

Міністерство освіти і науки України

Національний університет «Києво-Могилянська академія»

Факультет природничих наук

Кафедра лабораторної діагностики біологічних систем

**Магістерська робота**

на тему «**Визначення альтернативних джерел гемопоетичних стовбурових клітин для трансплантації**»

Виконав: студент 2-го року навчання

Галузь знань: 09 Біологія

Спеціальність: 091 Біологія

Освітньо-наукова програма: Лабораторна  
діагностика біологічних систем

**Бутенко Євген Сергійович**

Керівник Білько Н. М., доктор медичних наук, професор, зав. кафедри лабораторної діагностики біологічних систем НаУКМА

Рецензент

Кваліфікаційну роботу захищено  
з оцінкою \_\_\_\_\_

Секретар ЕК

« \_\_\_\_ » червня 20\_\_ року

## ЗМІСТ

<b>ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ</b> .....	4
<b>ВСТУП</b> .....	5
<b>РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ</b> .....	7
1.1. Класифікація стовбурових клітин .....	7
1.2. Типи HSC .....	10
1.3. Джерела HSC .....	12
1.4. Загальна характеристика HSC .....	14
1.5. Методи отримання і культивування HSC .....	18
1.6. Значення HSC у медицині.....	24
<b>РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ</b> .....	28
2.1. Об'єкт дослідження. ....	28
2.2. Обладнання та реактиви. ....	28
2.3. Підготовка тканин для культивування .....	29
2.4. Дослідження мієлоїдних попередників у культурі з напіврідким агаровим гелем <i>in vitro</i> .....	29
2.5. Визначення мультипотентних колонієутворюючих одиниць у метилцелюлозі <i>in vitro</i> .....	30
2.6. Облік результатів клонування .....	31
2.7. Статистична обробка .....	32
<b>РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ</b> .....	33
3.1 Аналіз результатів сепарації кровотворних клітин, отриманих з різних джерел, в залежності від способу очищення моноклеарної фракції.....	33
3.2 Вивчення кінетики колонієутворення в культурі <i>in vitro</i> кровотворних клітин-попередників, отриманих з різних джерел .....	34
3.3 Оцінка функціональної активності кровотворних клітин- попередників <i>in vitro</i> .....	36

3.4 Кінетика залежності кількості колонієутворюючих гранулоцитарно-макрофагальних одиниць від концентрації ядровмісних клітин, у культурі.....	39
3.5 Колонієутворення гемопоетичних клітин-попередників у залежності від місця забору кісткового мозку.....	42
3.6 Морфофункціональна оцінка клітин, виділених з колоній <i>in vitro</i> .....	43
<b>ВИСНОВКИ</b> .....	46
<b>ПЕРЕЛІК ПОСИЛАНЬ</b> .....	47

## ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

- БУО-Е - бурстутворююча еритроїдна одиниця в культурі
- ГЕММ - гранулоцитарно-еритроїдно-моноцитарно-мегакаріоцитарна клітина-попередник
- ГМ-КСФ-гранулоцитарно-макрофагальний колонієстимулюючий фактор
- ЕКУ - ефективність колонієутворення
- КК – кордова кров
- КМ – кістковий мозок
- КУО-Е - колонієутворююча еритроїдна одиниця в культурі
- КУО-ГМ - колонієутворююча одиниця грануломоноцитарна
- КУО-Г – колонієутворююча одиниця гранулоцитарна
- КУО-М - колонієутворююча одиниця макрофагальна
- КУОс - колонієутворююча одиниця в селезінці
- КУОмікс - змішані колонії, які складаються з мієлоїдних і еритроїдних клітин - попередників
- СКК - стовбутова кровотворна клітина
- ПК – периферична кров
- ТПХ - реакція трансплантат проти хазяїна

## ВСТУП

Відновлення гемопоезу в разі алотрансплантації кровотворної тканини здійснюється за допомогою стовбурових клітин, які мають необмежений проліферативний потенціал. Найбільш перспективними серед альтернатив кістковому мозку, як класичному об'єкту для трансплантацій, є ембріональні клітини. Вони приваблюють не тільки меншою антигенною залежністю у порівнянні з кістковим мозком донора, але й набагато більшим проліферативним потенціалом. На жаль все одно, цих клітин не достатньо для повноцінної трансплантації дорослій людині. Тому дослідження, пов'язані з вибором найбільш придатної для трансплантації тканини, шляхів накопичення і збереження стовбурових клітин є на сьогодні актуальними і доцільними. Їх вирішення дозволить покращити результати лікування хворих на онкогематологічні захворювання.

Відомо, що основним джерелом гемопоетичних стовбурових клітин в організмі дорослої людини вважається кістковий мозок, отриманий з груднини. Він також розміщений у комірках губчастої речовини плоских і губчастих кісток, епіфізів довгих (трубчастих) кісток; складається з сітки ретикулярних волокон і клітин, в петлях якої знаходяться примітивні, дозріваючі та зрілі гемопоетичні клітини. Доцільність визначення морфологічних і функціональних показників гемопоетичних клітин-попередників з кісткового мозку, вилучених з територіально різних місць їх перебування у кістках людини, зумовлена необхідністю поглиблення знань про особливості їх функціонування як для вирішення питань регенеративної медицини, так і для прогнозування перебігу онкогематологічних захворювань. Отже, метою роботи було визначення оптимального джерела стовбурових клітин для відновлення гемопоезу при трансплантації і відповідного методу оцінки їх функціональної активності.

**Мета:** Визначення кінетики росту і морфофункціонального стану клітин-попередників гемопоезу з різних ділянок кісткового мозку, а також з периферичної крові і кордової крові і виявлення особливостей їх функціонування в культурі тканин *in vitro*.

Для досягнення мети було поставлено наступні завдання:

1. Встановити оптимальні умови культивування для клітин-попередників гемопоезу з кісткового мозку, периферичної та кордової крові.
2. Провести культивування стовбурових клітин кісткового мозку з різних ділянок, а також з кордової та периферичної крові.
3. Порівняти колонієутворюючу здатність культивованих клітин з різних джерел *in vitro*.

# РОЗДІЛ 1

## ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

### 1.1.Класифікація стовбурових клітин

Стовбурові клітини - це неспеціалізовані клітини людського організму. Вони характеризуються тим, що здатні диференціюватися в будь-яку клітину організму і мають здатність до самовідновлення.

Стовбурові клітини існують як в ембріонах, так і в дорослих клітинах організмів, відрізняючись по своїм властивостям.

Розрізняють кілька ступенів спеціалізації стовбурових клітин – від тотипотентних до уніпотентних, при цьому ефективність і варіабельність шляхів диференціювання знижується з кожною ступеню, а це означає, що уніпотентна стовбутова клітина не здатна диференціюватися на стільки типів клітин, скільки плюрипотентна.

Тотипотентні стовбурові клітини мають найвищий потенціал диференціювання, вони здатні ділитися і диференціюватися, утворюючи цілий організм, що дозволяє клітинам формувати як ембріональні, так і екстраембріональні структури. Одним із прикладів тотипотентної клітини є зигота, яка утворюється після запліднення яйцеклітини сперматозоїдом. Згодом ці клітини можуть розвинути в будь-який із трьох зародкових листків, або ж утворити плаценту [51].

Приблизно через 4 дні після запліднення, внутрішня клітинна маса бластоцисти, клітини якої були спочатку тотипотентними, стає плюрипотентною. Ця структура є джерелом плюрипотентних клітин.

Плюрипотентні стовбурові клітини (PSCs) в свою чергу утворюють клітини всіх зародкових листків, але не екстраембріональних структур, таких як плацента. Прикладом цього є ембріональні стовбурові клітини, які отримують із внутрішньої клітинної маси ембріонів до імплантації. Іншим прикладом є індуковані плюрипотентні стовбурові клітини.

Наступним етапом розвитку клітин є мультипотентні стовбурові клітини. Вони мають більш вузький спектр диференціювання, ніж PSC, але тим не менш вони можуть спеціалізуватися на розвитку в окремі типи клітин. Одним із прикладів є гемопоетична стовбура клітина, яка може розвиватися в кілька типів клітин крові. Після диференціювання гемопоетична стовбура клітина стає олігопотентною. Потім її здатність до диференціювання обмежується клітинами її походження.

Найвужчими можливостями диференціювання характеризуються уніпотентні стовбурові клітини. Ці клітини здатні утворювати лише один тип клітин [51].

Окрім класифікації, залежної від здатності клітин утворювати інші клітинні типи, існує також і інша класифікація стовбурових клітин, яка широко використовується для клінічного застосування в медицині. Це розподіл на ембріональні стовбурові клітини (ESC), індуковані плюрипотентні стовбурові клітини (iPSC) і дорослі стовбурові клітини (ASC) [10].

Ембріональні стовбурові клітини - стовбурові клітини, виділені з ранніх ембріонів ранніх етапів розвитку або тератокарціноми *in vitro*. Ці клітини можуть бути плюрипотентними.

Іншим важливим типом є індуковані плюрипотентні стовбурові клітини. Було показано, що існує можливість повернути дорослі соматичні клітини до плюрипотентного стану молекулярними маніпуляціями і генетичним перепрограмуванням шляхом примусової експресії генів і певних факторів транскрипції (найбільш популярними є Sox2, c-Myc і KLF-4), щоб отримати «індуковані плюрипотентні стовбурові клітини», які мають деякі з тих же характеристик, що й ембріональні стовбурові клітини, такі як проліферація, морфологія та експресія генів (наприклад, різні поверхневі маркери і білки, що експресуються) [19].

iPSC відрізняються від ESC своєю клітинною епігенетичною пам'яттю, яка може перенаправляти їхній потенціал диференціювання в бік ліній донорських клітин. Перевагою iPSC є те, що їх відносно легко створити, вони

надають корисні інструменти для дослідження ліків і можливість *in vitro* моделювати конкретні захворювання з використанням клітин, отриманих від конкретного пацієнта. Однак для введення факторів перепрограмування в дорослі соматичні клітини використовується вірусна трансфекція, що може призвести до небажаної та непередбачуваної зміни іPSC і обмежити їх застосування [46].

Загалом, критичними недоліками клінічного використання ембріональних та індукованих клітин є їх потенціал імунного відторгнення, утворення тератом і певні етичні норми щодо їх використання та отримання. Саме тому найбільш перспективними є стовбурові клітини, які є у дорослому організмі. Дорослі стовбурові клітини є мультипотентними і мають нижчий потенціал диференціювання, ніж інші, але є цінним природним джерелом для терапевтичної та регенеративної медицини. Таким чином, пошуки вчених зосереджені на вивченні дорослих стовбурових клітин та їх потенційного клінічного застосування [10].

Виділяють два основних типи дорослих стовбурових клітин — це гемопоетичні стовбурові клітини (HSCs) і мезенхімальні стовбурові клітини (MSCs) [5].

Гемопоетичні стовбурові знаходяться в кровотворних органах і самій крові. Ці клітини здатні давати початок, різним типам клітин, що відносяться до системи кровотворення.

Мезенхімальні стовбурові клітини також можуть знаходитися в кістковому мозку, але основна їх локалізація знаходиться в жировій тканині. Такі клітини володіють здатністю до диференціювання в остеобласти, хондроцити, адипоцити, міобласти та фібробласти (можлива також диференціювання в інші типи клітин в умовах *in vitro*).

Іноді також виділяють регіонарні стовбурові клітини, наприклад, шкіри, судин, нервової тканини та інших, які знаходяться в відповідних тканинах і диференціюються в клітини цих тканин [5]. Такі клітини називаються соматичними. Темою даної роботи є гемопоетичні стовбурові клітини.

## 1.2. Типи HSC

Гемопоетичні стовбурові клітини (HSC) — це мультипотентні клітини, які можуть розвиватися в усі типи клітин крові, включаючи клітини мієлоїдної та лімфоїдної лінії. HSC можна знайти в кількох органах, таких як периферична кров, кістковий мозок і пуповинна кров [23]. Ще вони визначаються у фетальній печінці, аорто-гонадо-мезонефросі і плаценті.

Усі лінії клітин крові утворюються шляхом функціонального дозрівання рідкісної популяції мультипотентних HSC, які можуть проліферувати шляхом самовідновлення та диференціювання. HSC, зібрані з різних джерел, відрізняються за клітинними характеристиками та клінічним застосуванням.

HSC клітини можуть демонструвати як загальні функціональні мультипотентні властивості, так і властивості, пов'язані з конкретною лінією розвитку. Важливо, що оскільки кров є високорегенеративною тканиною через її короткий термін життя, кістковий мозок забезпечує динамічний рух різноманітних клітин для підтримки гомеостазу клітин крові. Згідно даним статистики, приблизно один трильйон клітин генерується щодня у кістковому мозку людини для компенсації апоптозу клітин крові, що свідчить про швидку циркуляцію клітин крові та важливість підтримання самовідтворення у цих клітин [40].

З точки зору тривалості репопуляції HSC можна виділити LT-HSC (довгострокові), ST-HSC (короткострокові) та мультипотентний попередник (MPP) [26].

Дана класифікація також дозволяє краще проілюструвати взаємозв'язок між HSC та його нащадками, і поетапний процес їх диференціювання [24]. У цій класичній моделі HSC спочатку розділяють на дві субпопуляції відповідно до експресії CD34: LT-HSC CD34<sup>-</sup> і ST-HSC CD34<sup>+</sup>.

LT-HSC є рідкісною популяцією в кістковому мозку, які знаходяться там в стані спокою, та мають повну довгострокову, більше 3-4 місяців, здатність до відновлення, тоді як ST-HSC мають лише короткочасну, здебільшого менше 1 місяця, здатність до відновлення.

LT-HSC диференціюються в ST-HSC, а згодом ST-HSC диференціюються в мультипотентні попередники (MPP), які не мають здатності до самовідновлення [50].

Перший поділ, який розділяє HSC на одну з двох можливих ланок, відбувається між звичайними мієлоїдними попередниками (CMP з мієлоїдним, еритроїдним і мегакаріоцитарним потенціалом) і звичайними лімфоїдними попередниками (CLP, лише з лімфоїдним потенціалом), які є похідними від MPP. Друга точка розгалуження в CMP відокремлює біпотентні гранулоцити-макрофаги (GMP) і мегакаріоцити-еритроцити-попередники (MEP). CLP далі утворюють Т, В, природні кілери і дендритні клітини, тоді як GMP диференціюються в гранулоцити/моноцити, а MEP генерують мегакаріоцити/еритроцити.

Усі ці популяції утворюють деревоподібну та збалансовану ієрархічну модель, у межах якої ключові транскрипційні фактори і цитокіни відповідають за чітку і точну поетапну диференціацію HSC до зрілих клітин крові [40].

Подібно до стовбурових клітин, зазначені вище клітини-попередники на кожному етапі також можуть функціонувати як потужне джерело клітин у регенеративній медицині [9].

Протягом кількох років MPP розглядалися як гомогенна популяція з обмеженою здатністю до самовідновлення – на відміну від більш незрілого компартменту CD34-CD150+CD48-HSC, але з багатолінійним потенціалом до найраніших мієлоїдних і лімфоїдних попередників в кровотворному дереві. Однак нещодавні дослідження показали, що компартмент MPP більш гетерогенний, ніж очікувалося, і його можна розділити на чотири окремі підгрупи з різними долями походження. MPP1, визначений як CD150+CD48-CD135-, має спільні характеристики з ST-HSC, включаючи здатність до відновлення кількох ліній [6, 23].

У стаціонарному стані вони, імовірно, призводять до функціонально відмінних MPP, упереджених за походженням, які є більш проліферативними, позбавленими потенціалу самовідновлення та визначаються як

мегакаріоцитарно-еритроїдні (ME)-упереджені MPP2 (CD150+CD48+CD135-), гранулоцити/ макрофагальний (GM)-зміщений MPP3 (CD150-CD48+CD135-) і лімфоїдний MPP4 (CD150-CD48+CD135+) [9, 32].

### **2.3. Джерела HSC**

Джерело HSC може значно впливати як на кількість зібраних клітин, так і на їх властивості. Забір HSC з кісткового мозку виконуються від донора під загальною анестезією. Із кількох ділянок уздовж заднього або клубового гребня за допомогою біопсійних голок 8–11 калібру збирають до 1,5 літрів аспірату кісткового мозку. За один раз аспірується не більше 20 мл кісткового мозку на кілограм ваги донора. Вся процедура може тривати до 2,5 години. Ризики даної операції включають кровотечу, інфекцію та локалізований біль [30].

Збір HSC з периферичної крові здається більш простим варіантом отримання, але вимагає попередньої мобілізації стовбурових клітин з кісткового мозку за допомогою таких агентів, як G-CSF та/або плеріксафор. G-CSF вводять протягом 4-5 днів поспіль у дозах від 5 до 15 мкг/кг/добу. Загалом G-CSF дуже ефективний для збільшення концентрації CD34+ клітин у периферичній крові, але в деяких випадках мобілізація є поганою. Плеріксафор можна вводити наприкінці 4-5-денного курсу G-CSF у вигляді одноразової дози 240 мкг/кг за 4-6 годин до збирання аферезом для покращення виходу клітин для аутологічної трансплантації.

Токсичність, пов'язана зі збором концентрату стовбурових клітин периферичної крові, мобілізованої G-CSF, пов'язана з мобілізуючими агентами (біль у кістках, безсоння, грипоподібні симптоми після прийому G-CSF) і процедурами забору (існує імовірність токсичності, пов'язана з антикоагулянтами (гіпокальціємія, кровотеча з центрального венозного катетера і інші можливі негативні наслідки) [3].

Збір клітин з пуповинної крові передбачає відносно просту венепункцію відрізаної пуповини з подальшим дренаванням під дією сили тяжіння в стандартний стерильний мішок з антикоагулянтном крові за допомогою закритої системи, подібної до тієї, що використовується для забору цільної крові. Ця методика дозволяє зібрати приблизно від 80 до 160 мл пуповинної крові. Після вилучення аліквот для планового тестування зразки кріоконсервують у банках пуповинної крові по всьому світу для майбутньої трансплантації. Процедура збору не має побічних ефектів для донора.

Загалом вибір методу забору клітин залежить від донора. Між забором із крові та кістковим мозком більш безпечним виглядає перший. Частота серйозних побічних ефектів, згідно літератури, була нижчою саме у таких донорів. Показано, що введення G-CSF донорам не підвищувало ризик раку, аутоімунних захворювань або інсульту [33]. У той час як у літніх донорів при вилученні клітин з кісткового мозку, може спостерігатись сильний біль у місці біопсії, який може тривати до року після процедури.

Якщо ж говорити про біологічні характеристики стовбурових клітин з різних джерел, то вміст CD34+ клітин є найменшим при зборі пуповинної крові та найвищим у мобілізованих концентратах з цільної периферійної крові. Усі 3 джерела містять Т-клітини, які можуть індукувати реакцію трансплантат проти хазяїна при використанні для алогенної трансплантації, але середня кількість Т-клітин також найвища в концентратах цільної периферійної крові. Хоча Т-клітини присутні в невеликих кількостях у зразках пуповинної крові, вони вважаються імунологічно наївними. Порівнюючи концентрацію клітин кісткового мозку з мобілізованими клітинами G-CSF з цільної периферійної крові, вчені прийшли до висновку, що абсолютна кількість лімфоцитів, моноцитів, Т-клітин і дендритних клітин вища в концентратах з крові, ніж з кісткового мозку. Співвідношення Т-клітин CD4/CD8 у концентратах крові, мобілізованих G-CSF, також було значно вищим, ніж у аспірованому кістковому мозку [30].

Враховуючи ці клітинні характеристики, найбільш безпечною є трансплантація з пуповинної крові, у якій показники гострої та хронічної реакції трансплантат проти хазяїна є найнижчими з 3 джерел стовбурових клітин. Проте стовбурові клітини пуповинної крові демонструють найповільніше приживлення через низьку кількість CD34+ клітин у трансплантаті [39].

#### **2.4. Загальна характеристика HSC**

Було виявлено, що HSC мають унікальні властивості, які відрізняють їх від інших клітин-попередників. На додаток до властивостей плюрипотентності та самовідновлення, було виявлено, що, наприклад, дорослі LT-HSC знаходяться в специфічному середовищі ніші в кістковому мозку, яке тісно пов'язане з ендостом, і де вони існують в умовах відносної гіпоксії [28], що значно впливає на умови культивування.

Серед основних критеріїв, які використовуються для ідентифікації та виділення HSC, є експресія або відсутність експресії специфічних маркерів клітинної поверхні.

Виділення однієї з найбільш детально охарактеризованих популяцій HSC базується на позитивній експресії c-Kit рецептора тирозинкінази (CD117) і мембранного глікопротеїну Sca-1, одночасно з відсутністю кінцевих маркерів (Ter119, Gr-1, Mac-1, B220, CD4 і CD8), які відомі як маркери походження або «Lineage markers» [37].

Отримана популяція c-Kit+Sca-1+Lineage-, яку зазвичай називають клітинами KSL, містить клітини, здатні до відновлення кровотворення. Однак різні дослідження показали, що фракція KSL містить різноманітні попередники, включаючи ST-HSC. Завдяки внеску різних груп з часом були розроблені схеми подальшого збагачення і експансії фракції KSL у загальну фракцію HSC. Ці стратегії базуються або на комбінації з іншими поверхневими маркерами, такими як Thy1.1 (KSL Thy<sup>low</sup> або KTSL), CD34

(KSL CD34<sup>neg/low</sup>) і Flk2 (KSL CD34<sup>-</sup> Flk2<sup>-</sup>) (8), або на фізіологічних властивостях, наприклад, експресувати Hoescht, що спостерігається в клітинах нормальних мишачих гемопоетичних стовбурових клітини.

Також були описані альтернативні методи ідентифікації HSC, які не покладаються на схему KSL. Ці стратегії включають використання таких маркерів, як Tie-2 (11), ендоглін (12) або рецептор ендотеліального протеїну C (EPCR) (13). Можливим також є альтернативний метод, заснований на маркерах із сімейства молекул сигнальної лімфоцитарної активації (SLAM) (CD150<sup>+</sup> CD244<sup>-</sup> CD48<sup>-</sup>). Однак, щоб отримати високу чистоту, цю стратегію слід використовувати в поєднанні з іншими схемами очищення [37].

Окрім цього, було показано, що поверхневий антиген клітини CD133 є ще одним важливим маркером HSC людини. CD133, людський гомолог промініну-1 миші, вперше був ідентифікований як селективна поверхнева молекула HSC людини за допомогою моноклонального антитіла, що розпізнає особливу глікозильовану форму промініну-1, позначену як AC133 [16]. Забір CD133<sup>+</sup> гемопоетичних попередників дає більше 90% CD34<sup>+</sup> клітин і містить всю гемопоетичну популяцію людини. Примітно, що надзвичайно рідкісні HSC-кандидати на CD34<sup>-</sup>, які були ідентифіковані раніше, також знаходяться у фракції CD133 [15].

Отже, збагачені популяції HSC людини також можна отримувати шляхом позитивної селекції на CD34/CD133 та/або шляхом деплеції клітин, пов'язаних із лінією, з використанням моноклональних антитіл, що розпізнають маркери (такі як CD2, CD3, CD14, CD16, CD19, CD24, CD41, CD56, CD66b і CD235a) в контексті методології імуномагнітного або активованого флуоресценцією сортування клітин. У цьому відношенні важливо мати на увазі, що фізичні маніпуляції з HSC під час процедури збагачення можуть не залишитися без впливу на фізіологію клітини [20]. Наприклад, можна припустити, що зв'язування антитіл із CD34/CD133 може запускати внутрішньоклітинні сигнальні шляхи, які можуть модулювати функцію HSC.

Є інші стратегії ідентифікації та збагачення HSC, не пов'язані з поверхневими білками, наприклад, за допомогою використання флуоресцентних барвників.

Родамін 123 (який переважно накопичується в активних мітохондріях) і Hoechst 33342 (біс-бензimidазол, який зв'язується з багатими на аденін та тимін ділянками малої борозенки ДНК) є двома флуоресцентними життєво важливими барвниками, які регулярно використовуються для характеристики популяцій гемопоетичних попередників протягом вже багатьох років [42]. Забарвлювання клітин кісткового мозку миші родаміном 123 продемонструвало, що LT-HSC забарвлюються тьмяно, тоді як більш яскраво забарвлені гемопоетичні попередники складають в основному короткочасну репопуляцію [53]. Крім того, було показано, що субпопуляції клітин кісткового мозку миші, які найслабше забарвлювалися обома барвниками (Родамін 123 та Hoechst 33342), були збагачені на LT-HSC. Зменшення ефективності забарвлювання цими барвниками, як правило, відображає метаболічно та мітотично неактивний стан [4].

Однак зараз зрозуміло, що зниження HSC родаміном 123 і Hoechst 33342 також пов'язане з ефлюксом, опосередкованим принаймні двома членами сімейства транспортерів АТФ-зв'язуючої касети (ABC), ABCB1 (також називаються MDR1 або Р -глікопротеїном) та ABCG2 (також відомий як BCRP, MXR або ABCP) [38].

Окрім цього є можливість використання флуоресцентних субстратів для визначення активності цитозольної альдегіддегідрогенази. Цитозольна альдегіддегідрогеназа (ALDH), фермент, відповідальний за окислення різноманітних внутрішньоклітинних альдегідів, експресується на високих рівнях у HSC, надаючи стійкість до алкілюючих агентів циклофосфаміду та 4-гідроксипероксициклофосфаміду. Флуоресцентні субстрати для ALDH свідчили про свою корисність для ізоляції HSC миші та людини [16].

У дослідженнях як субстрат ALDH використовувався дансиламіноацетальдегід (DAAA). DAAA може вільно дифундувати через

клітинну мембрану, оскільки вона незаряджена. Клітини, що експресують ALDH, окислюють DAAA до дансил-гліцину, який утримується всередині клітин завдяки зарядженій карбоксилатній групі при фізіологічному показнику рН, а клітини ALDH<sup>+</sup> ідентифікуються за флуоресценцією дансилу при збудженні ультрафіолетовим світлом. Для збільшення ефективності ідентифікація її білку був синтезований новий флуоресцентний субстрат для ALDH — BODIPY<sup>TM</sup>-аміноацетальдегід (BAAA), який використовує нетоксичний флуорофор BODIPY<sup>TM</sup>, збудливий видимим світлом [42].

Подібно до DAAA, BAAA є незарядженим і вільно дифундує крізь клітинну мембрану, перетворюючись на BODIPY<sup>TM</sup>-аміноацетат (BAA), який утримується всередині клітини через його сумарний негативний заряд у присутності інгібітора транспортера ABC ABCB1 [2].

Проточний цитометричний аналіз клітин пуповинної крові людини, забарвлених BAAA, ідентифікував популяцію клітин (з частотою ~1%) з яскравою інтенсивністю флуоресценції (ALDHbr) і низьким ортогональним «бічним» розсіюванням світла (SSC<sub>lo</sub>), що включає ~74% клітин CD34<sup>+</sup> і ~46% клітин CD34<sup>+</sup>CD38<sub>lo</sub>/-, які були значною мірою виснажені зрілими Т-клітинами, природними клітинами-кілерами і клітинами, які несли на поверхні мієлоїдні, еритроїдні та тромбоцитарні маркери походження [42].

В іншому дослідженні поряд з виснаженням Lin<sup>-</sup> у поєднанні з відбором клітин ALDHbr за допомогою BAAA продемонстровано збагачення гемопоетичних попередників, які спільно експресують CD133 і CD34 (~73%), і всієї репопуляційної гемопоетичної активності у препаратах пуповинної крові людини. Подальше дослідження, проведене тією ж групою, показало, що перспективна селекція ALDHbrLin<sup>-</sup> клітин пуповинної крові людини для експресії CD133 дає популяцію примітивних попередників, які в основному є CD34<sup>+</sup> (~95%) і які містять всю довгострокову репопуляційну гемопоетичну активність [16].

## 2.5. Методи отримання і культивування HSC.

Сьогодні у кістковому мозку людини та пуповинній крові для визначення LT-HSC з багаторядковим потенціалом відновлення найчастіше використовується профіль поверхні lin<sup>-</sup> CD49f<sup>+</sup> CD90<sup>+</sup> CD45RA<sup>-</sup> CD34<sup>+</sup> CD38<sup>-</sup>CD133<sup>+</sup> CD201<sup>+</sup> GPI-80<sup>+</sup>, тоді як універсальне визначення для MPP людини все ще відсутнє [25].

Але найважливішим у всьому даному процесі є підтримка та розмноження LT/ST-HSC *ex vivo*, що необхідно для лікувальної терапії трансплантацією та для вивчення молекулярних механізмів клітин. Довгострокова мета полягає в подальшій оптимізації методів застосування для клінічної трансплантації гемопоетичних стовбурових клітин (HSCT).

Проте вплив стресу клітинної культури на HSC викликає кілька змін, включаючи втрату поляризації, накопичення активних форм кисню, стрес ендоплазматичного ретикулуму, генотоксичний стрес, реплікативний стрес, порушення білкового гомеостазу та, зрештою, втрату функцій HSC [47]. В результаті цих внутрішніх змін клітин, що відбуваються під час культивування *ex vivo*, кількість LT/ST-HSC з часом зменшується, що супроводжується підвищенням мієлоїдного потенціалу [22].

Ведуться дослідження методів культивування, які дозволяють попередити це. У культивованих HSC для зменшення стресу навколишнього середовища та збереження функцій стовбурових клітин особливо важливим є посиленій протеостаз та динамічна підтримка цілісності протеома [22]. Відсутність вичерпних даних про умови культивування, які сприяють розмноженню LT/ST-HSC при збереженні їх функціональності, все ще є серйозною перешкодою.

В першу чергу, для підтримки популяції LT-HSC у стані спокою необхідно максимально відтворити умови їх існування. Як відомо, кістковий мозок має обмежене надходження кисню, а найбільш стабільні LT-HSC знаходяться в «гіпоксичній ніші», де перфузія крові та напруга кисню низькі

[48]. Гіпоксичні культури *in vitro* з 1–3% кисню посилюють експансію LT/ST-HSC і подальше їх приживлення. За умов нормальної концентрації кисню (20% O<sub>2</sub>) підтримка самовідновлення вимагає присутності високих концентрацій цитокінів. Але тим не менш, при таких концентраціях кисню існує перевага клітин над їх самовідновленням, що не завжди є перевагою [21].

Було визначено мінімальний набір факторів, які імітують фізіологічні умови мікрооточення кісткового мозку і підтримують LT-HSC у стані спокою, але все ще придатних для трансплантації протягом 1 місяця. Мишачі LT-HSC потребують низьких концентрацій цитокінів (3 нг/мл SCF, 0,1 нг/мл TPO), гіпоксії (1% O<sub>2</sub>) і 4% бичачого сироваткового альбуміну (BSA).

Додавання до середовища жирних кислот у зв'язаній з альбуміном формі має вирішальне значення при цьому, оскільки гіпоксія та низькі концентрації цитокінів запускають процес внутрішньоклітинного синтезу жирних кислот, що, в свою чергу, може заважати виживанню HSC [31].

За умов низького рівня цитокінів, гіпоксії та 4% BSA диференціювання пригнічується, і понад 60% клітин залишаються функціональними CD150+ CD48– LT-HSC. Поступове зниження маркерів HSC, включаючи CD150 та EVI1, спостерігалось лише через місяць культивування. LT-HSC людини також підтримувалися в схожих гіпоксичних умовах у 4% BSA з низьким вмістом цитокінів, доповнених жирними кислотами та холестеринном. При цьому близько 90% клітин демонстрували маркерний фенотип CD34+ CD38– і 40% фенотип CD90+ CD45RA–, що відображає мінімальне диференціювання [31]. Іншою важливою сполукою виявилась ретиноева кислота (RA). Показано, що передача сигналів RA висока в сплячих LT-HSC порівняно з ST-HSC і MPP. Біологічно активні похідні ретиноевої кислоти стримують експресію c-MYC, і тим самим зберігають стан спокою LT-HSC *ex vivo* шляхом зниження регуляції контрольних точок G2M [8].

Переконалим є експеримент, в якому LT-HSC миші (CD45+ EPCR+ CD48- CD150+ SCA-1high) і людини (CD34+ CD38- CD90+ CD45RA- CD19- CD49f+) підтримували в сплячому, непроліферативному стані за мінімальних

цитокінових умов протягом 7 днів. Такі клітини вижили без поділу та зберегли свої функціональні властивості, що було визначено за допомогою одноклітинної трансплантації. При цьому шляхи відповіді на стрес разом із гліколізом, біосинтезом жирних кислот, сигнальними шляхами cAMP і mTOR були активовані в цих клітинах, найімовірніше, через вилучення живильних речовин і обмежену доступність цитокінів [29]. Така розробка «спокійної системи LT-HSC *ex vivo*» відкриє шлях для вивчення властивостей LT-HSC у стаціонарному стані та ефектів цільової маніпуляції.

Існують також протоколи бессироваткового культивування LT/ST-HSC людини з використанням комбінацій цитокінів або малих молекул. Зазвичай цитокіни, які використовують для сприяння поділу CD34<sup>+</sup> HSC включають SCF, TPO, FLT3L, гранулоцитарний колоніестимулюючий фактор (G-CSF), IL-6, IL-3 і FGF-1. Використання такого цитокінового коктейлю (SCF, TPO, FLT3L і FGF-1), доповненого білком 1/2, що зв'язує інсуліноподібний фактор росту IGFBP1/2 і ANGPTL5, збільшило кількість людських стовбурових клітин CD34<sup>+</sup> CD38<sup>-</sup> CD90<sup>+</sup> CD133<sup>+</sup> CB [52].

Окрім цього показано, що регулятори розвитку, такі як ліганд NOTCH Delta-1, плейотрофін, StemRegenin-1, UM171, ресвератрол, нікотинамід і вальпроєва кислота (VPA), пришвидшують поділ CD34<sup>+</sup> HSPC у 50 разів [52].

Існують також схвалені FDA маломолекулярні сполуки, наприклад, StemRegenin 1 (SR-1) або UM171, які використовуються на додаток до цитокінів для розмноження CD34<sup>+</sup> HSC людини *ex vivo*. Наприклад, SR-1 протидіє арильному вуглеводневому рецептору (AHR), який регулює гемопоєз через регуляцію HES-1, c-MYC, C/EBP, PU.1, β-катеніну та CXCR4. Миші з нокаутом *Ahr* мають підвищену кількість HSC з вищою швидкістю проліферації та накопиченням плазмоцитоїдних дендритних клітин. Відповідно, антагонізм AHR через SR-1 *ex vivo* підвищував частоту CD34<sup>+</sup> HSC та індукував диференціацію мієлоїдних та плазмоцитоїдних дендритних клітин [45].

У клінічних дослідженнях SR-1 індукував 330-кратне збільшення кількості клітин CD34+ і призводив до швидкого приживлення нейтрофілів і тромбоцитів у пацієнтів. Відповідь на відновлення нейтрофілів розглядається як сурогатний маркер імунітету господаря [25].

UM171 також використовується через те, що він пригнічує LSD1 (H3K4me1/2 деметилазу) і HDAC1/2 (наприклад, H3K27ac деацетилазу), що призводить до відновлення епігенетичних позначок H3K4me2 і H3K27ac, які зазвичай швидко зменшуються в LT/ST-HSC людини *ex vivo*. Слід зазначити, що коли UM171 поєднується з SR-1 і цитокінами (SCF, TPO, FLT3L, IL-6), ефективність поділу ще більше підвищується [25].

Оскільки проблема культивування HSC в тому, що баланс між станом спокою та активацією LT/ST-HSC жорстко регулюється мікрооточенням, то перспективними напрямками у дослідженнях є імітація мікрооточення кісткового мозку, так звані варіанти спільного культивування.

Методи «2,5D спільного культивування» використовують опорні стромальні або ендотеліальні клітини для моделювання ніші кісткового мозку. LT/ST-HSC ростуть поверх прикріплених клітин, або в прямому контакті (контактна культура), або розділених фільтрами (транслункова культура). Транслункові культури обходять необхідність відокремлення клітин HSC від підтримуючих клітин, але є менш ефективними, ніж культури, які дозволяють прямий контакт зі стромою [5]. Найбільш часто при цьому використовуються мезенхімальні стромальні/стовбурові клітини (MSC), оскільки вони активно експресують фактори, які підтримують стан HSC, і значно покращують приживлення клітин.

Проблемою при цьому є те, що первинні MSC негативно регулюють експерсію нішевих факторів (Scf, Cxcl12 і Vcam1) у культурі, і їх здатність підтримувати HSC з часом знижується.

Окрім MSC, ендотеліальні клітини (EC) також можуть служити опорним клітинним шаром. EC, отримані з кісткового мозку, виділяють ангіокринні фактори росту, які сприяють самовідновленню, наприклад, такі як ліганди

VEGF-A та NOTCH. Але тривале збереження первинних ЕС передбачає втрату їх ангиогенних властивостей. Щоб зберегти їх і зробити безсмертними, було введено в ЕС E4orf1. E4orf1 є продуктом аденовірусного гена E4, який забезпечує тривале виживання через тонічне фосфорилування АКТ. Іморталізація ЕС за допомогою E4orf1 дозволяє довгостроково культивувати та ефективно підтримує мишачі LT-HSC під час прямого контакту культури без сироватки, доповненій SCF [7]. Підтримка в основному забезпечується ініціацією сигналізації Notch.

Аналогічно, синусоїдальні ЕС печінки плода людини, сконструйовані та іморталізовані за допомогою E4orf1 (hFLSECs-E4orf1), використовуються для тривалого культивування клітин CD34<sup>+</sup> СВ. Клітини hFLSECs-E4orf1 також забезпечують активацію сигналізації NOTCH, імітують судинну нішу та запобігають виснаженню LT-HSC [25].

Надзвичайно перспективним є наступний крок у культивуванні – використання тривимірних культур LT/ST-HSC, які намагаються імітувати просторову структуру мікрооточення кісткового мозку, забезпечуючи контакти клітини з клітиною або клітини з біоміметичною матрицею.

При цьому клітинні сфероїди або агрегати вирощують на матриці або в суспензії без каркаса. Зазвичай матеріали каркасу/матриці включають природні полімери, такі як альгінат, Matrigel (матриця базальної мембрани), агарозу та бактеріальну наноцелюлозу, гіалуронову кислоту або полімерні матеріали на синтетичній основі [34]; або синтетичні - поліетиленгліколь (PEG), PVA, полі (молочна спільно гліколева кислота) (PLGA), полі (молочна кислота) (PLA) і полі (ε-капролактон) (PCL) [49].

Щоб створити сфероїди без каркасу, різні типи клітин (наприклад, MSC та LT-/ST-HSC) культивують у висячих краплях, мікропланшетах, неадгезивних поверхнях або за допомогою методу примусового плавання (магнітна левітація або підходи на основі перемішування), щоб ініціювати агрегацію та уникати адгезії до чашки з культурою [34].

Дана методика має деякі переваги порівняно з культурами 2,5D:

- Сфероїди володіють більш високими рівнями факторів гемопоетичної ніші, що забезпечуються MSC;
- Забезпечується підтримка форми клітини;
- У культурах 3D існує покращена передача сигналів міжклітинними контактами.

Клітини LT/ST-HSC також можуть бути інкапсульовані в природний або синтетичний полімерний розчин, який зшивається з утворенням гідрогелю. Перевага гідрогелів в тому, що вони є біосумісними, утримують велику кількість води та забезпечують чудову проникність. Гідрогелі змішуються з білками внеклітинного матриксу, такими як фібронектин, колаген, ламінін або глікозаміноглікани, щоб забезпечити приєднання LT/ST-HSC [Raic A.]. Також до цього розчину можуть бути включені цитокіни, малі молекули або інші необхідні фактори.

Недоліком такої інкапсуляції є однорідність матриці, на відміну від пористої губчастої структури кісткового мозку. Хоча клітини мають повний контакт із матрицею гідрогелю або позаклітинного матриксу, прямий контакт між клітинами може бути відсутнім.

Щоб уникнути цієї проблеми, були створені пористі каркаси, де MSC і CD34+ HSC можуть утворювати тісні міжклітинні контакти, покращуючи поділ *ex vivo* [11].

Як 3D-матрицю можна використовувати так званий Wharton's jelly — мукоїдна сполучна тканина, що оточує судини пуповини для забезпечення механічного захисту в утробі матері. Децелюляризований Wharton's jelly (DWJM) служить каркасом позаклітинного матриксу і змішується з первинними MSC людини для підтримки *ex vivo* клітин CD34+ HSC. DWJM має багато спільних компонентів з позаклітинним матриксом кісткового мозку, включаючи колагени, фібронектин, тенасцин-С, гіалуронову кислоту та численні сульфатовані глікозаміноглікани, що мають багато унікальних біохімічних характеристик [17].

Для полегшення роботи, в даний час розробляються самопідтримувані 3D-апарати, такі як невеликі мікрофлюїдні пристрої та великомасштабні біореактори.

Біореактор — це розроблена система, яка дозволяє культивувати велику кількість CD34+ HSC з пуповинної крові за допомогою автоматизованого контролю над подачею середовища, видаленням відходів і перемішуванням.

Мікрофлюїдні пристрої в свою чергу імітують судинну нішу, безперервно постачаючи живильні речовини та кисень, водночас генеруючи градієнти (наприклад, кисень, іони кальцію, цитокіни та малі молекули) [36].

## **2.6. Значення HSC у медицині**

HSC широко використовуються у медицині. Потенціал розвитку HSC зазвичай вважається обмеженим у тому сенсі, що HSC прив'язані виключно до тканини свого походження, а саме до кровотворної системи. Однак деякі дослідження стверджують, що HSC також можуть сприяти розвитку неспоріднених тканин і, таким чином, демонструвати широкий потенціал, не обмежений кровотворними тканинами [27].

Історія використання HSC починається з трансплантації гемопоетичних клітин. Верше значення кісткового мозку було доведено тим, що свинцеве екранування селезінки та кісткового мозку захищає мишей від летального впливу іонізуючої радіації та що трансплантація клітин селезінки чи кісткового мозку тваринам, опроміненим рентгенівським опроміненням, забезпечує захист від загибелі гемопоезу [27].

У 1959 році Thomas та його колеги [44] повідомили, що кістковий мозок здорового однойцевого близнюка відновив кровотворну систему дитини з. Це, а також більш ранні спостереження показали, що необхідний високий ступінь серологічної або генетичної відповідності між донором і реципієнтом і, що також важливо, щоб трансплантат не викликав імунну реакцію проти лейкемії. Спираючись на спостереження за алогенними трансплантаціями

кісткового мозку між собаками з відповідними та несумісними лейкоцитарними антигенами та, удосконалюючи режим абляції для знищення пухлинних клітин, Thomas і його команда подолали одну з головних перешкод трансплантації алогенних клітин шляхом ретельного відбору відповідності донор/пацієнт для людини, типів лейкоцитарного антигену (HLA) перед трансплантацією кісткового мозку і, таким чином, проклали шлях до проведення успішних трансплантацій [27].

Це дослідження стало революційним в сфері трансплантології, привернувши увагу в усьому світі та стимулювавши величезну діяльність із впровадження цього комплексного лікування для великої кількості пацієнтів. Після цього окрім гострої мієлоїдної лейкемії та первинних імунодефіцитів, HSC були використані як терапія для пацієнтів з, хронічною мієлоїдною лейкемією, гострою мієлоїдною лейкемією, апластичною анемією та гемоглобінопатіями [14]. Іншою важливою стадією розвитку використання HSC стало відкриття нових джерел цих клітин. Якщо спочатку їх вилучали з кісткового мозку, то відкриття, вилучення і зберігання HSC пуповинної крові призвело до подальшого збільшення доступності трансплантатів з відповідними типами HLA для пацієнтів, які потребують трансплантації [14].

Клінічні випробування з використанням HSC можна розділити на дві групи: одна група — це дослідження, в яких HSC спрямована на відновлення кровотворної системи (наприклад, злоякісні пухлини крові або кісткового мозку, незлоякісні захворювання крові, солідні пухлини або аутоімунні захворювання); в іншому випадку досліджується можливість HSC утворювати клітини не кровотворної системи (наприклад, клітини печінки, серця або тканини нервової системи) [27].

Сьогодні в межах лікування порушень кровотворної системи трансплантація HSC використовується при різних вроджених і набутих захворюваннях і, залежно від показань до трансплантації, забезпечує або заміну кровотворної системи, ефект трансплантата проти лейкемії (GVL) або корекцію дефекту кровотворення. При гематологічних злоякісних пухлинах

високого ризику, таких як гостра мієлоїдна лейкемія, гостра лімфобластна лейкемія або агресивні лімфоми, HSC використовується після хіміотерапії або променевої терапії для консолідації ремісії пацієнта та забезпечення тривалого лікування. HSC також може використовуватись при лікуванні певних незлоякісних захворювань, таких як апластична анемія, спадкові гемоглобінопатії та синдроми імунодефіциту [13].

Але, незважаючи на величезний прогрес у режимах кондиціонування, імунної відповідності, маніпуляцій з трансплантатом і підтримуючої терапії, залишаються певні проблеми в області трансплантації HSC (HSCT). Критичною проблемою після трансплантації є низький рівень приживлення або його затримка. Це значно підвищує ризик різних типів інфекції, яка залишається однією з найпоширеніших причин смертності після даних операцій, особливо під час фази посткондиціонування нейтропенії. Зазвичай пацієнтам призначають профілактичні антимікробні препарати, щоб зменшити ризик вірусної, бактеріальної або грибової інфекції, однак такі методи лікування несуть ризик власних побічних ефектів, включаючи ускладнення, пов'язані з прийомом ліків, антимікробну резистентність і порушення мікробіому господаря [43]. Сьогодні дана проблема залишається невирішеною до кінця.

Тому дослідження, спрямовані на розуміння процесів приживлення стовбурових клітин, є першим кроком до покращення швидкості приживлення трансплантату та відновлення імунітету, що значно зменшить ризик інфікування після приживлення.

Вплив дози клітин як на швидкість приживлення, так і на ризик відторгнення трансплантату давно відомий. Основною проблемою в HSCT людини є отримання відповідних і достатніх донорських клітин для надійної гемопоетичної репопуляції. Це пов'язано з двома проблемами: нестачею відповідних донорів і обмеженою кількістю HSC, які можна отримати від однієї людини. Використання донорського матеріалу, максимально відповідного реципієнту за HLA, є необхідним, щоб уникнути захворюваності

та смертності від хвороби «трансплантат проти хазяїна», але для багатьох пацієнтів, які потребують пересадки, відповідні донори недоступні [12].

Інший напрямок використання HSC не є настільки привабливим, але і тут є певні перспективи. Наприклад, було показано, що HSC дорослої людини можуть диференціюватися в клітини нервової тканини, хоча й з відносно низькою ефективністю. Спостерігалось також, що HSC ссавців диференціюються з низькою частотою в нервові клітини в різних системах *in vitro* та *in vivo*. Дорослі HSC гризунів і людей, введені внутрішньовенно або внутрішньомозково в організм гризунів-господарів, можуть осідати в мозку та експресувати нейрональні маркери, але частота диференціювання нейронів ніколи не перевищувала 1–2% тих HSC, які інтегруються в мозок *in vivo*. Але повідомлялося про більш високу частоту диференціювання нейронів для HSC та інших стовбурових клітин кісткового мозку *in vitro* в умовах, призначених для сприяння нейронів [41].

Окрім цього було показано, що HSC можуть диференціюватись в клітини печінки при їх спільному культивуванні з ушкодженою печінкою, розділеною бар'єром. Трансплантування HSC мишам із пошкодженням печінки продемонстрували, що HSC може перетворюватися на життєздатні гепатоцити. При цьому функція печінки відновлювалася через 2-7 днів після трансплантації [18]. Але дані напрямки розвиваються не настільки активно, оскільки використання мезенхімальних стовбурових клітин набагато простіше для даних цілей.

Таким чином, вивчення гемопоетичних стовбурових клітин бурхливо розвивається. Все більше з'являється робіт про клітинні і молекулярні механізми розвитку стовбурових клітин в нормі і патології. Проте і на сьогодні залишаються білі плями на шляху отримання необхідної кількості біоматеріалу для трансплантації і подальшої реабілітації пацієнта. Тому вивчення класичних і пошуки нових джерел отримання гемопоетичних стовбурових клітин з метою їх подальшого використання залишається актуальним і доречним.

## РОЗДІЛ 2

### ОБ'ЄКТИ, МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

#### 2.1. Об'єкт дослідження.

**Об'єкт наукового дослідження** – порівняльна характеристика ефективності колонієутворення стовбурових клітин, вилучених з різних джерел

**Предмет дослідження** – властивості гемопоетичних клітин-попередників кісткового мозку, кордової та периферичної крові

#### 2.2. Обладнання та реактиви.

32 зразки кісткового мозку (11 зразків, вилучених з кісткового мозку, у результаті діагностичної пункції грудини, 8 зразків, вилучених з кісткового мозку у результаті торакальної операції, 6 зразків, вилучених у результаті трепанобіопсії верхньої передньої ості клубової кістки, складової тазової кістки, 7 зразків, вилучених з задньої клубової ості складової тазової кістки); 20 зразків пуповинної та 7 - периферичної крові; гепарин (фірми «Ріхтер»); середовище фірми «Sigma» (США); PBS (фосфатно-буферним розчином) фірми Flow (Великобританія) ; живильне середовище «Iscoves» (США) ; 20% фетальну телячу сироватка Serva (США) ; рекомбінантний гранулоцитарно-макрофагальний фактор у концентрації 30 нг/мл (Sigma); 3,3 % агар Difco (США), 10 ммоль/л Нерес, 2 ммоль/л глютаміна,  $5 \times 10^{-5}$  /моль/л меркаптоетанола, антибіотики (пеніцилін і стрептоміцин по 50 Од/мл); коміркові планшети фірми Nunc (Данія); СО 2 інкубаторі фірми Sanjo; світловий мікроскоп Axioscop ( ФРН ); Інвертований мікроскоп (Olimpus, США).

### **2.3. Підготовка тканин для культивування**

Для отримання кісткового мозку використовувалися фрагменти ребер, отримані під час проведення торакотомії. Фрагменти ребер двічі промивали в середовищі 199 з антибіотиками - пеніциліном і стрептоміцином у концентрації 100 Од/мл. Клітки кісткового мозку промивалися середовищем Iscove's, проходили крізь кілька голок зі поетапно зменшуваним діаметром, після чого кількість ядерних клітин підраховувалася. Забір крові з пуповини здійснювався під час пологів у здорових жінок у віці від 20 до 30 років. Клітинну суспензію об'ємом 5 мл поміщали в стерильну пробірку з розчином гепарину в середовищі Iscove's від фірми Sigma (США) з концентрацією 40-50 Од/мл.

Для отримання лейкоконцентрату, 4 мл суспензії клітин периферичної крові змішували з 1 мл 3% трилона Б. Після 30-хвилинного осідання, збирали надосадову рідину.

З метою отримання фракції мононуклеарів, суспензію клітин центрифугували в градієнті щільності 1,04 г/мл і 1,077 г/мл лімфопрепа від фірми Serva (США), при 1500 об/хв протягом 30 хвилин за кімнатної температури, після чого двічі промивали розчином PBS (фосфатно-буферний розчин) від фірми Flow (Великобританія).

### **2.4. Дослідження мієлоїдних попередників у культурі з напіврідким агаровим гелем *in vitro***

Дослідження було здійснене для виявлення комітованих мієлоїдних попередників (грануломоноцитарних, гранулоцитарних, макрофагальних) в кістковому мозку, кордовій крові та периферичній крові. Для культивування клітин було застосовано живильне середовище Iscove's (США), 20% фетальну телячу сироватку від фірми Serva (США), рекомбінантний гранулоцитарно-макрофагальний фактор у концентрації 30 нг/мл (від фірми Sigma), 3,3% агар Difco (США), 10 ммоль/л Hepes, 2 ммоль/л глютаміну,  $5 \times 10^5$ /моль/л 2-меркаптоетанолу та антибіотики (пеніцилін і стрептоміцин у концентрації 50

Од/мл). Культивування кровотворних клітин проводили у стерильних 24-коміркових планшетах від фірми Nunc (Данія). В останню чергу, до планшета вносились клітини (щільність засіву  $1 \times 10^5$  на 1 мл). Культивування проводили в умовах абсолютної вологості при 5% концентрації CO<sub>2</sub> та температурі 37 °C протягом 14 днів.

## **2.5. Визначення мультипотентних колонієутворюючих одиниць у метилцелюлозі *in vitro***

При цьому методі культивування створені культуральні умови досліджуваних клітин дозволяють отримати ріст мультипотентних попередників, які формують змішані колонії з гранулоцитарних, макрофагальних, гранулоцитарно-макрофагальних і еозинофільних клітин, а також бурстформуєчих еритроїдних і колонієформуєчих еритроїдних одиниць.

Для приготування повного живильного середовища використовували середовище RPMI (від GIBCO/BRL), 30% фетальної телячої сироватки від фірми Serva (США), 10% бичачого сироваткового альбуміну від фірми Sigma (США) і рекомбінантний гранулоцитарно-макрофагальний фактор у концентрації 30 нг/мл. Рекомбінантний еритропоетин від фірми Sigma (США) додавався у концентрації 2 Од/мл. Клітинна суспензія змішувалася з таким же об'ємом 1,35% метилцелюлози від фірми Dow Chemicals (Великобританія), яка була заздалегідь приготовлена на середовищі Iscove's від фірми Sigma (США). Дослідження проводились у стерильних 24-коміркових планшетах від фірми Nunc (Данія), де на кожному зразку було виділено 4 лунки. Порожні лунки по периферії планшетів заповнювалися стерильною дистильованою водою. Інкубація проводилася в інкубаторі з CO<sub>2</sub> фірми Sanjo в умовах повної вологості, 5% CO<sub>2</sub> та температурі 37 °C протягом 14 днів. Концентрація мононуклеарів складала від 1 до  $2,5 \times 10^5$  клітин на 1 мл.

## 2.6. Облік результатів клонування

У встановлений термін проводився облік результатів культивування. Колонії-клони були піддані кількісному обліку під інвертованим мікроскопом від компанії Sedival (НДР). Кількісний облік клонів в культурі супроводжувався перерахунком на 100 000 клітин.

Результати бралися як середнє арифметичне кількості клонів, отриманих у 4 культурах. Після кількісного обліку окремі клони ізолювали і поміщали у живильне середовище, яке складалося з 2% ембріональної телячої сироватки в середовищі RPMI (з розрахунку одна колонія - у 0,05 мл середовища). Після цього препарати готували на цитоцентрифузі, фіксували метанолом, забарвлювали за методом Паппенгейма і аналізували під світловим мікроскопом Axioscop від фірми (ФРН).

Частину препаратів фіксували в 3% формаліні для цитохімічного забарвлення. Для виявлення гранулоцитарних і еритроїдних клітин використовували маркерні реакції, такі як визначення активності мієлопероксидази (МПО 1.11.1.7) за методом Loele і забарвлення О-діанідизином (3,3-диметоксибензидином) від компанії Koch-Light (Великобританія). Препарати, фіксовані у метанолі протягом 10 хвилин, занурювали в суміш, що містила О-діанідизин, 3% перекис водню і нітроферриціанід від компанії Sigma (США), інкубували в темряві 10 хвилин, змивали і забарвлювали за методом Паппенгейма. Попередня фіксація препаратів у метанолі сприяла супресії гранулоцитарної пероксидази. Клітини, що дають позитивну цитоплазматичну реакцію на гемоглобін, забарвлювались в залежності від його вмісту від жовтого й оранжевого до темно-коричневого [54].

## 2.7. Статистична обробка

Для аналізу отриманих результатів використовували програму MS Excel. Під час обрахунків для кожної групи даних застосовували формули для обчислення середнього арифметичного зі стандартною середньою похибкою і середнім квадратним відхиленням, які мають такий вигляд:

- значення середнього арифметичного:

$$\bar{x} = \frac{x_1 + x_2 + \dots + x_n}{n} = \frac{\sum x_i}{n}, \text{ де } x_i - \text{значення змінної, } n - \text{кількість значень;}$$

- стандартна середня похибка:

$$\frac{s}{\sqrt{n}}, \text{ де } s - \text{стандартна помилка середньої;}$$

- середнє квадратичне відхилення:

$$\delta = \frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n}$$

Для визначення статистичної достовірності показників використовували критерій Стьюдента:

$$F_{\text{набл.}} = \frac{\bar{X}_1 - \bar{X}_2}{\sqrt{\frac{\sigma_1^2}{n_1} + \frac{\sigma_2^2}{n_2}}}$$

, де  $\bar{X}_1$  та  $\bar{X}_2$  - вибіркові середні значення першої та другої вибірок.

Різницю вважали достовірною на рівні значущості 5 % ( $p \leq 0,05$ ).

## РОЗДІЛ 3

### РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

#### 3.1 Аналіз результатів сепарації кровотворних клітин, отриманих з різних джерел, в залежності від способу очищення моноклеарної фракції

Для отримання моноклеарних клітин було проведено очищення клітинної суспензії шляхом відстоювання (отримання лейкоцитарної плівки) та подвійної сепарації у градієнті щільності 1,04 і 1,077 г/мл. Результати, представлені у таблиці 3.1., показали, що під час відстоювання в культуру потрапляє невелика кількість клітин-попередників порівняно з іншими методами очищення. Проте, якщо порівняти пуповинну кров з кістковим мозком, видно, що експресія колонієутворюючих одиниць (ЕКУ) останнього при відстоюванні в 3 рази менша і становить відповідно  $7,2 \pm 1,2$  і  $2,5 \pm 0,5$ .

Перший етап седиментації кровотворних клітин у градієнті щільності лімфопрепу (1,04 г/мл) дозволив збільшити ефективність клонування в 5 разів, завдяки очищенню від тромбоцитів і еритроцитів, наявність яких у культурі пригнічує колонієутворення [55]. Седиментація у градієнті лімфопрепу (1,077 г/мл) сприяла підвищенню цього показника в 10 разів, а подвійна седиментація - в 18 разів. Це свідчить про те, що клітини, клоновані в культурі, знаходяться у фракції моноклеарів (табл.3.1).

Таблиця 3.1

Ефективність колонієутворення кровотворних клітин-попередників кордової крові в культурі в залежності від способу очищення моноклеарної фракції

Спосіб очищення	Кількість експлантованих клітин	Кількість пасажів клітин	Е К У/10 <sup>5</sup>	Кратність
Відстоювання	1x10 <sup>5</sup>	10	7,2 ± 0,5*	-
Розділення у градієнті щільності 1,04 г/мл	1x10 <sup>5</sup>	6	35,6 ± 1,2*	5
Розділення у градієнті щільності 1,077 г/мл	1x10 <sup>5</sup>	9	68,0 ± 1,7*	10
Подвійне розділення у градієнті щільності 1,04 г/мл і 1,077 г/мл	1x10 <sup>5</sup>	18	130,0 ± 2,5*	18

Примітка: \* - відмінності між порівнюваними показниками статистично вірогідні (P < 0,001)

### 3.2 Вивчення кінетики колонієутворення в культурі *in vitro* кровотворних клітин-попередників, отриманих з різних джерел

Для підтвердження того, що клітинні агрегати є клонами, необхідно мати дані про співвідношення між кількістю експлантованих агрегатів і кількістю сформованих колоній у культурі протягом двох тижнів. Клітинні агрегати можуть бути вважатись клонами, якщо спостерігається лінійна залежність між кількістю висаджених клітин і кількістю утворених клонів. Для встановлення такої залежності було введено клітини кісткового мозку (1-а група дослідів), кордової крові (2-а група) та периферичної крові (3-я група) в різних концентраціях в комірки 24-коміркової планшети (від 0,16 x 10<sup>5</sup> до 16 x 10<sup>5</sup>). Дослідження проводилися одночасно для моноклеарних клітин кісткового мозку, кордової крові і периферичної крові. Результати цих досліджень наведені у таблиці 3.2.

Таблиця 3.2

Залежність кількості утворених колоній від кількості клітин кісткового мозку, посаджених в культуру *in vitro*

Кількість клітин в 1 мл суспензії /10 <sup>5</sup>	Кількість колоній на культуру КМ	Кількість колоній на культуру КК	Кількість колоній на культуру ПК
0,16	0	0	0
0,33	10,8 ± 0,5*	20,1 ± 1,2*	0,5 ± 0,2*
1	38,6 ± 0,9*	82,3 ± 2,3*	1,0 ± 0,3*
2	57,5 ± 1,4*	123,3 ± 5,6*	2,5 ± 0,5*
3	66,0 ± 1,1*	159,6 ± 4,8*	3,3 ± 0,2*
4	34,0 ± 1,2*	79,1 ± 3,3*	1,0 ± 0,3
6	22,3 ± 2,5*	52,6 ± 2,5*	0
8	10,5 ± 2,2*	25,8 ± 1,8*	0
16,0	1,5	2,0	0

Примітка: \* - відмінності між порівнюваними показниками статистично вірогідні (P < 0,001)

У нашому дослідженні було встановлено, що існує зона лінійної залежності між кількістю експлантованих клітин і кількістю утворених клонів у культурі. Ця залежність була помічена в інтервалі концентрацій між 0,33 x 10<sup>5</sup> і 3 x 10<sup>5</sup> клітин на 1 мл. Це свідчить про те, що клітинні агрегати, що утворилися в культурі, є клонами. Дослідження також показали, що клонування було найефективнішим у другій групі, яка використовувала кордову кров. Ефективність клонування цієї групи була вищою, порівняно з першою групою (клітини кісткового мозку) і третьою групою (клітини периферичної крові). Для кордової крові коефіцієнт утворення колоній (ЕКУ) становив 82,3 ± 2,3 на 1x10<sup>5</sup> експлантованих клітин, для кісткового мозку - 38,6 ± 0,9, а для периферичної крові - 1,0 ± 0,3. Падіння колонієутворення, починаючи з 4 x 10<sup>5</sup> експлантованих клітин пояснюється, на наш погляд, високою щільністю посіву, який несумісний з активним ростом клітин.

Були проведені дослідження кінетики колонієутворення у культурі мононуклеарів, отриманих з різних джерел, таких як кістковий мозок, кордова кров і периферична кров. Протягом цих досліджень щоденно спостерігався розвиток клонів і були отримали наступні результати.

На другий день культивування виявилися перші клітинні агрегати у культурах, отриманих з кісткового мозку і кордової крові. Перші колонії з'явилися на 4-5-й день. Поступово кількість колоній збільшувалась, а разом з ними зростала і кількість кластерів. Однак, починаючи з 8-го дня, кількість кластерів почала зменшуватися і досягла стабільних значень на 12-14-й день. Можливо, можна припустити, що до цього моменту формування нових колоній припиняється, а деякі клітинні агрегати, які раніше вважались кластерами, шляхом подальшої проліферації перетворюються на колонії. Протягом цього періоду не утворюються нові кластери, а ті, що залишаються у культурі, не змінюються. Ймовірно, ці кластери є нащадками пізніших клітинних попередників, ніж колонієутворюючі одиниці, і вони мають обмежену здатність до проліферації.

Після 14-го дня культивування компактні колонії починають заміщуватися змішаними та дифузними структурами. При продовженні тривалості культивування спостерігається зниження життєздатності культури. Проліферація та диференціація попередників з периферичної крові починається пізніше, на 6-8-й день, і відбувається в період, коли колонієутворення в культурах кісткового мозку і кордової крові досягає піку. Це означає, що попередники з периферичної крові мають тривалий період затримки (Lag період) у культурі перед початком проліферації.

### **3.3 Оцінка функціональної активності кровотворних клітин-попередників *in vitro* з різних джерел**

Основною перевагою будь-якої культуральної системи гемопоетичних клітин є здатність до тривалого підтримання життєдіяльності стовбурових клітин [57, 58]. Це сприяє нормальному функціонуванню комітованих клітин-

попередників, що призводить до формування пулу дозріваючих та зрілих клітин. Метою наших досліджень було визначити функціональну активність кровотворних клітин-попередників, отриманих з різних джерел, таких як кістковий мозок, кордова і периферична кров, і оцінити їх потенціал для проліферації.

Середня ефективність колонієутворення (ЕКУ), що виражається кількістю гемопоетичних клітин-попередників на  $1 \times 10^5$  експлантованих клітин, у кордової крові дорівнювала 113,0. Згідно з літературними даними, ефективність клонування клітин-попередників з кордової крові, залежно від автора, рухається в діапазоні від 81,5 до 157,0. Наприклад, згідно з даними О. Владимирської та співавт., ЕКУ становила від 141,0 до 157,0 [56]. Щодо концентрації гранулоцитарно-макрофагальних клітин-попередників у кордовій крові новонародженої дитини, наявні дані суперечливі. За деякими авторами, ефективність клонування моноклеарів кордової крові відповідає їх концентрації у кістковому мозку дітей після народження [64]. За іншими даними [59], кордова кров має більший проліферативний потенціал, ніж кістковий мозок, і може ефективніше забезпечити репопуляцію.

Таблиця 3.3. містить результати культивування гемопоетичних клітин-попередників різних напрямків диференціації, отриманих з кісткового мозку, кордової крові і периферичної крові. Виявлено переважаючий ріст бурстутворюючих еритроїдних попередників у периферичній крові і колонієутворюючих еритроїдних одиниць у кістковому мозку людини. Це свідчить про те, що попередники з периферичної крові мають більшу спорідненість до бурстутворюючих еритроїдних одиниць, а попередники з кісткового мозку більше споріднені з колонієутворюючими еритроїдними одиницями.

Червоні клітини, що формуються з бурстутворюючих еритроїдних одиниць (рис 3.1.), є більш примітивними і ближчими до стовбурових клітин в онтогенезі порівняно з колонієутворюючими еритроїдними одиницями. З

свого боку, колонієутворюючі еритроїдні одиниці є більш зрілими комітованими попередниками, розташованими ближче до нормобластів.

Таблиця 3.3.

Ефективність клонування ( ЕКУ) гемопоетичних клітин-попередників з різних кровотворних джерел *in vitro*

Джерело стовбурових . клітин	ГЕММ (мікс-колонії)	КУО-Е M±m	БУО-Е M±m	КУО-ГМ M±m	ЕКУ M±m
Кістковий мозок n=10	3,2 ± 0,6*	19,1 ± 0,5*	8,0 ± 0,8*	38,6 ± 1,2*	68,9 ± 0,5*
Кордова кров n=20	7,0 ± 0,9*	8,0 ± 0,6*	32,7 ± 1,5*	82,3 ± 3,6*	113,0 ± 6,6*
Периферична кров n=7	0	1,7 ± 0,4*	5,7 ± 1,7*	1,1 ± 0,4*	8,5 ± 2,5*

Примітка: \* - відмінність між порівнюваними показниками статистично достовірна (P < 0,001)

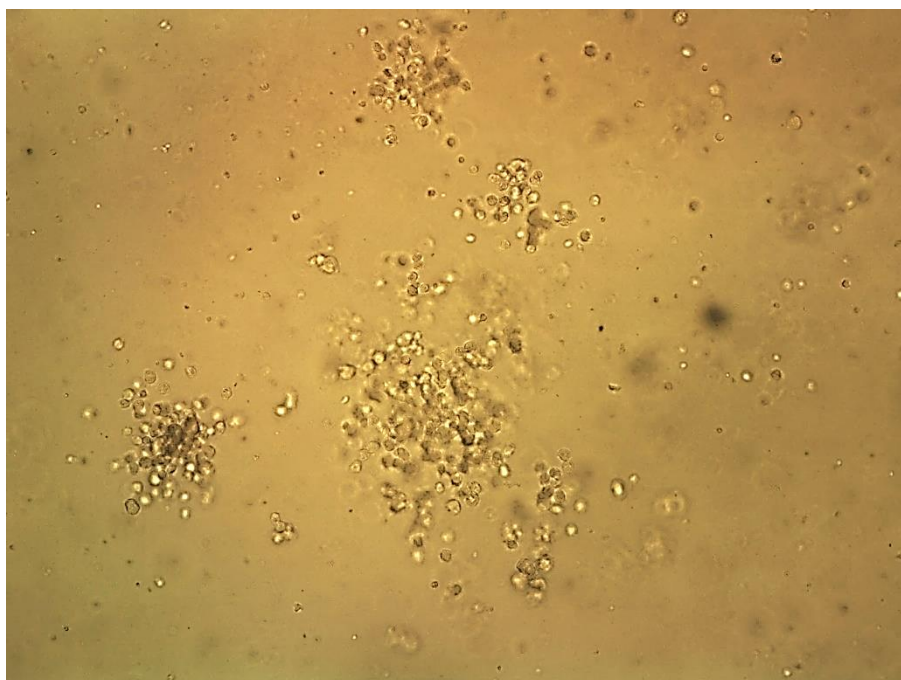


Рис. 3.1. Бурстутворююча еритроїдна колонія в культурі кордової крові. Зйомка в напіврідкому агарі. Збільшення x100.

Отже, результати досліджень підтверджують, що еритроїдні попередники з периферичної крові є більш примітивними, ніж еритроїдні попередники з кісткового мозку. Довший період Lag перед початком проліферації також свідчить про більшу примітивність клітин-попередників з периферичної крові порівняно з клітинами-попередниками з кісткового мозку. Ця точка зору знаходить підтримку у дослідників, які показали, що попередники з периферичної крові мають меншу щільність, ніж попередники з кісткового мозку, і синтезують більше фетального гемоглобіну [60]. Аналогічно до еритроїдних попередників, автори приходять до висновку, що колонієутворюючі одиниці з периферичної крові є більш примітивними, ніж колонієутворюючі одиниці з кісткового мозку.

Проте існує протилежна точка зору. Дослідження Черткова та співавторів [61] показали, що для циркулюючих стовбурових клітин кількість дочірніх стовбурових клітин з 11-денних колоній, отриманих з летально опромінених дорослих мишей, менша, ніж для кістковомозкових стовбурових клітин. Дані останніх років внесли нові данні про колоніє- і бурстутворення кровотворних клітин-попередників в культурі [62].

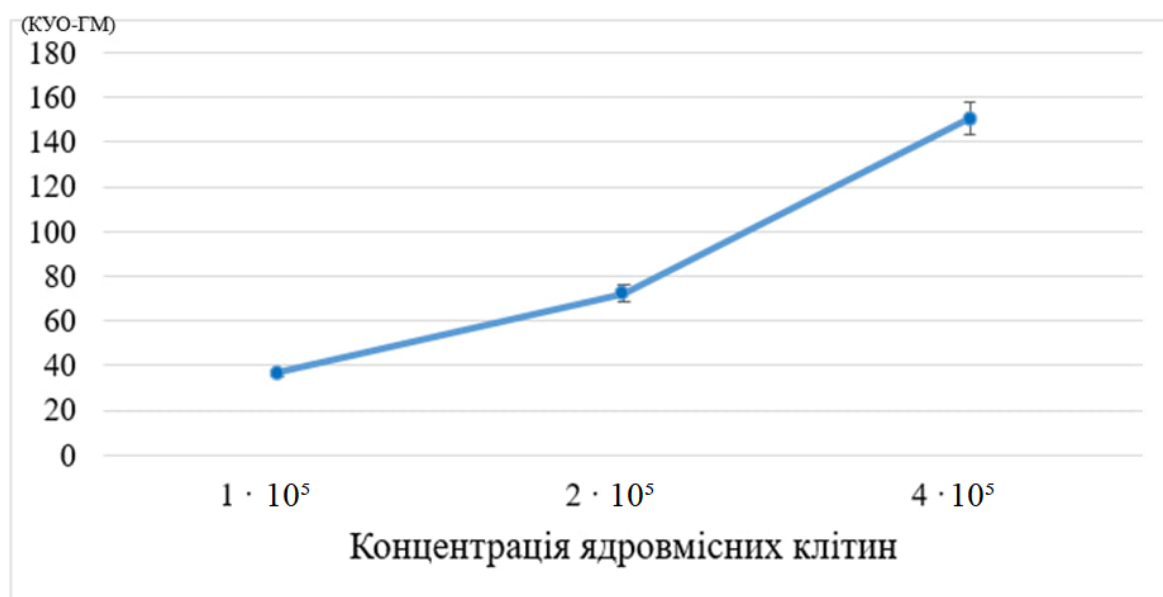
У кістковому мозку виявлено біпотентні бустутворюючі еритро-мегакаріоцитарні клітини-попередники, які утворюють в культурі з метилцелюльозою і в плазменому згустку колонії, що відрізняються від КОУ-ГЕММ. Клональний характер цих клітинних агрегатів в культурі підтверджується імунофенотипуванням окремих клонів. Вони належать до клітинної фракції CD34<sup>+</sup> CD38<sup>+</sup> або CD34<sup>+</sup> CD38<sup>-</sup> і є наступним етапом у розвитку стовбурових клітин.

### **3.4 Кінетика залежності кількості колонієутворюючих гранулоцитарно-макрофагальних одиниць від концентрації ядровмісних клітин, у культурі.**

Для оцінки функціональної активності кровотворних клітин-попередників, отриманих з різних кісток, проводили їх культивування *in vitro*

у напіврідкому агарі. Першим етапом дослідження було встановлення оптимальної кількості клітин, необхідної для подальшого дослідження, оскільки ефективність колонієутворення клітин-попередників кісткового мозку може залежати від місця їх отримання. Також метою цього етапу досліджень було визначити, чи є угруповання клітин в культурі колоніями-клонами. Для цього суспензію ядровмісних клітин кісткового мозку культивували з різними кінцевими концентраціями:  $0,5 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^5$ ,  $2 \times 10^5$ ,  $4 \times 10^5$ ,  $5 \times 10^5$  клітин на 1 чашку. Всі інші параметри культивування, такі як склад живильного середовища, тривалість інкубації та умови, не змінювались. Культивування проводили у п'яти повторах, а показник колонієутворення для кожної концентрації клітин визначали за Стюдентом, обчислюючи середню кількість клітинних агрегатів з урахуванням похибки. Результати цих досліджень наведені на графіку 3.1.

Графік 3.1. Залежність кількості колонієутворюючих одиниць гранулоцитарно-макрофагальних (КУО-ГМ), утворених при культивуванні суспензії клітин кісткового мозку пацієнтів без злоякісних гематологічних захворювань від концентрації ядровмісних клітин, експлантованих у культуру



Примітка: \* - відмінність між порівнюваними показниками статистично достовірна ( $P < 0,001$ )

Після аналізу отриманих результатів було виявлено, що кількість клітинних агрегатів, які формувалися під час культивування у напіврідкому агарі, лінійно зростала зі збільшенням концентрації ядровмісних клітин кісткового мозку, які були занурені в агар перед початком культивування. Виявлено, що найоптимальніший час культивування становив 14 днів, коли було спостережене найбільш ефективне утворення колоній клітинами, отриманих з грудної кістки. За використання найнижчої концентрації моноклеарних клітин кісткового мозку ( $0,5 \times 10^5$  клітин на чашку), клітинні агрегати не утворювалися зовсім. Відсутність колоній та кластерів протягом 14 днів культивування у такій концентрації може бути пов'язана з відсутністю міжклітинних взаємодій, які є важливими для виживання клітин у культурі.

При використанні вищої концентрації ядровмісних клітин кісткового мозку у пацієнтів без злоякісних гематологічних захворювань ( $4,0 \times 10^5$  клітин на камеру), візуалізація окремих клітинних агрегатів значно ускладнювалася через їх надмірну щільність, демонструючи зливний ріст. Тому для проведення досліджень була використана кінцева концентрація  $1 \times 10^5$  клітин на культуру.

Результати культивування були порівняні на 12-й, 14-й і 16-й день. Максимальна кількість колоній спостерігалася на 14-й день (12-й день -  $38,0 \pm 2,5$  колоній, 14-й день -  $43,5 \pm 3,3$ , 16-й день -  $35,5 \pm 4,2$ ). У наступних дослідженнях було виділено два основних типи клітинних агрегатів: колонії (колонієутворюючі одиниці, КУО) та кластери (кластероутворюючі одиниці, КлУО), кількість яких окремо підраховували для кожного зразка. Було визначено три типи колоній, які спостерігалися в культурі: компактні колонії, колонії з вінчиком і дифузні колонії (рис. 3.2.). Виявлено, що колонії мають об'ємну форму та ростуть у агарі як у горизонтальній, так і у вертикальній площині.

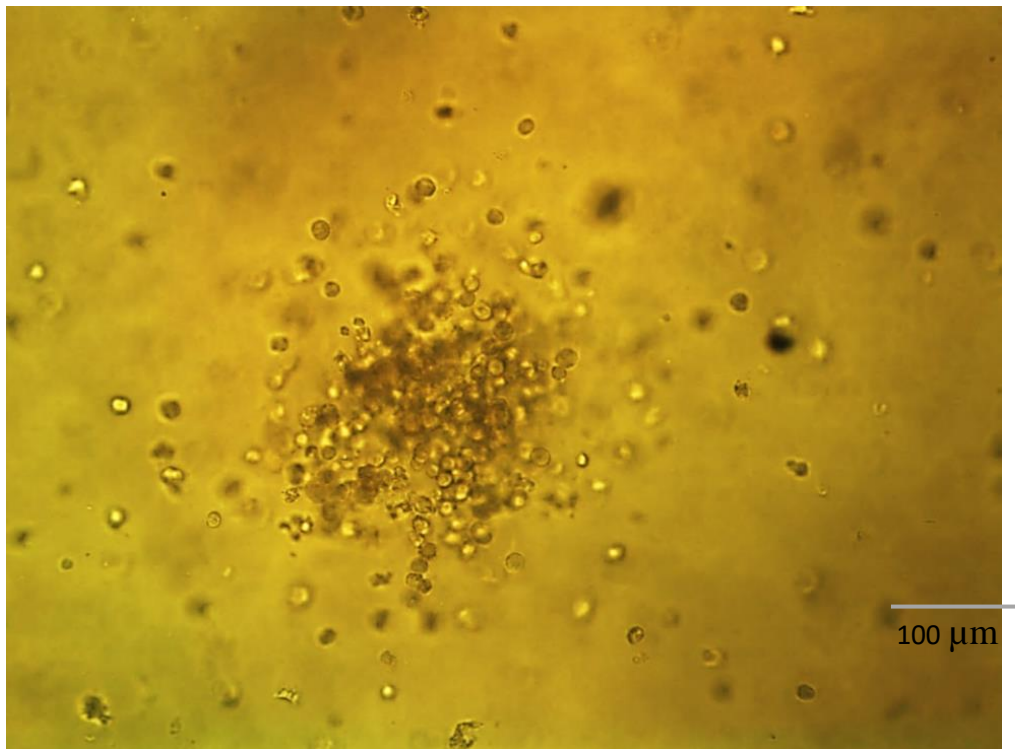


Рис. 3.2. Компактна колонія з вінчиком, утворена після культивування суспензії клітин-попередників кісткового мозку, вилученого з груднини, у напіврідкому агарі протягом 14 діб. Інвертований мікроскоп

### **3.6 Колонієутворення гемопоетичних клітин-попередників у залежності від місця забору кісткового мозку.**

Для культивування клітин у культурі з напіврідким агаром використовували кістковомозкові клітини, отримані з різних місць, зокрема з грудної кістки, ребр, передньої верхньої секції клубової кістки та задньої верхньої секції клубової кістки. Результати досліджень свідчили про відсутність значної різниці в колонієутворюючій здатності кістковомозкових клітин залежно від місця їх отримання. Наприклад, ефективність колонієутворення для стернального пунктату складала  $43,5 \pm 3,3$ , для кісткового мозку з фрагмента ребра –  $42,5 \pm 3,8$ , з передньої верхньої ділянки гребня клубової кістки –  $40,5 \pm 5,3$ , а з задньої верхньої ділянки гребня клубової кістки –  $42,3 \pm 6,5$  ( $p > 0,05$ ). Проліферативний потенціал клітин визначали, оцінюючи співвідношення колоній до кластерів на основі кількості експлантованих клітин у розмірі  $1 \times 10^5$  з кожного місця забору біологічного

матеріалу. Дослідження не показали значної різниці в проліферативному потенціалі клітин у культурах, отриманих з різних місць розташування у кістковій тканині. Відсутність різниці в співвідношенні колоній і кластерів свідчить про те, що не лише кількість раних клітин-попередників кісткового мозку є подібною в порівнянних групах, але і кількість їхніх більш диференційованих нащадків, які мають менший потенціал до диференціювання та утворюють кластери в напіврідкому середовищі.

Таблиця 3.4.

Колонієутворення гемопоетичних клітин-попередників кісткового мозку у пацієнтів без онкогематологічних відхилень у залежності від місця забору кісткового мозку

Місце забору кісткомозкових клітин	Кількість обстежених	Колонієутворююча активність	Поліферативний потенціал
Стернальний пунктат	11	43,5 ± 3,3	1,0 ± 0,28
Фрагмент ребра	8	42,5 ± 3,8	0,9 ± 0,77
Трепанобіоптат з клубової кістки ( <i>spina iliaca anterior superior</i> )	6	40,5 ± 5,3	1,1 ± 0,18
Трепанобіоптат з клубової кістки ( <i>spina iliaca posterior superior</i> )	7	42,3 ± 6,5	1,0 ± 0,48
Всього	32		

Примітка: \* - відмінність між порівнюваними показниками статистично достовірна (P < 0,001)

### 3.7 Морфофункціональна оцінка клітин, виділених з колоній *in vitro*.

На наступному етапі експерименту, були досліджені зразки культур, які містять кровотворні клітини з трьох джерел: кісткового мозку (КМ), крові (КК) і пуповинної крові (ПК) *in vitro*. Після фіксації і забарвлення, ці зразки були досліджені під світловим мікроскопом (рис. 3.3.). Ранні гранулоцити включали промієлоцити, мієлоцити, метамієлоцити і юні клітини, тоді як до пізніх гранулоцитів відносилися палочкоядерні і сегментоядерні лейкоцити (табл. 3.5.).

Таблиця 3.5

Цитологічний аналіз клонів кісткового мозку, кордової крові і периферичної крові людини в культурі *in vitro*

Диференційований облік клітин, %						
Джерело клітин-попередників	Бластні форми	Ранні гранулоцити	Пізні гранулоцити	Макро фаги	Мітоз	Зруйновані
Кістковий мозок	3	19	68	10	1	3
Кордова кров	18	56	13	13	2	7
Периферична кров	5	30	54	11	0	14

Примітка: \* - відмінність між порівнюваними показниками статистично достовірна (P < 0,001)

Після проведення морфологічного аналізу клітин з культур клітин-попередників, встановлено, що клони з кордової крові переважно склалися з молодих проліферуючих гранулоцитів (74%), при цьому ранні гранулоцити переважали над пізніми. Клітини макрофагів склали 13% від загальної кількості клітин. Натомість, у випадку клітин-попередників з кісткового мозку, на відміну від клітин з кордової крові, культури склалися з дозріваючих і зрілих клітин. Колонії БУО-Е в культурі кордової крові на 85,8%

склалися з проеритробластів, базофільних і поліхроматофільних еритробластів.

Одною з відмітних характеристик клітин-попередників з кордової крові є більший відсоток ранніх клітин у культурах кордової крові порівняно з кістковою мозковою і периферичною кров'ю. Це свідчить про більші проліферативні можливості клітин КК. Незважаючи на те, що обсяг кордової крові, який можна зібрати під час пологів, може варіюватися, менша доза цих клітин може бути ефективнішою порівняно з кістковою мозковою, завдяки їх високому проліферативному потенціалу і більшій схильності до репопуляції і заселення кровотворних територій.

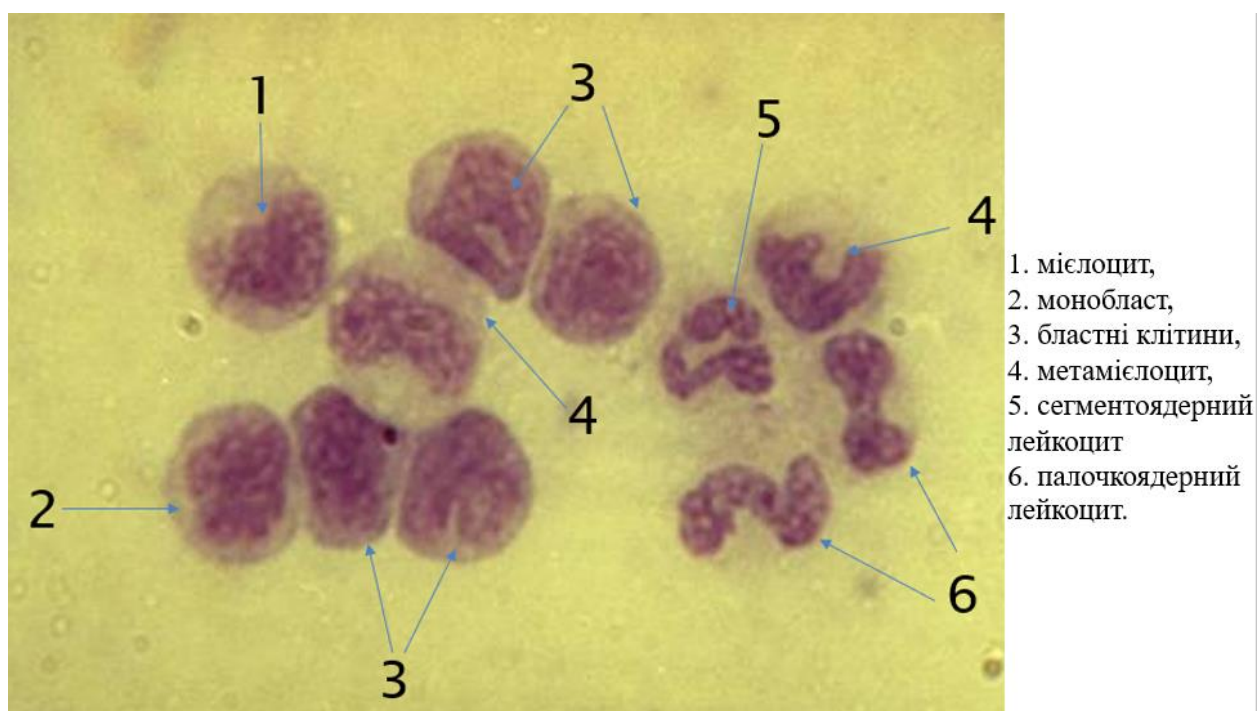


Рис. 3.3. Ранні проліферуючі та дозріваючі клітини, виділені з ГЕММ колоній кордової крові. Забарвлення за Паппенгеймом. Збільшення x 900

## ВИСНОВКИ

1. У даній роботі проведено опис кінетики зростання та морфофункціонального стану клітин-попередників гемопоезу, отриманих з кісткового мозку, периферичної крові та кордової крові. Виявлено особливості їх функціонування в умовах культивування тканин *in vitro*.

2. Здійснений аналіз культивування клітин *in vitro* показав, що ефективність клонування та клітинність клонів залежали від джерела стовбурових клітин.

3. Результати колонієутворення кровотворних клітин-попередників з різних ділянок кісткового мозку *in vitro* та аналіз їх морфологічних характеристик свідчили про те, що морфологія клітинних клонів не залежала від місця знаходження і була сталою.

4. Встановлено, що колонієутворюючі одиниці кордової крові є ранніми попередниками, що складаються переважно з проліферуючих гемопоетичних клітин. Ці клітини мають високий потенціал проліферації, що підтверджено даними, отриманими в культурних умовах *in vitro*.

5. Вибір кордової крові як джерела обумовлений її високим проліферативним потенціалом і є підґрунтям пошуку кращих умов культивування для накопичення необхідної кількості стовбурових клітин у разі алотрансплантації.

## ПЕРЕЛІК ПОСИЛАНЬ

1. Alvarez, C. V., Garcia-Lavandeira, M., Garcia-Rendueles, M. E., Diaz-Rodriguez, E., Garcia-Rendueles, A. R., Perez-Romero, S., Vila, T. V., Rodrigues, J. S., Lear, P. V., & Bravo, S. B. (2012). Defining stem cell types: understanding the therapeutic potential of ESCs, ASCs, and iPS cells. *Journal of molecular endocrinology*, 49(2), R89–R111.
2. Armstrong, L., Stojkovic, M., Dimmick, I., Ahmad, S., Stojkovic, P., Hole, N., & Lako, M. (2004). Phenotypic characterization of murine primitive hematopoietic progenitor cells isolated on basis of aldehyde dehydrogenase activity. *Stem cells (Dayton, Ohio)*, 22(7), 1142–1151.
3. Bernitz, J. M., Daniel, M. G., Fstkhchyan, Y. S., & Moore, K. (2017). Granulocyte colony-stimulating factor mobilizes dormant hematopoietic stem cells without proliferation in mice. *Blood*, 129(14), 1901–1912.
4. Bertoncello, I., & Williams, B. (2004). Hematopoietic stem cell characterization by Hoechst 33342 and rhodamine 123 staining. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 263, 181–200.
5. Biehl, J. K., & Russell, B. (2009). Introduction to stem cell therapy. *The Journal of cardiovascular nursing*, 24(2), 98–105.
6. Bonaud, A., Lemos, J. P., Espéli, M., & Balabanian, K. (2021). Hematopoietic Multipotent Progenitors and Plasma Cells: Neighbors or Roommates in the Mouse Bone Marrow Ecosystem?. *Frontiers in immunology*, 12, 658535.
7. Butler, J. M., Nolan, D. J., Vertes, E. L., Varnum-Finney, B., Kobayashi, H., Hooper, A. T., Seandel, M., Shido, K., White, I. A., Kobayashi, M., Witte, L., May, C., Shawber, C., Kimura, Y., Kitajewski, J., Rosenwaks, Z., Bernstein, I. D., & Rafii, S. (2010). Endothelial cells are essential for the self-renewal and repopulation of Notch-dependent hematopoietic stem cells. *Cell stem cell*, 6(3), 251–264.
8. Cabezas-Wallscheid, N., Buettner, F., Sommerkamp, P., Klimmeck, D., Ladel, L., Thalheimer, F. B., Pastor-Flores, D., Roma, L. P., Renders, S., Zeisberger,

- P., Przybylla, A., Schönberger, K., Scognamiglio, R., Altamura, S., Florian, C. M., Fawaz, M., Vonficht, D., Tesio, M., Collier, P., Pavlinic, D., ... Trumpp, A. (2017). Vitamin A-Retinoic Acid Signaling Regulates Hematopoietic Stem Cell Dormancy. *Cell*, *169*(5), 807–823.e19.
9. Cheng, H., Zheng, Z. & Cheng, T. New paradigms on hematopoietic stem cell differentiation. *Protein Cell* **11**, 34–44 (2020).
10. Ebrahimi, M., & Botelho, M. (2017). Adult Stem Cells of Orofacial Origin: Current Knowledge and Limitation and Future Trend in Regenerative Medicine. *Tissue engineering and regenerative medicine*, *14*(6), 719–733.
11. Eggermont, L. J., Rogers, Z. J., Colombani, T., Memic, A., & Bencherif, S. A. (2020). Injectable Cryogels for Biomedical Applications. *Trends in biotechnology*, *38*(4), 418–431.
12. Fabrizio, V., Wahlquist, A., Hill, E., Williams, E., Kramer, C., Jaroscak, J., Duong, A., Garrett-Mayer, E., & Hudspeth, M. (2018). The effect of bone marrow graft composition on pediatric bone marrow transplantation outcomes. *Pediatric transplantation*, *22*(8), e13287.
13. Fraint, E., Ulloa, B. A., Feliz Norberto, M., Potts, K. S., & Bowman, T. V. (2021). Advances in preclinical hematopoietic stem cell models and possible implications for improving therapeutic transplantation. *Stem cells translational medicine*, *10*(3), 337–345.
14. Gluckman, E., Ruggeri, A., Rocha, V., Baudoux, E., Boo, M., Kurtzberg, J., Welte, K., Navarrete, C., van Walraven, S. M., & Eurocord, Netcord, World Marrow Donor Association and National Marrow Donor Program (2011). Family-directed umbilical cord blood banking. *Haematologica*, *96*(11), 1700–1707.
15. Hawley, R. G., Ramezani, A., & Hawley, T. S. (2006). Hematopoietic stem cells. *Methods in enzymology*, *419*, 149–179.
16. Hess, D. A., Wirthlin, L., Craft, T. P., Herrbrich, P. E., Hohm, S. A., Lahey, R., Eades, W. C., Creer, M. H., & Nolte, J. A. (2006). Selection based on CD133

- and high aldehyde dehydrogenase activity isolates long-term reconstituting human hematopoietic stem cells. *Blood*, *107*(5), 2162–2169.
17. Jadalannagari, S., Converse, G., McFall, C., Buse, E., Filla, M., Villar, M. T., Artigues, A., Mellot, A. J., Wang, J., Detamore, M. S., Hopkins, R. A., & Aljitawi, O. S. (2017). Decellularized Wharton's Jelly from human umbilical cord as a novel 3D scaffolding material for tissue engineering applications. *PLoS one*, *12*(2), e0172098.
  18. Jang, Y. Y., Collector, M. I., Baylin, S. B., Diehl, A. M., & Sharkis, S. J. (2004). Hematopoietic stem cells convert into liver cells within days without fusion. *Nature cell biology*, *6*(6), 532–539.
  19. Kim, K., Zhao, R., Doi, A., Ng, K., Unternaehrer, J., Cahan, P., Huo, H., Loh, Y. H., Aryee, M. J., Lensch, M. W., Li, H., Collins, J. J., Feinberg, A. P., & Daley, G. Q. (2011). Donor cell type can influence the epigenome and differentiation potential of human induced pluripotent stem cells. *Nature biotechnology*, *29*(12), 1117–1119.
  20. Kimura, T., Minamiguchi, H., Wang, J., Kaneko, H., Nakagawa, H., Fujii, H., & Sonoda, Y. (2004). Impaired stem cell function of CD34+ cells selected by two different immunomagnetic beads systems. *Leukemia*, *18*(3), 566–574.
  21. Kobayashi, H., Morikawa, T., Okinaga, A., Hamano, F., Hashidate-Yoshida, T., Watanuki, S., Hishikawa, D., Shindou, H., Arai, F., Kabe, Y., Suematsu, M., Shimizu, T., & Takubo, K. (2019). Environmental Optimization Enables Maintenance of Quiescent Hematopoietic Stem Cells Ex Vivo. *Cell reports*, *28*(1), 145–158.e9.
  22. Koide, S., Sigurdsson, V., Radulovic, V., Saito, K., Zheng, Z., Lang, S., Soneji, S., Iwama, A., & Miharada, K. (2021). CD244 expression represents functional decline of murine hematopoietic stem cells after *in vitro* culture. *iScience*, *25*(1), 103603.
  23. Lee, J. Y., & Hong, S. H. (2020). Hematopoietic Stem Cells and Their Roles in Tissue Regeneration. *International journal of stem cells*, *13*(1), 1–12.

24. Manz, M. G., Miyamoto, T., Akashi, K., & Weissman, I. L. (2002). Prospective isolation of human clonogenic common myeloid progenitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(18), 11872–11877.
25. Mayer, I. M., Hoelbl-Kovacic, A., Sexl, V., & Doma, E. (2022). Isolation, Maintenance and Expansion of Adult Hematopoietic Stem/Progenitor Cells and Leukemic Stem Cells. *Cancers*, 14(7), 1723.
26. Morrison, S. J., & Weissman, I. L. (1994). The long-term repopulating subset of hematopoietic stem cells is deterministic and isolatable by phenotype. *Immunity*, 1(8), 661–673. [https://doi.org/10.1016/1074-7613\(94\)90037-x](https://doi.org/10.1016/1074-7613(94)90037-x)
27. Müller, A. M., Huppertz, S., & Henschler, R. (2016). Hematopoietic Stem Cells in Regenerative Medicine: Astray or on the Path?. *Transfusion medicine and hemotherapy : offizielles Organ der Deutschen Gesellschaft für Transfusionsmedizin und Immunhamatologie*, 43(4), 247–254.
28. Ng, A. P., & Alexander, W. S. (2017). Haematopoietic stem cells: past, present and future. *Cell death discovery*, 3, 17002.
29. Oedekoven, C. A., Belmonte, M., Bode, D., Hamey, F. K., Shepherd, M. S., Che, J. L. C., Boyd, G., McDonald, C., Belluschi, S., Diamanti, E., Bastos, H. P., Bridge, K. S., Göttgens, B., Laurenti, E., & Kent, D. G. (2021). Hematopoietic stem cells retain functional potential and molecular identity in hibernation cultures. *Stem cell reports*, 16(6), 1614–1628.
30. Panch, S. R., Szymanski, J., Savani, B. N., & Stroncek, D. F. (2017). Sources of Hematopoietic Stem and Progenitor Cells and Methods to Optimize Yields for Clinical Cell Therapy. *Biology of blood and marrow transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation*, 23(8), 1241–1249.
31. Pernes, G., Flynn, M. C., Lancaster, G. I., & Murphy, A. J. (2019). Fat for fuel: lipid metabolism in haematopoiesis. *Clinical & translational immunology*, 8(12), e1098.

32. Poliwoda, S., Noor, N., Downs, E., Schaaf, A., Cantwell, A., Ganti, L., Kaye, A. D., Mosel, L. I., Carroll, C. B., Viswanath, O., & Urits, I. (2022). Stem cells: a comprehensive review of origins and emerging clinical roles in medical practice. *Orthopedic reviews*, *14*(3), 37498.
33. Pulsipher, M. A., Chitphakdithai, P., Logan, B. R., Navarro, W. H., Levine, J. E., Miller, J. P., Shaw, B. E., O'Donnell, P. V., Majhail, N. S., & Confer, D. L. (2014). Lower risk for serious adverse events and no increased risk for cancer after PBSC vs BM donation. *Blood*, *123*(23), 3655–3663.
34. Raic, A., Naolou, T., Mohra, A., Chatterjee, C., & Lee-Thedieck, C. (2019). 3D models of the bone marrow in health and disease: yesterday, today and tomorrow. *MRS communications*, *9*(1), 37–52
35. Robinson, S. N., Ng, J., Niu, T., Yang, H., McMannis, J. D., Karandish, S., Kaur, I., Fu, P., Del Angel, M., Messinger, R., Flagge, F., de Lima, M., Decker, W., Xing, D., Champlin, R., & Shpall, E. J. (2006). Superior ex vivo cord blood expansion following co-culture with bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Bone marrow transplantation*, *37*(4), 359–366.
36. Rödling, L., Schwedhelm, I., Kraus, S., Bieback, K., Hansmann, J., & Lee-Thedieck, C. (2017). 3D models of the hematopoietic stem cell niche under steady-state and active conditions. *Scientific reports*, *7*(1), 4625.
37. Rossi, L., Challen, G. A., Sirin, O., Lin, K. K., & Goodell, M. A. (2011). Hematopoietic stem cell characterization and isolation. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, *750*, 47–59.
38. Scharenberg, C. W., Harkey, M. A., & Torok-Storb, B. (2002). The ABCG2 transporter is an efficient Hoechst 33342 efflux pump and is preferentially expressed by immature human hematopoietic progenitors. *Blood*, *99*(2), 507–512.
39. Schönberger, S., Niehues, T., Meisel, R., Bernbeck, B., Laws, H. J., Kögler, G., Enzmann, J., Wernet, P., Göbel, U., & Dilloo, D. (2004). Transplantation of haematopoietic stem cells derived from cord blood, bone marrow or peripheral

- blood: a single centre matched-pair analysis in a heterogeneous risk population. *Klinische Padiatrie*, 216(6), 356–363.
40. Seita, J., & Weissman, I. L. (2010). Hematopoietic stem cell: self-renewal versus differentiation. *Wiley interdisciplinary reviews. Systems biology and medicine*, 2(6), 640–653.
41. Sigurjonsson, O. E., Perreault, M. C., Egeland, T., & Glover, J. C. (2005). Adult human hematopoietic stem cells produce neurons efficiently in the regenerating chicken embryo spinal cord. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(14), 5227–5232.
42. Storms, R. W., Trujillo, A. P., Springer, J. B., Shah, L., Colvin, O. M., Ludeman, S. M., & Smith, C. (1999). Isolation of primitive human hematopoietic progenitors on the basis of aldehyde dehydrogenase activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(16), 9118–9123.
43. Taplitz, R. A., Kennedy, E. B., Bow, E. J., Crews, J., Gleason, C., Hawley, D. K., Langston, A. A., Nastoupil, L. J., Rajotte, M., Rolston, K. V., Strasfeld, L., & Flowers, C. R. (2018). Antimicrobial Prophylaxis for Adult Patients with Cancer-Related Immunosuppression: ASCO and IDSA Clinical Practice Guideline Update. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 36(30), 3043–3054.
44. Thomas, E. D., Lochte, H. L., Jr, Lu, W. C., & Ferrebee, J. W. (1959). Intravenous infusion of bone marrow in patients receiving radiation and chemotherapy. *The New England journal of medicine*, 257(11), 491–496.
45. Thordardottir, S., Hangalapura, B. N., Hutten, T., Cossu, M., Spanholtz, J., Schaap, N., Radstake, T. R., van der Voort, R., & Dolstra, H. (2014). The aryl hydrocarbon receptor antagonist StemRegenin 1 promotes human plasmacytoid and myeloid dendritic cell development from CD34+ hematopoietic progenitor cells. *Stem cells and development*, 23(9), 955–967.

46. Valamehr, B., Abujarour, R., Robinson, M., Le, T., Robbins, D., Shoemaker, D., & Flynn, P. (2012). A novel platform to enable the high-throughput derivation and characterization of feeder-free human iPSCs. *Scientific reports*, 2, 213.
47. van Galen, P., Kreso, A., Mbong, N., Kent, D. G., Fitzmaurice, T., Chambers, J. E., Xie, S., Laurenti, E., Hermans, K., Eppert, K., Marciniak, S. J., Goodall, J. C., Green, A. R., Wouters, B. G., Wienholds, E., & Dick, J. E. (2014). The unfolded protein response governs integrity of the haematopoietic stem-cell pool during stress. *Nature*, 510(7504), 268–272.
48. Winkler, I. G., Barbier, V., Wadley, R., Zannettino, A. C., Williams, S., & Lévesque, J. P. (2010). Positioning of bone marrow hematopoietic and stromal cells relative to blood flow *in vivo*: serially reconstituting hematopoietic stem cells reside in distinct nonperfused niches. *Blood*, 116(3), 375–385.
49. Xu, Y., Chen, C., Hellwarth, P. B., & Bao, X. (2019). Biomaterials for stem cell engineering and biomanufacturing. *Bioactive materials*, 4, 366–379.
50. Yang, L., Bryder, D., Adolfsson, J., Nygren, J., Månsson, R., Sigvardsson, M., & Jacobsen, S. E. (2005). Identification of Lin(-)Sca1(+)kit(+)CD34(+)Flt3-short-term hematopoietic stem cells capable of rapidly reconstituting and rescuing myeloablated transplant recipients. *Blood*, 105(7), 2717–2723.
51. Zakrzewski, W., Dobrzyński, M., Szymonowicz, M., & Rybak, Z. (2019). Stem cells: past, present, and future. *Stem cell research & therapy*, 10(1), 68.
52. Zhang, C. C., Kaba, M., Iizuka, S., Huynh, H., & Lodish, H. F. (2008). Angiopoietin-like 5 and IGFBP2 stimulate ex vivo expansion of human cord blood hematopoietic stem cells as assayed by NOD/SCID transplantation. *Blood*, 111(7), 3415–3423.
53. Ziegler, B. L., Valtieri, M., Porada, G. A., De Maria, R., Müller, R., Masella, B., Gabbianelli, M., Casella, I., Pelosi, E., Bock, T., Zanjani, E. D., & Peschle, C. (1999). KDR receptor: a key marker defining hematopoietic stem cells. *Science (New York, N.Y.)*, 285(5433), 1553–1558.
54. Expansion of primitive human hematopoietic progenitors in a perfusion bioreactor system with IL-3, IL-6, and stem cell factor. / M.R.Koller,

- J.G.Bender, W.M.Miller, E.T.// Biotechnology (N Y).- 1993.- V.11(3).- P.358-363.
- 55.Effect of antithymocytic globulin on colony-forming ability of bone marrow in hypoplasia of myelopoiesis
- 56.N. A. Torubarova, N. A. Krasina, E. B. Vladimirskaya & M. A. Soldatova  
Bulletin of Experimental Biology and Medicine volume 91, pages526–528  
(1981)
- 57.Sutherland H, Eaves C, Eaves A. Characterization and partial purification of human marrow cells capable of initiating long-term hematopoiesis *in vitro* // Blood.- 1989. –V.74.-P.1563-1569.
- 58.Growth of human umbilical cord blood in long-term haemopoietic cultures / J.M Hows, B.A.Bradley, J.C.W.Marsh et al. // Lancet. –1992.- V. 340.- P.73-78.
- 59.Umbilical cord blood hematopoietic stem and repopulating cells in human clinical transplantation /H.E.Broxmeyer, J.Kurtzberg ., N.Gluckman e.a // Blood Cells.- 1991.- V.17. – P. 313-329.
- 60.Human umbilical cord blood as a potential source of transplantable hematopoietic stem/progenitor cells / H.E.Broxmeyer, G.W.Gordon, G.Hangos et al. // Proc. Natl. Acad. Sci USA.-1989.- V.86.- P.3828-3837.
- 61.Abraham N., Levere R., Lutton J. Eclectic Mechanisms of Heme Regulation of hematopoiesis // Int. J. Cell Cloning. - 1991. - V.9. - P. 185-210.
- 62.Dexter T.M. Stromal cell associated haemopoiesis // J. Cellular Physiology (suppl.). -1982.- N 1.- P. 87-94.
- 63.Characterization of a bipotent erythro-megakaryocytic progenitor in human bone.. marrow / N.Debili, L.Coulombel, L.Croisille et al. // Blood - 1996. - V. 88, N 4. -. P.1284-1296.
- 64.Ex vivo expansion of CD34+ umbilical cord blood cells in a defined serum-free medium (QBSF-60) with early effect cytokines. / L.Qiu, R.Meagher, S.Welhausen e.a. // J.Hematother Stem Cell Res.- 1999.- P.609-618.