркевич, С. В. Величко. Заявник і власник Національний університет біоресурсів і природокористування України. № у 201602329; заявл. 11.03.2016; опубл. 10.08.2016, бюл.№15.

4. Франко Г. А. Иммуногистохимические методы: руководство / Г. А. Франко, П. Г. Мальков – М., 2011. – 224 с.

5. Chalasani K. N-cadherin-mediated cell adhesion restricts cell proliferation in the dorsal neural tube / K. Chalasani, R. Brewster // Mol Biol Cell. – 2011. – № 22. – P. 1505–1515. doi: 10.1091/mbc.E10-08-0675.

6. *Morin P. J.* Beta-catenin signaling and cancer / P. J. Morin // *Bioessays*. – 1999. – Vol. 21(12). – P. 30–1021.
7. *Yu Y.* Surface vimentin is critical for the cell entry of SARS-CoV / Y. Yu, S. Chien, I. Chen, C. Lai // *Journal of Biomedical Science*. – 2016. DOI: 10.1186/s12929-016-0234-7. 5.
8. *Satelli A.* Universal marker and detection tool for human sarcoma circulating tumor cells / A. Satelli, A. Mitra // *J. Cancer Res.* – 2014. – № 15;74(6) – P.1645-50. doi: 10.1158/0008-5472.
9. *Кладницька Л. В.* Отримання культури стовбурових клітин із жирової тканини собаки / Л. В. Кладницька, А. Й. Мазуркевич, С. В. Величко, О. В. Жигунова // *Вісник Сумського НАУ*. – Серія "Ветеринарна медицина". – 2016. – № 6 (38). – С. 19–24.
10. *Leukemia diagnosis. Atlas and practical manual* / D. F. Gluzman, I. V. Abramenko, L. M. Sklyarenko et al, – К.: Morion, 2000, – 224 p.
11. *Detre S. A* "Quickscore" method for immunohistochemical semiquantitation: validation for oestrogen receptor in breast carcinomas / S. Detre, G. Jotti, M. Dowsett // *Clin Pathol*. – 1995. – № 48. – P. 876–878.

Рецензент – В. І. Карповський, д. вет. н., професор, НУБіП України.