

Міністерство освіти і науки України
Національний університет «Києво-Могилянська академія»
Факультет природничих наук
Кафедра лабораторної діагностики біологічних систем

Магістерська робота

на тему «**ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНЕ МОДЕЛЮВАННЯ ГЕМОПОЕЗУ
*IN VITRO***»

Виконав: студент 2-го року навчання
Галузь знань: 09 Біологія
Спеціальність: 091 Біологія
Освітньо-наукова програма:
Лабораторна діагностика біологічних систем
Порхало Денис Федорович

Керівник
Білько Д.І.,
кандидат біологічних наук, доцент НаУКМА

Рецензент

Кваліфікаційну роботу захищено
з оцінкою _____

Секретар ЕК
Пахаренко М. В.
« ____ » червня 20__ року

Київ – 2021

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ.....	4
ВСТУП.....	5
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....	7
1.1 Сучасні уявлення про кровотворення	7
1.2. Гемопоетичні стовбурові клітини та їх найближчі нащадки.	8
1.3 Ієрархія гемопоетичних стовбурових клітин.....	10
1.4 Регуляція кровотворення	13
1.4.1 Гемопоетичні цитокіни і фактори росту.....	13
1.4.2 Роль кровотворного мікрооточення в регуляції кровотворення.....	17
1.5 Моделювання кровотворення.....	21
1.6. Розвиток методів культивування гемопоетичних клітин у дифузійних камерах, імплантованих в організм тварини.....	25
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ.....	31
2.1. Отримання фідерного шару з клітин кісткового мозку дорослої миші лінії СВА.....	31
2.2. Отримання фідерного шару із фетальної кісткової тканини.....	32
2.3. Підготовка гемопоетичних клітин для культивування у дифузійних камерах у присутності стромальних фідерних шарів...	33
2.4. Клоногенний аналіз гемопоетичних клітин-попередників у напіврідкому агарі <i>in vitro</i>	34
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ.....	38
3.1. Дослідження здатності стромальних фідерних шарів до підтримки кровотворення у довготривалій культурі <i>in vitro</i> ..	38

3.2. Оцінка колонієутворюючої активності гранулоцитарно-макрофагальних клітин-попередників, культивованих у дифузійних камерах на різних фідерах <i>in vitro</i>	45
ОБГОВОРЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕНЬ.....	54
ВИСНОВКИ.....	56
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	57

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

ГСК – гемопоетичні стовбурові клітини

КП – клітини-попередники

МЕП – мегакаріоцит-еритроїдні попередники

МПК – мультипотентні клітини

МКМ – мікрооточення кісткового мозку

МСК – мезенхімальні стромальні клітини

КМ – кістковий мозок

PBS - розчин фосфатного буфера

ГМ-КСФ (GM-CSF) - колонієстимулюючий фактор гранулоцитарно – макрофагальний

КЛУО - кластер утворюючі одиниці

КСФ - колонієстимулюючий фактор

КУО-ГМ - колонієутворююча одиниця гранулоцитарно-макрофагальна

ФФТ – фідер з фетальної кістки

ФДТ – фідер з кістки дорослої миші

ВСТУП

Сучасний напрям досліджень кровотворних клітин спрямований на пошук і розробку методів *ex vivo* експансії гемопоетичних стовбурових клітин (ГСК) і клітин-попередників (КП). Здійснюється тестування культуральних систем, складів живильного середовища, різних комбінацій біологічно активних речовин, які вносяться у середовище, різних культуральних матриксів. Незважаючи на результати, отримані в лабораторіях при культивуванні ГСК та їх похідних з метою експансії, вважати, що оптимальна технологія для клінічних цілей знайдена ще рано.

Тому дослідження, пов'язані з вибором шляхів накопичення гемопоетичних стовбурових клітин і клітин-попередників гемопоетичних клітин-попередників є сьогодні актуальними і доцільними.

Відомо, що проліферація і диференціювання кровотворних клітин піддається складним механізмам регуляції. Ця регуляція опосередковується, головним чином, стромальними клітинами кровотворних органів, що створюють мікрооточення для розвитку кровотворних клітин, причому на кожному етапі формування кровотворної системи, в процесі онтогенезу, кровотворне мікрооточення має свої особливості .

Важливим напрямом у дослідженнях дії строми є використання фідерних шарів для гемопоетичних та інших клітин у спробі повторити мікросередовище, що існує *in vivo*. Інтенсивне вивчення питань регуляції кровотворення протягом останніх десятиріч привело до розробки різних експериментальних систем, що дозволяють досліджувати взаємодію між стромальними і кровотворними клітинами. Довготривала культура кісткового мозку, запропонована Декстером, на даний час використовується не лише для кісткового мозку, але і для інших кровотворних тканин. Показана здатність строми органів фетального гемопоезу до збереження і підтримки гемопоетичної активності клітин *ex vivo*.

Розвиток нових і вдосконалення існуючих моделей тривалого культивування ГСК і клітин-попередників є одним з найважливіших напрямів у сучасній клітинній біології. Отримання нових даних з цього питання буде внеском у вирішення проблем, пов'язаних з отриманням достатньої кількості кровотворної тканини для експериментального і клінічного застосування.

Робота має на меті визначення особливостей морфофункціонального стану гемопоетичних клітин мишей лінії СВА у гелевих дифузійних камерах, культивованих *in vitro* над шаром фідерних клітин з фетального і дорослого кісткового мозку мишей лінії СВА

Відповідно до мети були поставлені такі завдання:

1. Отримати культуру гемопоетичних клітин-попередників кісткового мозку мишей лінії СВА в оригінальній системі гелевих дифузійних камер у культурі над фідерним шаром з клітин фетального і дорослого кісткового мозку
2. Вивчити колонієутворюючу здатність гемопоетичних клітин-попередників кісткового мозку мишей лінії СВА у дифузійних камерах *in vitro*
3. Оцінити морфологічний склад культивованих клітинних агрегатів
4. Оцінити зв'язок між гемопоетичними і стромальними клітинами в оригінальній системі *in vitro*.

Об'єкт дослідження: процес формування колоній гемопоетичними клітинами-попередниками мишей лінії СВА у культурі *in vitro* над шаром фідерних клітин

Предмет дослідження: морфофункціональні властивості гемопоетичних клітин, культивованих у дифузійних камерах *in vitro*.

Роботу було виконано на базі кафедри лабораторної діагностики біологічних систем НаУКМА.

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Сучасні уявлення про кровотворення

Гемопоез – процес утворення клітинних компонентів крові, який має загальні закономірності для всіх хребетних, проте залишаються деякі відмінності. Гемопоез відбувається під час ембріонального розвитку та протягом усього дорослого віку [1]. Проте із часом він уповільнюється.

Локалізація кровотворення змінюються протягом життя. На початку внутрішньоутробного періоду він починається в жовтковому мішку та аорто-гонадо-мезонефросі, з часом переходячи в печінку, селезінку і нарешті в кістковий мозок та лімфатичні вузли. Він зберігається в цих кінцевих локаціях протягом усього дорослого життя за винятком патологічних випадків.

Кровотворення в кістковому мозку відбувається в острівцях кровотворної тканини, що оточені судинними пазухами та перемежується з трабекулярною кісткою. Кровотворна тканина містить спектр клітин крові, адипоцитів, ендотеліальних клітин та адвентиційних клітин.

По мірі розвитку і дозрівання клітин крові вони надходять у кровообіг через венозні пазухи. Специфічні клітини, які переважають у кожній ділянці кісткового мозку, значною мірою залежать від сигнальних клітин у цьому місці, до яких включено також зрілі гемопоетичні стовбурові клітини, остеобласти, макрофаги, стромальні клітини, ендотеліальні клітини та адипоцити. Розташування кровотворення для певних клітин може бути пов'язане з їх функцією. Наприклад, мегакаріоцити, які є дуже великими та об'ємними, утворюються безпосередньо біля кістково-мозкових пазух, через які відшнуровують тромбоцити [2].

1.2. Гемопоетичні стовбурові клітини та їх найближчі нащадки

Гемопоетичні стовбурові клітини (ГСК) – це клітини, які мають здатність до самовідновлення та регенерації всіх типів клітин, що входять до системи кровотворення. Трансплантація ГСК формує основу консолідаційної терапії при лікуванні раку і використовується для лікування або покращення при гематологічних та генетичних розладах. ГСК легко піддаються генетичній модифікації *ex vivo* і дають можливість отримати стійку експресію трансгенів в циркулюючих клітинах периферичної крові протягом усього життя акцептора [3].

Активність ГСК у кістковому мозку дорослого ссавця зосереджена у популяції клітин, що характеризуються:

- Експресією рецептора тирозинкінази c-Kit (рецептор фактора стовбурових клітин, stem cell factor - SCF). Фосфорилування білка тирозину є основним біохімічним механізмом, за допомогою якого передаються та інтерпретуються позаклітинні сигнали. Внутрішньоклітинна тирозинкіназа є центральним компонентом механізму, за допомогою якого гемопоетичні стовбурові клітини отримують позаклітинні сигнали та інтерпретують їх, щоб направляти диференціювання у визначеному напрямку [4]. SCF, який, у свою чергу, у поєднанні з гранулоцитарним колонієстимулюючим фактором посилює мобілізацію клітин-попередників периферичної крові [5].

- Експресією антигену-1 стовбурових клітин. Цей антиген відповідає як за клітинну адгезію, так і за проліферацію Т-клітин, регулюючи кількість клітин, що утворюються [6].

- Низьким рівнем поверхневого антигену.

А також вони володіють низьким рівнем експресії багатьох поверхневих антигенів, виявлених у диференційованих клітинах, що належать до різних ліній [7]. Окремі види ссавців мають певні відмінності в молекулярних

маркерах ГСК, проте основні моменти, що дозволяють клітинам виконувати однакові функції, зберігаються завдяки гомологам.

Регенеративний потенціал усіх стовбурових клітин базується на їх здатності генерувати зрілі типи ефекторних клітин за допомогою процесів диференціювання. У системі кровотворення ГСК розташовуються на вершині гемопоетичної ієрархії і породжують функціональні ефекторні клітини принаймні дев'яти різних типів. Через дуже короткий термін життя більшість ефекторних клітин виробляють зріле потомство на постійній основі (у дорослої людини). Така висока продуктивність вимагає глибоких гомеостатичних механізмів контролю, первинний рівень яких знаходиться у ГСК.

Наступний етап розвитку ГСК – прогеніторні клітини. Такі клітини зберігають можливість до диференціювання, проте через збільшену кількість конкретних біологічних маркерів ця здатність є обмеженою.

Прогеніторні клітини у процесі ембріогенезу створюють пул клітин дорослого організму, що потім може поступово замінити клітини, що зазнають знищення.

У серії дослідів було виявлено, що кістковий мозок містить високопроліферативні клітини, здатні давати початок окремим колоніям мієлоїдних, еритроїдних та мегакаріоцитарних клітин в селезінці опроміненого господаря (Till, 1961). Також ці клітини є попередниками лімфоцитів. Кожна колонієутворююча клітина, може продукувати власні клони [8]. Далі буде зазначено, як саме ця здатність впливає на можливість визначення впливу зовнішніх факторів у експерименті.

Безпосередні нащадки ГСК - це мультипотентні клітини-попередники, які зберігають повний потенціал лінії, але мають обмежену здатність до самовідновлення. Із часом популяція ГСК виснажується, незважаючи на те що частина дочірніх клітин повторює властивості материнських. Це трапляється через мутації, що з'являються у кожному новому пулі кровотворних клітин [9].

Мультипотентні клітини, в свою чергу, породжують олігопотентні, які мають більш обмежений потенціал розвитку. Це представляє точку розгалуження в гемопоетичній ієрархії, що дає початок зрілим лімфоїдним ефекторним клітинам, включаючи В, Т, дендритні клітини та природні кілери (NK), але не маючи потенціалу утворювати еритроїдні та гранулоцитарні клітини та мієлоїдні попередники. При цьому клітини здатні утворювати зрілі мієлоїдні і еритроїдні клітин, але їм не вистачає здатності утворювати лімфоїдне потомство.

Такі олігопотентні попередники, в свою чергу, дають початок більш обмеженим попередникам, з яких зрештою виникають усі зрілі клітини крові. Хоча залишаються питання щодо абсолютного лінійного потенціалу різних гемопоетичних попередників та їх взаємозв'язку, існує широкий консенсус щодо того, що послідовне диференціювання ГСК через попередників до повністю диференційованих клітин крові є, в першу чергу, незворотним процесом в нормальних фізіологічних стаціонарних умовах [10].

1.3. Ієрархія гемопоетичних стовбурових клітин

Для перманентної регенерації кровотворної системи необхідно постійно генерувати потрібну кількість певних типів клітин у потрібний час і у правильному місці. Щоб досягти цього, ГСК постійно повинні обирати правильний шлях: зберігати кількість, поширюватись, самовідновлюватись чи диференціюватись.

Точний час та послідовний порядок усіх виборів у кожній клітині лежать в основі нормального кровотворення як у стаціонарному стані, так і при травмах та хворобах [11]. Молекулярні паттерни, що лежать в основі вибору шляху ГСК, повинні дати змогу клітинам реагувати на зміни зовнішніх подразників, але також дозволяти конкретним клітинним станам бути стабільними незалежно від їх середовища. Отже, експресія, активність або

змінна функцій молекул, що контролюють шляхи, повинні бути чітко визначеними, специфічними для типу клітини та контролюватися іншими факторами.

У класичній моделі диференціювання ГСК можна розділити на дві субпопуляції відповідно до їх експресії CD34: CD34⁻ довготривалі (ДТ) та CD34⁺ короткотривалі (КТ). ДТ-ГСК є рідшою популяцією клітин, які знаходяться у стані спокою у кістковому мозку і мають повну довгострокову здатність до відновлення, тоді як КТ-ГСК мають лише короткочасну здатність до відновлення. ДТ-ГСК диференціюються на КТ-ГСК, а згодом КТ-ГСК диференціюються на мультипотентні клітини (МПК), які не мають здатності до самовідновлення.

Перше відгалуження відбувається між загальними мієлоїдними попередниками КМП з мієлоїдним, еритроїдним та мегакаріоцитарним потенціалом) та звичайними лімфоїдними попередниками (КЛП, лише з лімфоїдним потенціалом), які походять від МПК. Друга точка відгалуження у КМП розділяє біпотентні гранулоцитарно-макрофагальні (ГМП) та мегакаріоцит-еритроїдні попередники (МЕП). КЛП далі формують Т, В, НК і дендритні клітини, тоді як ГМП диференціюються на гранулоцити/моноцити, а МЕП - генерують мегакаріоцити/еритроцити. Всі ці популяції утворюють деревоподібну і збалансовану модель ієрархії, в рамках якої ключові фактори транскрипції і цитокіни точно проводять поетапне диференціювання ГСК до зрілих клітин крові [12].

Групи МПК також поділяються на популяції МПК1, МПК2, МПК3 та МПК4 відповідно до їх імунного фенотипу, стану клітинного циклу, упередженості лінії, стійкості до медикаментозного лікування та насиченості у кістковому мозку. МПК1 більше схожі на ГСК, які мають здатність до відновлення багатолінійності, тоді як МПК2 позбавлені потенціалу самовідновлення і демонструють лише здатність до відновлення мієлоїдних

клітин-попередників. МПК2 і МПК3, які виробляють мало Т і В-клітин, а МПК4 генерують низький рівень мієлоїдних клітин *in vivo*.

Крім того, у порівнянні з МПК3 та МПК4, МПК2 утворюють більше тромбоцитів. У сукупності, МПК2 – це підгрупа МПК схильна до утворення мегакаріоцитів, а МПК3 - МПК з мієлоїдним ухилом. І МПК2, і МПК3 функціонально відрізняються від лімфоїдних МПК4. ГСК незалежно генерують усі три типи МПК, але серед них жоден не здатний генерувати інші МПК *in vivo*. Після трансплантації ГСК спочатку виробляють мієлоїдні МПК (МПК1/2) для швидкого встановлення мієлоїдного виходу, а потім субпопуляцію МПК4 для відновлення лімфоїдного відділу. Отже, МПК – це гетерогенна популяція з різним потенціалом, схильна до лінійного походження як на клітинному, так і на молекулярному рівнях [12].

Гемопоез, як правило, аналізують у гетерогенних популяціях та в окремі моменти процесу. Однак цей аналіз дозволяє зробити лише обмежені висновки щодо залученої послідовності окремих молекулярних та клітинних подій. Експериментальні дані зазвичай можна пояснити безліччю гіпотез, що призводять до неоднозначних висновків. Тільки тоді, коли поведінка та доля кожної окремо взятої клітини та її нащадків будуть постійно відомі, можна скласти всебічне розуміння етапів розвитку та їх молекулярного контролю.

Симетричні самовідновлювальні групи ДТ-ГСК швидко виникають у внутрішньоутробному розвитку, щоб забезпечити належне формування крові та імунної системи. Однак, дорослі ДТ-ГСК часто знаходяться у спокійному стані. Здатність цих клітин до самооновлення підтримується завдяки складному регулюванню безлічі шляхів, включаючи сигнальні шляхи Notch та Wnt, фактори транскрипції Нох та регулятори клітинного циклу INK4A, INK4C, p21, p27 та PTEN. ДТ-ГСК. Вони ідентифікуються через відсутність маркерів на клітинній поверхні та наявність cKit, Sca1 (ЛСК) та CD150.

МПК мають здатність диференціюватися в еритроїдний чи мегакаріоцитарний похідні через мегакаріоцитні / еритроїдні попередники

(MEP), які виявляють низькі та середні рівні CD105 та CD34 та низькі рівні CD41. Також вони диференціюються в лімфоїдну або мієлоїдну похідні через ЛМПК, які характеризується високим рівнем Flt3. Хоча MEP обмежені лініями мегакаріоцитарних або еритроїдних попередників, ЛМПК мають потенціал для ліній В, Т, НК, моноцитів та гранулоцитів. Антагоністична діяльність факторів транскрипції GATA-1 та PU.1 фактично відокремлює MEP від ліній ЛМП, причому GATA-1 спрямовує розвиток у MEP і PU.1, що сприяє розвитку ЛМП.

Експресія та передача сигналів через рецептор тирозинкінази Flt3 у ЛМП сприяє диференціюванню у лінії В або Т. ЛМПК генерує лімфоїдні лінії або через ранній Т-клітинний попередник (РТП), або через загальний лімфоїдний попередник (КЛП), або через обидва. Від Lin-ScalowskitlowFlt3highIL7Rhigh КЛП В-клітини проходять впорядкований шлях, починаючи з позитивного лімфоїдного попередника LuβD, позитивного B6 (BLP), потім до клітин B220intCD43high до-pro-B, клітин B220highCD19high pro-B і, нарешті, в CD25 позитивні пре-В-клітини. Багато з цих ранніх ліній визначаються на основі перебудови генів антигенних рецепторів IgH, IgK та IgL. Перестановка D-J фрагментів гена IgH була виявлена ще на стадії КЛП. Після експресії CD19 на етапі pro-B клітин, V-DJ перебудова IgH завершується. Після експресії рецептора пре-В клітини зазнають проліферації та диференціювання до CD25-позитивної стадії пре-В-клітини, після чого ініціюється перебудова легкого ланцюга BCR [13].

1.4. Регуляція кровотворення

Усі шляхи розвитку гемопоетичних клітин неможливі без молекул, що індукують диференціювання та клонування клітин. Фактори росту та цитокіни критично важливі для гемопоезу та підтримання балансу формених

елементів крові, так як саме вони провокують розвиток прогеніторних клітин, а також вчасну їх редукцію.

1.4.1 Гемопоетичні цитокіни і фактори росту.

Цитокіни є білками, які регулюють багато аспектів кровотворення - імунні реакції, зокрема запалення. Функції багатьох цитокінів та їх рецепторів були підтверджені та розширені за допомогою досліджень генетично модифікованих мишей. Більшість цитокінів зв'язуються безпосередньо з рецепторами на ГСК і регулюють такі їх функції як спокій, самовідновлення, диференціювання, апоптоз та рухливість [14]. Вивчення цитокінів ГСК сприяє розробці нових стратегій клітинної та генної терапії на основі стовбурових клітин.

Цитокіни та інтерлейкіни, такі як SCF, GM-CSF, G-CSF, TGF-beta, IL-6, IL-7, IL-8, IL-11, виробляються ендотеліальними клітинами. Серед цих цитокінів та інтерлейкінів SCF, GM-CSF, IL-6, IL-1 та IL-11 є стимуляторами кровотворення. Тимозин-бета4, є невеликим молекулярним інгібітором кровотворення. Він може бути відповідальним за інгібуючий ефект F-ВМЕС-СМ на гемопоетичні клітини [15]. Тобто, цитокіни, які виробляються клітинами ніші кісткового мозку, можуть бути як позитивними, так і негативними.

Різноманітність цитокінів передбачає жорсткий контроль гемопоезу. Жодна гемопоетична лінія не контролюється виключно одним регулятором. Поєднання цитокінів може мати синергетичний ефект на гемопоетичні клітини як кількісно, так і розширюючи клітинну відповідь. Спільна дія гемопоетичних цитокінів може створювати механізми досягнення більшої ефективності клітинної продукції при генеруванні формених елементів крові. Поєднання дії факторів у кожен окремий момент кровотворення також створює інші поля для маневрування. Наприклад деякі цитокіни є

домінуючими в межах певної лінії, проте не можуть бути обмежені впливом на єдину лінію гемопоетичних клітин [16].

На базовому структурному рівні більшість цитокинових рецепторів складаються з мультисубодиничного комплексу: специфічної лігандзв'язуючої субодиниці та передаючої сигнал субодиниці, яка може бути структурно подібною між членами надсімейства рецепторів цитокинів. Середній позаклітинний домен містить приблизно 210 амінокислот і один або кілька консервативних залишків цистеїну. Друга кінцева послідовність триптофан – серин – X – триптофан – серин (W-S-X-W-S), де X означає будь-який неконсервованій амінокислотний залишок, присутній на C-кінці. Структурно ця область також складається з двох модулів фібронектину III типу [17, 18].

Рецептори цитокинів (IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-7, GM-CSF та LIF. IL-6R та GCSFR) також мають характеристики сімейства рецепторів гемопоетичного фактору росту (HGFR) Сімейство HGFR включає білки, які не зв'язують ліганд безпосередньо, але модифікують рецепторну функцію. Рецептори виявляють певну гомологію у своїх позаклітинних доменах, але дуже мало в цитозольних доменах. Функціонально, кожен з цих рецепторів пов'язує лише один ліганд, і більшість із є як рецепторами високої, так і низької спорідненості, хоча принципи подвійної спорідненості різняться між рецепторами [19,20].

Для фізіологічного функціонування стовбурових клітин важливу роль грають фактори росту (класичний приклад – SCF – stem cell factor – фактор стовбурових клітин, про який було зазначено вище). Для гемопоетичних клітин існує власний фактор.

Фактори росту гемопоетичних клітин – HGF – це група кислих глікопротеїнів, які зв'язуються зі специфічними рецепторами клітинної поверхні та діють як на ендокринну, так і на паракринну складові, впливаючи на ріст і розвиток GSC та їх нащадків.

Їх синтез регулюється фізіологічною потребою у типі клітин крові, утворення яких вони провокують. GSC зв'язується з окремими членами сімейства рецепторів цитокінів типу I з високою пікомолярною спорідненістю. Ця подія викликає зміни у конформації рецепторів, які передають біохімічні сигнали для виживання клітин, проліферації, диференціювання та/або активації [21]. Дія GSC була досліджена на тваринних моделях, зокрема мишиних [22, 23] та навіть риб-данію (zebrafish) [24].

Кожен GSC має специфічний рецептор або рецептори, які експресуються на низьких рівнях, як правило, в діапазоні 10²–10³ рецепторів на клітину. Зв'язування лігандів спричиняє автофосфорилування та димеризацію рецепторних ланцюгів з наступним каскадом сигнальних подій, опосередкованих, в основному, цитоплазматичними ферментами, що зв'язуються з фосфорильованими залишками тирозину в цитоплазматичних доменах рецептора.

Ланцюги цитокінових рецепторів не містять тирозинкінази, але вони здатні зв'язувати та активувати молекули сімейства тирозинкіназ сімейства JAK. Активація цих кіназ призводить до активації сімейства факторів транскрипції, відомих як STATs, шлях c-myc та шлях ras-MAP-кінази. Останній шлях також стимулюється зв'язуванням shc безпосередньо з активованим рецептором з подальшою активацією ras [25].

Через необхідність синтезу різних типів клітин крові, GSC також поділяються на різні групи: фактори, що стимулюють ріст гранулоцитів (Granulocyte Colony-Stimulating Factor (G-CSF)), гранулоцит-макрофаг стимулюючий фактор (Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor (GM-CSF)), еритропоетин, опрелвекін [26]. Кожна з груп має стимулювати диференціювання HSC у формені елементи, яких наразі не вистачає для балансу складу крові.

Рішення про долю клітини передбачають вибір між альтернативними програмами експресії генів, що виконуються транскрипційними та

епігенетичними регуляторами. Фактори транскрипції пов'язують мотиви специфічної послідовності в межах промотору, енхансеру та сайленсеру. Специфічна експресія типу клітини досягається за допомогою комбінаторних взаємодій транскрипційних факторів, які утворюють ключові будівельні блоки ширших регуляторних мереж. Комплекси транскрипційних факторів залучають епігенетичні регулятори для модуляції статусу активації локусу гена, який може передаватися наступним поколінням [27].

1.4.2 Роль кровотворного мікрооточення в регуляції кровотворення.

Мікрооточення кісткового мозку (МКМ) - це динамічна клітинна система, що підтримує кровотворення. Вона складається з декількох різних типів клітин, а також цитокінів та білків матриксу, які мають важливе значення для проліферації та диференціювання ГСК. У мікрооточенні локалізуються ГСК, а також негемопоетичні клітини. Їх допоміжні функції необхідні для підтримання нормального гемопоезу, а також інколи є причиною розвитку аномального гемопоезу [28]. МКМ включає в себе ендотеліальні клітини, фібробласти, а також клітини, що беруть участь у гомеостазі кісток (хондрокласти, остеокласти та остеобласти). Також є неклітинна частина мікросередовища, що складається з білків позаклітинного матриксу, включаючи фібронектин, ламінін, колаген, остеопонтин, протеоглікани та глікозаміноглікани. Ніші кісткового мозку – це утворення, що складаються зі стромальних клітин, що сприяють спокою, підтримці, розширенню та виживанню ГСК, а також забезпечують їх міграцію[29].

Тобто ніша – це підсистема кісткового мозку, у якій підтримуються умови для повноцінного функціонування кровотворної системи. Велику роль у роботі самих ніш грають мезенхімальні стромальні клітини (МСК). МСК – це клітини, що здатні до самовідновлення та генерування усіх мезенхімальних

клітини в скелетному елементі, включаючи остеобласти, хондроцити, адипоцити та фібробласти. Однією з найважливіших функцій МСК у ніші є секреція розчинних факторів, включаючи CXCL12 – фактор що регулює адгезію, міграцію та імплантацію ГСК, та фактор стовбурових клітин. Ці фактори сприяють підтримці прогеніторних клітин. МСК також беруть участь у пренатальному розвитку ніші ГСК [30]. МСК пригнічують проліферацію Т-лімфоцитів *in vitro*, індуковану мітогенами та алоантигенами, виділяючи розчинний фактор, такий як індолеамін 2,3-діоксигеназа та PGE2 [31].

Мезенхімальні стовбурові клітини генерують сигнали для диференціювання та проліферації ГСК через безпосередній контакт клітина-клітина. Ці клітини також виділяють цитокіни та фактори, призначені для росту ГСК [32]. Також було показано, що МСК діють як живильний шар, що підтримує ГСК в недиференційованому стані. Неконтрольоване диференціювання ГСК збільшує процес старіння та загибелі клітин, але прямий контакт між стовбуровими клітинами та мікрооточенням представляє їх суттєву роль у кровотворенні як інгібітора диференціювання. Мезенхімальні стовбурові клітини продукують різноманітні цитокіни та фактори, що впливають на кровотворення: 45,46 IL-6, Flt3-L (FL), SCF, G-CSF, M-CSF, GM-CSF, TPO, CXCL-12 (SDF1) та IL-11 [33].

У регуляції кровотворення беруть участь:

- Клітини лінії остеобластів. Вони продукують ряд цитокінів, причетних до регуляції ГСК, включаючи G-CSF, тромбопоетин та CXCL12.
- Ендотеліальні клітини. Експресують CXCL12, SCF та ангіопоетин, і підтримують проліферацію ГСК *in vitro* [34].
- Нестин. Білок цитоскелету, який впливає здатність до самовідновлення ГСК [35].

Для вивчення гемопоезу у культурі часто використовують аналог мікрооточення кісткового мозку – фідерні клітини. Фідерні клітини (ФК) утворюють фідерні шари, що потрібні для підтримки існування ГСК. Шари як

сукупність клітин формуються за рахунок високої адгезійної здатності ФК. Такі клітини не мають здатності до диференціювання та розмноження, проте залишаються біоактивними завдяки обробці (наприклад, біохімічної). ФК використовуються як субстрат для кондиціонування середовища, на якому вирощуються ГСК *in vitro*. Клітини фідерного (живильного) шару опромінюють, або обробляють іншим чином для того щоб вони не розмножувались [36].

Функція фідерних клітин полягає у забезпеченні кровотворної тканини у культурі сигналами та факторами для підтримки експансії культивованих клітин-мішеней, зберігаючи кількісні характеристики культури ГСК.

Цей факт робить необхідним підтримку живильних клітин у стані, в якому вони не розмножуються, але метаболічно активні, що дозволяє їм експресувати специфічні ліганди або цитокіни для підтримки селективного розростання культивованих клітин-мішеней [37].

Стромальні клітини людини, такі як дендритні клітини та В-клітини, можна культивувати *in vitro* у визначених оптимальних умовах. Деякі системи культивування *ex vivo* вимагають використання фідерних клітин для підтримки росту клітин-мішеней. Оскільки фідерні клітини повинні подавати один або декілька активних сигналів, важливо підтримувати їх у метаболічно активному стані, коли клітини зберігають здатність продукувати специфічні ліганди або цитокіни.

Експериментальні дані вказують на те, що фідерні шари підтримують ріст клітин-мішеней шляхом вивільнення факторів росту в культуральне середовище. Однак це не єдина дія, оскільки фідерні клітини також відіграють важливу роль в інших процесах, таких як детоксикація середовища або синтез білків позаклітинного матриксу, необхідних для контролю росту культивованих клітин та дії субстрату для прикріплення клітин [38]. Зазвичай у якості таких клітин використовують опромінені мишачі фібробласти [39] (у разі дослідження саме культур, отриманих від лабораторних тварин).

Набір факторів росту окремих фідерних клітин варіюється [40,41,42], зважаючи на те, що фідерні шари є не тільки у тканинах, які відповідальні за кровотворення. Проте є також спільні фактори, наприклад, фактор інгібування лейкемії (LIF), цитокін, що необхідний для підтримки проліферації та розвитку стовбурових клітин [43]. Зв'язування LIF зі специфічними рецепторами активує шляхи JAK-STAT, критичні для підтримки стовбурових клітин [44].

У культурі додавання факторів, що секретуються фідерними клітинами може бути достатнім, проте у деяких випадках потрібна саме структура фідерного шару для фізичної взаємодії між клітинами [45]. Такий контакт сприяє механотрансдукції та ефектам, які притаманні нішам кісткового мозку (про які зазначалось раніше у роботі). Фідерні клітини можуть синтезувати білки позаклітинного матриксу, який потрібен для утримання культивованих клітин у відносно жорсткій культурі культивованих клітин.

Плюрипотентні стовбурові клітини зазвичай найкраще ростуть, коли знаходяться в контакті з іншими клітинами або з позаклітинним матриксом і традиційно ростуть у культурах з фідерними шарами (наприклад, ембріональними фібробластами). Оброблені фідерні клітини з призупиненими клітинними циклами використовувались для підтримки ембріональних стовбурових, індукованих плюрипотентних стовбурових клітин у недиференційованому стані, не втрачаючи при цьому їх плюрипотентності [46].

Отже, мікрооточення стовбурових клітин є системою, що складається з декількох взаємопов'язаних ланок. Воно як *in vivo* так і *in vitro* регулює кровотворення через синтез цитокінів та факторів проліферації та росту клітин. Крім того, вони можуть слугувати опорним апаратом для ГСК *in vitro*.

1.5 Моделювання кровотворення

Найбільш розповсюджений метод моделювання – використання лабораторних тварин для пересадки культивованих суспензій клітин кісткового мозку (КМ).

Здатність імунної системи розрізняти власні та чужорідні агенти є головною перешкодою для успішної трансплантації органів і тканин, включаючи трансплантати КМ.

Трансплантація чужорідних тканин в імунологічно здорового господаря викликає імунну відповідь та відторгнення трансплантатів. Кістковий мозок має власні імунокомпетентні клітини, які негативно впливають також на реципієнта. Вирішенням проблеми відторгнення є променева або хіміотерапія, що пригнічує функціональну активність імунної системи трансплантату[47].

Моделі кровотворення «тварина-людина» відрізняються за способами введення трансплантату КМ, а також стадіями розвитку тварини, на яких він вводиться. Так культивований КМ може бути «вбудований» в організм дорослої тварини (наприклад, модель миша-людина) або до ембріону тварини (модель вівця-людина).

Популяція донорських ГСК зазвичай отримується з довгих кісток ізогенних мишей, переважно віком 4-6 тижнів. Інші, менш поширені джерела ГСК включають тазові кістки, селезінку та печінку.

Клітини кісткового мозку для трансплантації підготовлюють одразу після евтаназії тварини без втручання хімічних реагентів, які можуть змінити функціонування стовбурових клітин. Після виділення кісткового мозку з його клітин виготовляють суспензію, що деякий час культивується у камері із підвищеним вмістом вуглекислого газу. Культивовані суспензії за допомогою шприців вводять тварині [48].

Окремі культури вважаються двомірними моделями кровотворення, які також мають місце у дослідженні кровотворення. Вони повторюють кровотворну нішу *in vitro*. Така модель є простою у створенні, може частково

імітувати структуру кісткового мозку та включати у себе декілька варіантів клітин, що взаємодіють між собою у нормальних фізіологічних умовах.

Ізольовані клітини нагадують тканину, з якої походять. Первинна культура клітин є складною і вимагає специфічного догляду, включаючи зберігання, процедури заморожування або вибір ферментативної обробки, але головна проблема полягає в тому, як утримувати первинну культуру достатньо довго, щоб її можна було використовувати для експериментальних випробувань. Тому плюсом методу можна вважати також метод, завдяки якому клітини можуть рости необмежено довго через індуковану трансформацію (імморталізовані клітини) [49].

Стовбурові клітини крові людини повинні пройти ще декілька додаткових етапів, перш ніж можна буде культивувати їх *in vivo* у лабораторних тваринах.

Також є декілька варіантів того, як саме вони будуть імплантовані до організму миші.

1. Суспензія клітин культивується *in vitro*. У цей час частково проходять процеси диференціювання ГСК. Культивування проводиться в окремій камері, яку потім вже із культивованими ГСК та їх похідними імплантують до організму миші.

2. В організм миші спочатку занурюють камеру, яка стане середовищем для клітин, після чого вводять культивовану окремо суспензію ГСК.

3. Кровотворні клітини можуть бути введені через хвостову вену миші до того, як буде введена камера [50].

Для створення камер, які будуть використовуватись у трансплантації кісткового мозку, можуть використовуватись різні матеріали. Вони не повинні викликати у донора та трансплантатів імунної реакції при цьому створюючи сприятливе середовище для фізіологічного функціонування ГСК та їх похідних.

Причому, камери є не просто місцем розташування клітин. Механізми проліферації та диференціюванню ГСК є багатокомпонентними. Частини цього механізму управління утворюють функціональний блок – нішу ГСК. Гемопоез неможливий без регулюючого впливу доменів структури кісткового мозку. Мезенхімальна система визначена як основний регулюючий компонент ніш ГСК [51]. І кровотворення у кістковому мозку є продуктом взаємодії компонентів ніші. За час вивчення гемопоезу було створено декілька моделей, що імітують фізіологічний стан кровотворної тканини.

Одним з прикладів є поліакриламідні гідрогелеві скаффолди [52]. Через їх гнучкість та оптичну прозорість їх зручно використовувати для аналізу за допомогою конфокальної мікроскопії.

Крім того такі імпланти підходять для дослідження кровотворних та ендотеліальних клітин, так як останні долають гідрогелевий бар'єр. Обмеженням методу можна назвати те, що в них секреторна функція стромальних клітин підвищується (зокрема зсувається регуляція продукції цитокінів), а отже під час дослідження не можна говорити про суто фізіологічні умови розвитку та існування клітин.

Ще один тип скаффолдів, що створюють нішу – колагенові. Вони сприяють остеогенному диференціюванню мезенхімальних клітин, а також ремоделюванню матриксу із кальцифікацією колагену. Така тривимірна модель вирощування на основі колагену з використанням мезенхемальних клітин використовується для спільного вирощування з гемопоетичними прогеніторними стовбуровими клітинами [53].

Поряд з синтетичними моделями використовуються також камери природного походження. Це тканини, отримані з лабораторних тварин, що вичищаються від клітинної складової та культивуються у якості каркасу для виділених стовбурових клітин. Очищення від клітин починається з лізису за допомогою фізичних впливів. Це можуть бути повторювані цикли заморожування/відтавання із ретельним постійним контролем температурного

режиму. Неконтрольовані та різкі температурні зміни (особливо етап заморожування) можуть спровокувати утворення кристалів льоду у позаклітинному матриксі, що зруйнує структуру необхідну для створення камери. Для вилучення усього клітинного вмісту до фізичних методів додають також хімічні та ферментативні. Зазвичай застосовується хімічна обробка миючими засобами або підходи, засновані на ферментативній обробці (у тому числі комбінація з обробкою сольовим розчином). Додецилсульфат натрію використовується для завершення очищення, особливо у тканинах, де інші м'які миючі засоби неефективні. Проте використання додецилсульфату натрію пошкоджує судинну архітектуру тканини, його використання заважає подальшому ферментативному видаленню ДНК та РНК [54].

Для отримання структурованих камер, призначених для трансплантації культивованих клітин кісткового мозку зараз використовується тривимірний друк. Ця сучасна технологія дозволяє точно відтворити потрібну форму та розмір камери навіть якщо у якості матеріалу використовуються лабільні матеріали (наприклад, гідрогелі).

Ця технологія проте має власні обмеження. Наприклад, через недостатнє масштабування моделі та пристрою цей метод може бути складним для повторення мікроскопічних судинних структур чи доменів розташування ГСК.

Крім цього існують також математичні моделі кровотворення під час розвитку мієлоїдних лейкозів (Caroline Colijn, Michael C Mackey, 2005) та комп'ютерна візуалізація проліферації та диференціювання ГСК (Jason Xu et al., 2018). Такі моделі засновані на знаннях, отриманих з *in vitro* та *in vivo* моделей [54].

1.6. Розвиток методів культивування гемопоетичних клітин у дифузійних камерах імплантованих в організм тварини

Для розуміння шляхів розвитку створення та застосування імплантованих дифузійних камер необхідно дослідити історію їх створення та вдосконалення.

Традиційними вважаються камери з органічного скла (акрилової смоли). Їхнім недоліком є те, що вони не дозволяють вивчати динаміку проліферації клітин. Основне завдання експерименту полягає у довготривалому спостереженні, тобто підтримці життєздатності клітин-попередників яка підтримується у культурі.

Перший докладний опис дифузійної камери створений у середині ХХ століття – у 1954 році [55]. В експерименті були використані камери виготовлені з ефірів целюлози (Millipore Type HA (гідрозоль) та AA (аерозоль)). За стандартну товщину фільтрів (мембран) вважалась товщина у приблизно 150 мкм.

Крім цього методу спостереження *in vivo*, була також розроблена друга модифікація для внутрішньочеревної імплантації дифузійних камер із тканинами з подальшим гістологічним дослідженням. Для імплантації використовували фільтри типу HA Millipore стандартною товщиною 150 мкм або ж товщиною у 30 мкм та типу AA товщиною 30 мкм.

У деяких експериментах використовували прозору камеру у вигляді циліндра, одна поверхня і стінки якої були виготовлені з прозорого матеріалу (наприклад, оргскла), до якої потрібно було додати спеціальні фільтри товщиною 30 мкм. Пористі фільтри потрібні для того, щоб забезпечити імплантовані у камери клітини живильними речовинами. Після культивування камери очищали від сполучної тканини, що робило перегляд отриманого зразка через мікроскоп більш зручним.

У ранніх роботах добре описані основні задачі дифузійних камер для культивування імплантованих тканин всередині імунізованих тварин.

Головним є збереження життєздатності імплантату та мінімальне втручання клітин господаря у нього. Крім цього імплантат не повинен порушувати основні фізіологічні процеси тварини-господаря. Таким чином, зберігається ізоляція клітин у камері, через що можливе вивчення потреб живлення трансплантату та вплив на нього безпосередньо хімічними агентами (наприклад, ліками). Більш докладно застосування та імплантацію камер із клітинами крові було описано пізніше Venestad [64].

Роботи щодо застосування камер для вивчення гемопоетичних клітин та у цілому клітин крові здебільшого стосуються лейкемій. Проте схема створення, підтримки та імплантації клітин у камеру залишається незмінною. Суспензія клітин у поживному середовищі, плазмі або агарі вводиться в камеру через невеликий отвір у пластиковому кільці, який потім герметизується пластиковим корком чи запаюється. Заповнені клітинами камери імплантують у черевну порожнину тварини-господаря. Камери можуть періодично видалятися для стеження за розвитком клітин.

Раніше для кількісного вивчення гемопоетичних стовбурових клітин використовувались клітини селезінки. Отриману з тварин селезінку подрібнювали для створення суспензії, яку використовували потім у культурі. Як зазначено у подальшому Gordon [65] такий метод не є достатньо ефективним через те, що адгезія таких клітин є віддаленою від фізіологічної. Більш ефективними є використання пунктату кісткового мозку в агаровому субстраті із додаванням факторів росту *in vitro* (у культурі). Останній метод був використаний у тому числі і з моделюванням лейкемії людини за допомогою дифузійних камер. На відміну від суспензій, що використовувались раніше, агаровий субстрат дозволив вимірювати загальну здатність до диференціювання клітин, а не лише формування колоній (так, як це було з клітинами селезінки).

Удосконалений метод, проте, також має обмеження. Здебільшого це стосується передопераційної підготовки тварин або тварин, що на початку

відбираються для експерименту. Дифузійні камери з агаровим середовищем імпантуються у попередньо опромінених тварин, чи тварин, які генетично деімунізовані.

Якщо тварин-господарів обробляють циклофосфамідом, або опроміненням, у імпантованих камерах спостерігається підвищена кількість одиниць, які складаються з морфологічно сформованих клітин. Це свідчить про те, що у обробленого господаря виробляється гуморальні стимулюючі фактори [56].

Для сучасних дифузійних камер клітини поміщаються до агарових субстратів, які за основним складом та додатковими компонентами варіюються у залежності від потреб експерименту. Основа готується з 1,5% агару Васто та 10% стерильної фільтрованої води із додаванням джерел вуглецю.

Перебування клітин у дифузійних камерах, імпантованих у черевну порожнину тварин, наближають середовище до такого, який повторює нішу, відповідну для розвитку ГСК. Наближення середовища до того, у якому розвиваються ГСК, можливо завдяки частковому повторенню ніші, у якій вони розвиваються в природніх умовах в організмі людини Для цього у середовище можна додати тканину людини, яка буде фізіологічною у кожному окремому випадку. Наприклад, додаткові клітини кісткового мозку [57].

Середовище, у якому стовбурові клітини знаходяться в організмі людини, складається також з адипоцитів, остеокластів, мегакаріоцитів, Шваннівських та ендотеліальних клітин. Вони забезпечують наявність комунікації та сигнальних молекул, що сприяють виживанню та підтримці нормального функціонування ГСК. При моделюванні лейкемічних станів до імпантату додаються клітини, що ініціюють захворювання, злякисні плазматичні клітини Theocharides [66].

Розвиток дифузійних камер також супроводжувався розвитком гуманізованої моделі. У ранніх роботах безпосередньо термін «гуманізована

модель» не зустрічався, проте використання клітин людини без ризиків для життя лабораторних тварин було основною задачею їх створення.

Способом оцінки динаміки стовбурових клітин (у тому числі гемопоетичних) є спостереження за їх зростанням в ендogenous мікросередовищі, де вони отримували б відповідні сигнали. Таким середовищем може бути саме дифузійна камера. Виконати таку роботу в організмі людини неможливо, тому імплантаційна модель створює найбільш наближену до реальної картину кровотворення людини.

Гуманізована модель у мишах стосується нормальних, імунокомпетентних мишей, що експресують гени людини через трансгенез (наприклад, головний комплекс гістосумісності HLA, або трансгенних мишей імуноглобуліну людини), або до імунодефіцитних мишей, яким вводять гемопоетичні та лімфоїдні клітини або тканини людини [58].

Важливою для досліджень є наявність імунодефіцитної мишачої моделі із видаленням генів у основних молекулярних компартментах, що відповідають, наприклад, за Т-клітини, В-клітини, макрофаги, природні кілери (NK), цитокіни та фактори транскрипції [59]. Впровадження таких мутацій обмежує типи клітин, які в організмі миші впливали би на живучість клітин та тканин людини для кращого відтворення імунної відповіді людини. Також було виявлено, що клітини людини простіше виживають в організмі новонароджених мишей, ніж дорослих.

Однією з потенційних проблем ліній гуманізованих мишей є розвиток механізмів трансплантату спрямованих проти хазяїна. Ознаками такої активації у мишей можуть бути: згорблене положення тварини, випадіння шерсті, втрата ваги та рання смерть.

Відсутність Т-клітин у зразках стовбурових клітин людини є дуже важливою для уникнення активації механізмів трансплантату спрямованих проти господаря. На додаток до класичного відторгнення на основі Т-клітин, було описано розвиток гранулематозної хвороби на основі макрофагів.

Протилежна проблема полягає у відсутності сприйнятливості до певних інфекцій та відсутність імунної системи людини. Це заважає, наприклад, повноцінному вивченню патогенів, таких як ретровіруси [60].

Для того, щоб уникнути цих побічних ефектів, застосовують два підходи. Тварину наділяють додатковими тканинами людини, взятими з плода людини, або створюють можливості для синтезу цитокінів людини у гуманізованих мишей. У першому варіанті мишам хірургічно трансплантують тимус та печінку плода людини, що дозволяє розвивати лейкоцити людини. Для цієї моделі критично важливим є походження кісткового мозку, тимусу та печінки від одного плода. Крім цього такий метод може вважатись неетичним у більшості країн, тому його застосування іноді неможливе.

Другий підхід – створення трансгенної миші, організм якої може синтезувати цитокіни людини і, як наслідок, адекватно взаємодіяти з імплантатом. Таку модель можна створити завдяки векторній інженерії безпосередньо перед переносом камери із трансплантатом. Завдяки втручанням саме у геном мишей, є можливість виведення спеціальних ліній, призначених саме для роботи з імплантатами людини.

Показано, що нейтрофільна, еозинофільна та мегакаріоцитна колонієутворюючі одиниці, отримані з кісткового мозку, можуть бути вилучені з дифузійних камер. У роботі також зазначено, що утворення нейтрофільних (але не еозинофільних) колоній помітно посилюється в культурах із згустками фібрину, імплантованих опроміненим мишам (порівняно з неопроміненими мишами).

Гуманізовані моделі із застосуванням дифузійних камер мають декілька переваг над культивуванням клітин *in vitro*. Підтримка життєдіяльності трансплантату забезпечується організмом господаря, що у поєднанні з генетичною модифікацією тварини дозволяє спостерігати динаміку проліферації та диференціювання клітин у культурі протягом тривалого проміжку часу.

Крім цього, клітини-попередники кісткового мозку утворюють клони, які можна вилучити з камер і досліджувати їх клітинний склад. Через спостереження динаміки поділу клітин можна робити висновки про взаємодію культури ГСК із, наприклад, лікарськими препаратами [61].

Клітини-попередники, поміщені у дифузійну камеру, потребують на невелику кількість поживних речовин у середовищі завдяки взаємодії із середовищем хазяїна.

РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

2.1 Отримання фідерного шару з клітин кісткового мозку дорослої миші лінії СВА

Мишу лінії СВА забивали дислокацією шийних хребців, занурювали у 9% перекис водню на 1 хвилину, звідти переносили тушку у 70 % етанол на 2 хвилини і транспортували у стерильні умови ламінарного боксу, де стерильними ножицями розрізали шкіру, видаляли м'язові тканини і вивільняли стегнову кістку, обов'язково зберігаючи колінний і стегновий суглоби. Іншими стерильними ножицями відрізали ці суглоби і вводили голку з шприцем, наповненим середовищем, у кістковомозковий канал. Промивали кістку кілька разів голками, діаметр яких зменшувався. Клітинну суспензію пропускали через стерильний нейлоновий фільтр для вилучення агрегатів. Життєздатність клітин визначали за забарвленням трипановим-синім. Кількість клітин рахували у камері Горяєва.

Клітинну суспензію, отриману з стегнової кістки миші, змішували з культуральним середовищем наступного складу: DMEM, 10% FCS, 1% L-глутаміну (220 mM/мл) (Sigma-Aldrich, США), 25 Од/мл канаміцину, з розрахунку 1×10^6 клітин в 1 мл і переносили у пластикові культуральні планшети об'ємом 25 см² фірми Nunc (Данія). Культивування проводили в CO₂-інкубаторі – 5% CO₂ при 37°C і абсолютній вологості. Експлантація на першому етапі всієї отриманої клітинної суспензії дозволяє клітинам, які здатні проявляти адгезивні властивості, прикріплюватися до поверхні пластика. Через добу вилучали супернатант з неадгезованими клітинами і заміняли на свіже середовище такого ж складу. Таким чином отримували фідер з кістки дорослої миші (ФКМ). Потім середовище міняли кожні 72 години шляхом

зміни половини супернатанту свіжим середовищем до моменту формування первинного моношару на 7-й-10-й день.

Наступним етапом проводили субкультивування клітин. Для цього клітини знімали з поверхні культуральної посудини за допомогою розчину 0,25% Trypsin-EDTA (Sigma-Aldrich), відмивали центрифугуванням 10 хвилин при 650 g (1000 об/хв.), після видалення супернатанту додавали 12 мл середовища і ретельно перемішували. Потім клітини заморожували в культуральному середовищі під захистом кріопротектора диметилсульфоксиду (ДМСО) в кінцевій концентрації 5% і зберігали в рідкому азоті (-196° C).

У вказаний день клітини розморожували на водяній бані (+40° C) за 7-10 днів до проведення основного експерименту, додавали культуральне середовище вищевказаного складу і переносили в шестилункові пластикові планшети Nunc в концентрації 1×10^5 клітин на лунку. При досягненні моношару клітини обробляли Мітоміцином-С (Sigma-Aldrich, США) в концентрації 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ впродовж 2 годин при 37°С і 5% CO₂, як описано Ronchio L., таким чином, зупиняючи процеси клітинного поділу. Потім моношар 5 разів відмивали розчином PBS, додавали культуральне середовище і використовували як фідерний шар (Дьяконов, 2000). Час від моменту отримання матеріалу до завершення приготування клітинної суспензії не перевищував 4-х годин. Всі маніпуляції з клітинами проводили при кімнатній температурі.

2.2 Отримання фідерного шару із фетальної кісткової тканини

Для отримання фідера з фетальних тканин (ФФК) ембріон миші 14-18 днів гестації переносили в одноразову чашку Петрі діаметром 90 мм, заповнену розчином Хенкса з антибіотиком; за допомогою пінцета, скальпеля і очних ножиць кісткову тканину звільняли від м'язової тканини і промивали

її в 3-х змінах розчину з антибіотиком. Отримання клітинної суспензії з фетальної кісткової тканини здійснювали в два етапи. На першому етапі тканину розділяли механічним способом – дробленням за допомогою скальпеля і очних ножиць. На другому етапі проводили ферментативну обробку шляхом інкубації протягом 15 хвилин при температурі 37°C в розчині 0,25% Trypsin-EDTA. Для отримання гомогенної суспензії клітин фетальної кістки, після ферментативної обробки, необхідна фільтрація тканини через нейлоновий фільтр для видалення крупних фрагментів, що залишилися. Отримані клітинні суспензії пропускали через нейлоновий фільтр з подальшим пасажем через ін'єкційні голки діаметру, що зменшується, потім двічі відмивали в розчині PBS. На наступних етапах підготовка фідерних шарів з вилучених фетальних клітин не відрізнялася від приготування фідерного шару з клітин дорослої миші.

2.3 Підготовка гемопоетичних клітин для культивування у дифузійних камерах у присутності стромальних фідерних шарів

Гемопоетичні клітини, вилучені з стегнової кістки дорослої миші і клітини з фетальної кістки культивували в порожнині дифузійної камери за методом Д.І. Білько [61]. Дифузійна камера, що використовується в роботі, виготовлена з пористого інертного гідрогеля і представляє блок діаметром 1 см, внутрішньою порожниною об'ємом 0,2 мл і висотою 0,5 см.

Такі камери отримали назву «амфікультуральні капсули», *не треба* *коми* завдяки своїй можливості забезпечувати підтримку життєдіяльності клітин, що знаходяться в порожнині камери; їх використовують при культивуванні в системі як *in vitro*, так і *in vivo*.

Заздалегідь камери стерилізували в 45% етанолі, потім відмивали у фізіологічному розчині (PBS) впродовж 24 годин при кімнатній температурі.

Досліджувані суспензії клітин розводили культуральним середовищем (DMEM + 15% FCS + 1% L-глутамін + 25 Од/мл канаміцин) до концентрації 5×10^5 /мл. Клітинні суспензії, за допомогою туберкулінового шприца, вводили в порожнину гелевої дифузійної камери в об'ємі 0,2 мл на 1 камеру. Потім дифузійні камери переносили в шестилункові пластикові матраци Nunc із задалегідь приготованими фідерними шарами, з розрахунку 1 камера на 1 лунку.

Для контролю дії фідерних шарів, камеру з досліджуваними клітинами культивували за відсутності фідерного шару (без фідера). Кожну культуральну лунку заповнювали середовищем, в об'ємі 8 мл так, щоб дифузійна камера була повністю зануреною. Культуральне середовище міняли кожні 72 години шляхом заміни половини супернатанту свіжим середовищем. Культивування проводили в CO₂ - інкубаторі (Joan, Франція) при 5% CO₂, 37°C і абсолютній вологості, протягом 5 тижнів.

У процесі культивування, на 2-му, 3-му і 5-му тижнях змішували вміст шести дифузійних камер, оцінювали зміни в середніх кількостях ядровмісних клітин і проводили клоногенний аналіз з підрахунком колонієутворюючих одиниць (КУО-ГМ) у напіврідкому агаровому середовищі. Отримані значення порівнювали з такими для вихідної суспензії, позначеної як МНК 0 день.

2.4. Клоногенний аналіз гемопоетичних клітин-попередників у напіврідкому агарі *in vitro*

Для оцінки клоногенної активності клітин після різних методів виділення, а також на етапах культивування, використовували клоногенний аналіз із визначенням гранулоцитарно-макрофагальних колонієутворюючих одиниць (КУО-ГМ) за методом Pluznik D.H., Sachs L. і Pike B.L., Robinson W.A., у модифікації, з використанням одношарового агарового середовища [21].

Для стимуляції колонієутворення використовували колонієстимулюючий фактор GM-CSF (Sigma-Aldrich, USA) в концентрації 10 нг/мл.

Для визначення клоногенної активності гемопоетичних клітин в даний час часто використовують метод агарових культур, який дозволяє дати оцінку наявності комітованих клітин-попередників, що відповідають за негайне гемопоетичне відновлення. Даний метод застосовний як для оцінки якості трансплантату гемопоетичної тканини в разі подальшого клінічного використання, так і для оцінки збереження функціональної повноцінності кровотворних клітин в експериментальних системах. При цьому клональний ріст забезпечується іммобілізацією суспензії клітин у напіврідкому середовищі – агарі і включенням у живильне середовище стимулятора. Суть методу культивування у м'якому агарі полягає в тому, що при експлантації суспензії кровотворних клітин у строго визначених умовах, у присутності колонієстимулюючих чинників (КСФ), в агарі, протягом 10-14 днів, зростають колонії-клони, кількість яких дозволяє визначити вміст клітин-попередників гранулоцитарно-макрофагального ряду (КУО-ГМ).

У нашій роботі вихідними компонентами для клоногенного культивування були: живильне середовище DMEM, замінні амінокислоти (50×) (Sigma-Aldrich, USA) і незамінні амінокислоти (100×), вітаміни (100×), піруват натрію (2,2 %), фетальна теляча сироватка (FCS) – виробник Sigma-Aldrich, США; L-глутамін (200 мМ/л), Нерес-буфер (1 М/л) (Serva, Німеччина) і бактоагар (Difco, Німеччина). З них готували робочі комплекси №1 і №2.

<u>Живильне середовище № 1:</u>	
середовище DMEM	500,0 мл
розчин бікарбонату натрію (7,5 %)	5,6 мл
піруват натрію (2,2 %)	6,25 мл
вітаміни (MEM) (100×)	2,50 мл

замінні амінокислоти (MEM) (50×)	5,0 мл
незамінні амінокислоти (MEM) (100×)	2,50 мл

Приготовлене середовище зберігалось при +4°C не більше місяця. Безпосередньо перед роботою, в день досліду готували середовище № 2

<u>Живильне середовище № 2:</u>	
Середовище № 1	84,0 мл
FCS	15,0 мл
L-глутамін	1,0 мл

Для підтримки рН = 7,2-7,4 додавали Нерес-буфер у кількості 2,5 мл на 100 мл середовища.

Антибіотик канаміцин додавали у середовище у концентрації 25 Од/мл.

Склад № 2 використовували для приготування живильного шару. Розчин бактоагару в концентрації 3,3% готували на тридистильованій воді і стерилізували кип'ятінням на водяній бані протягом 30-40 хв.

Безпосередньо перед експлантацією клітин змішували 9 частин нагрітого до 40°C повного живильного середовища №2 з 1 частиною 3,3% розчину бактоагару, ретельно перемішували і витримували при 40°C на водяній бані.

Досліджувану суспензію клітин розливали у пеніцилінові флакони в об'ємі 1 мл із вмістом ядерних клітин $4,0 \times 10^5$ /мл, додавали 3 мл приготованого агарового середовища, перемішували за допомогою шприца і розливали по 1 мл на чашку Петрі (Nunc), діаметром 35,0 мм. Таким чином, концентрація клітин складала $1,0 \times 10^5$ клітин на чашку. GM-CSF в концентрації 10 нг/мл вносили перед додаванням агарового середовища до клітинної суспензії. Всі маніпуляції виконувалися із строгим дотриманням правил асептики, в стерильній камері з ламінарним потоком повітря (Jouan, Франція).

Культивування проводили в CO₂-інкубаторі при температурі 37°C, в умовах 100% вологості з 5% CO₂ протягом 14 днів.

На 14-у добу камери демонтували, її вміст переносили на предметне скельце і підраховували кількість колоній і кластерів. За колонію приймали агрегати, які містили 40 клітин і більше. Розрізняли колонії трьох типів: I порядку – компактні, II порядку – компактні з вінчиком і III порядку – дифузні.

Агрегати, в яких нараховувалося від 3 до 20 клітин вважали малими кластерами, а більші за 20 клітин і менші за 40 клітин рахували як великі кластери.

Визначали проліферативний потенціал ПП, як співвідношення колоній до кластерів.

Статистична обробка результатів дослідження.

Цифрові дані аналізували з використанням програмного забезпечення Microsoft Excel 2003 і Statgal. Достовірність відмінностей середніх значень двох сукупностей визначали за допомогою t-критерію Стьюдента. Дані представлено як середнє ± стандартне відхилення

РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Розробка довгострокових моделей культури гемопоетичних стовбурових клітин (ГСК) є одним із важливих завдань сучасних біотехнологій. Було припущено, що наявність стромы є важливою для гемопоезу *in vitro* та *in vivo*, але залишається питання: чи достатньо факторів, що виробляються стромальними клітинами та транспортуються шляхом дифузії, для регенерації примітивних і зрілих гемопоетичних клітин, або прямий контакт клітина-клітина необхідний для культивованого на стромальній основі клітинного матеріалу.

В ході сучасних досліджень виявлено вплив різних фідерних шарів та їх кондиціонованих середовищ на проліферативну, диференціювальну та клоногенну активність клітин кровотворення, отриманих з кісткового мозку мишей. Клітинні екстракти для фідерних шарів отримували з ембріонів миші віком 4-6 тижнів. Також були визначені ефекти кондиціонованого середовища. Оцінку морфологічних властивостей культивованих суспензійних культур проводили в субкультурних експериментах із використанням умов напівтвердої агарової культури. Уніпотентні клітини-попередники CFU-GM спостерігали та аналізували.

3.1. Дослідження здатності стромальних фідерних шарів до підтримки кровотворення у довготривалій культурі *in vitro*.

Використання стромального фідерного шару дозволяє відтворити в культурі необхідну для гемопоезу комбінацію розчинних цитокінів і факторів росту. Відомо, що, незважаючи на морфологічну схожість клітин, що належать до категорії фібробластоподібних, вони не однорідні за походженням і функціональними властивостями.

Фібробластоподібні клітини відрізняються за здатністю підтримувати кровотворення *in vitro*. У літературі є дані про залежність цієї здатності від органної приналежності фібробластів, а також від гестаційного віку тієї або іншої тканини – джерела стромальних клітин.

Ми вивчали здатність двох стромальних фідерних шарів підтримувати довготривалий гемопоез в культурі дифузійних камер *in vitro*. Один з них був отриманий з фетальних тканин ембріона миші (рис.3.1), другий - з кісткового мозку дорослої миші (рис.3.2).

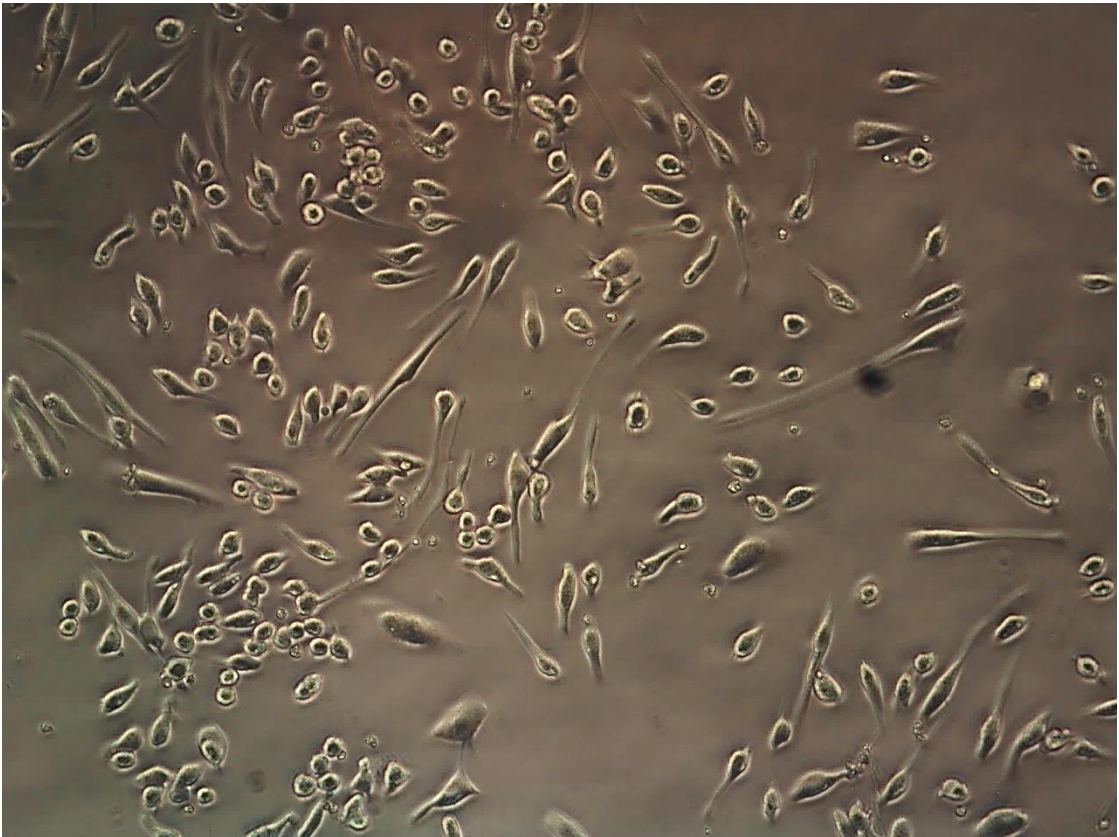


Рис.3.1. Фідерний шар з ФКМ. Інвертований мікроскоп.х200

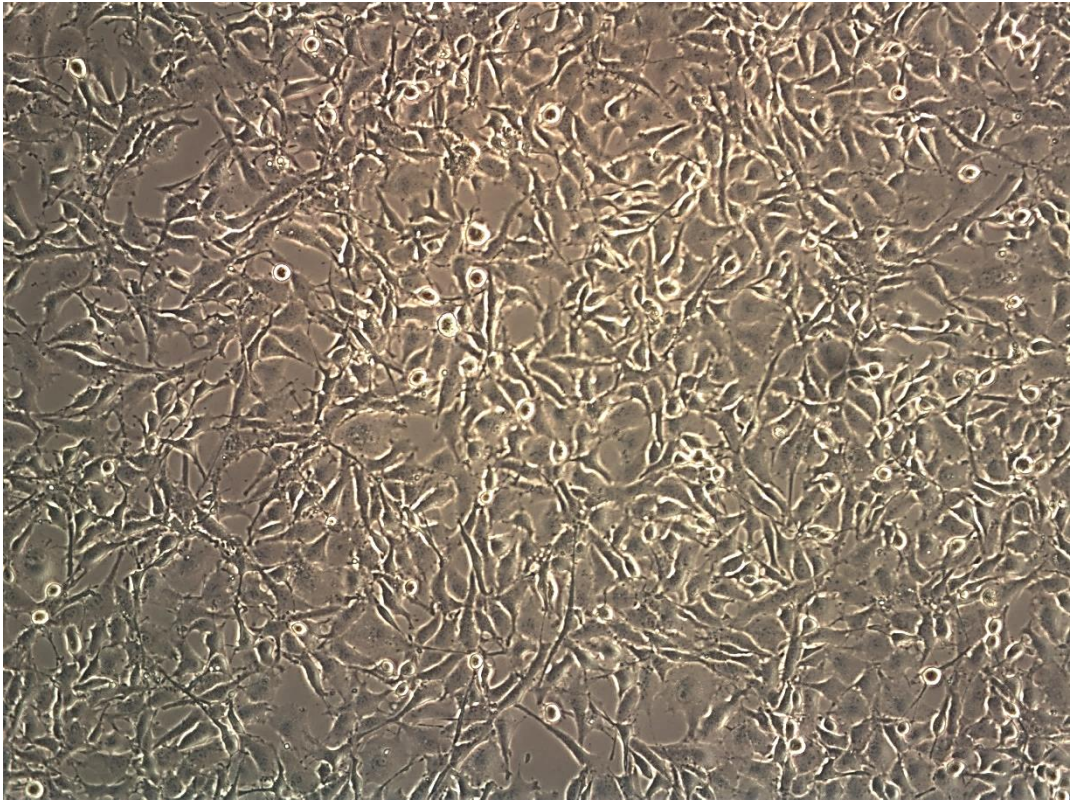


Рис.3.2. Фідерний шар з ФФК. Інвертований мікроскоп.х200

Гемопоетичні клітини, виділені з стегнової кістки дорослої миші культивували у дифузійних камерах на фідерних шарах (ФКМ), отриманих з кістки дорослої тварини. У контрольному варіанті клітини культивували у порожнині дифузійної камери за відсутності фідерного шару. На кожному етапі експерименту, на 2-му, 3-му і 5-му тижнях, оцінювали зміни в середніх кількостях ядровмісних клітин у дифузійних камерах і визначали їх клоногенну активність у м'якому агарі. Кількості ядровмісних клітин і гемопоетичних попередників (КУО-ГМ), отримані на кожному етапі культивування, порівнювали між собою, а також з даними значеннями для вихідної суспензії.

У зразках клітин, що культивуються в дифузійних камерах за відсутності фідерного шару (без фідера), кількість ядровмісних клітин вже на другому тижні стрімко падала, знижуючись з $1,0 \times 10^5$ до $0,2 \pm 0,05 \times 10^5$, тобто в 5 разів ($p < 0,01$). Далі відбувалося згасання гемопоезу.

Разом з тим у присутності фідерного шару ФФК протягом першого тижня визначалося падіння клітинності культури удвічі, а на другому тижні

культивування клітин у дифузійних камерах відбувалося збільшення вмісту ядровмісних клітин $(2,8 \pm 0,65) \times 10^5$, відносно їх вихідної концентрації при експлантації в дифузійну камеру – $(1,0 \times 10^5)$ ($p < 0,01$).

Продовження терміну культивування гемопоетичних клітин в дифузійних камерах до 3 тижнів на фідері ФФК приводило до збільшення їх чисельності до $4,5 \pm 0,80 \times 10^5$ ($p < 0,05$). На 5-й тиждень кількість ядровмісних клітин в дифузійних камерах знижувалася до $2,6 \pm 0,85$ ($p < 0,05$), що було порівнювано з величиною даного показника на 2-му тижні.

Культивування гемопоетичних клітин у гелевих дифузійних камерах на фідері з стромальних клітин кісткового мозку дорослих мишей (ФКМ) протягом тижня свідчило про падіння кількості ядровмісних клітин у 2 рази і становило як і при культивуванні на фідері ФФТ $(0,5 \pm 0,2) \times 10^5$, але було вищим, ніж при культивуванні без фідеру. Цей феномен свідчить про те, що, незважаючи на різні регуляторні фактори, які виділяються клітинами стромы у середовище, в обох випадках в перший тиждень клітини проходять адаптацію.

Проте вже на 2-й тиждень ситуація міняється. Кількість культивованих клітин починала стрімко зростати і на 14-й день дорівнювала $(2,0 \pm 0,35) \times 10^5$. На третій тиждень кількість клітин продовжувала збільшуватись, досягаючи кількості ядровмісних клітин $3,8 \pm 0,3 \times 10^5$, що майже вдвічі перевищувала дані першого тижня, але була нижчою за результати культивування гемопоетичних клітин над шаром фетальних клітин ($p < 0,05$). До 5-го тижня кількість ядровмісних клітин в дифузійних камерах знижувалася до $2,0 \pm 0,42$ ($p < 0,05$), що було порівнювано з величиною даного показника на 2-му тижні.

Таким чином, максимальна кількість ядровмісних клітин при культивуванні гемопоетичних клітин у дифузійних камерах під впливом факторів росту і регуляторних молекул, що продукуються фібробластоподібними клітинами стромы органів фетального і дорослого гемопоезу, відмічено на 3-му тижні культивування. Культура була

представлена проліферуючими гранулоцитарними і еритроїдними клітинами. Кількість макрофагів і зруйнованих клітин була незначною (рис.3.3, рис.3.4).

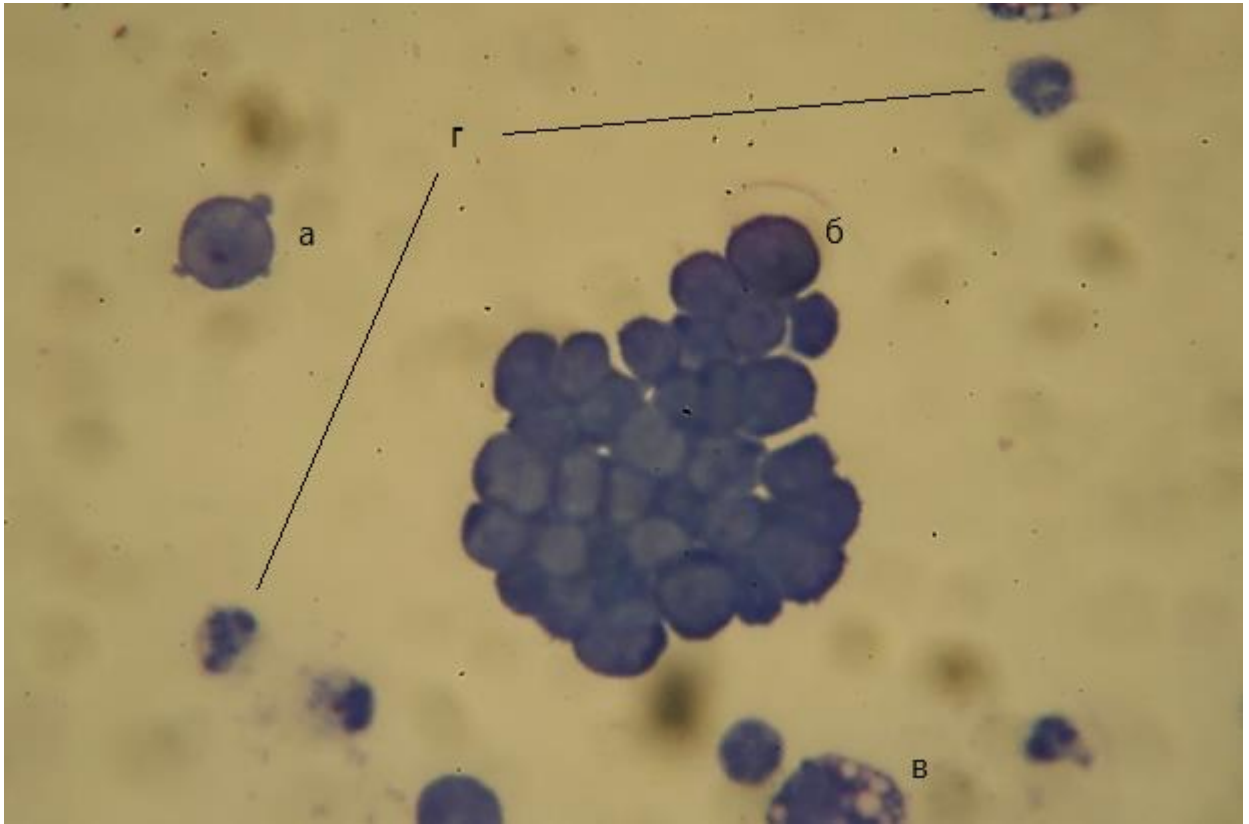


Рис.3.3. Вміст компактної колонії над фідером з кістки дорослої миші. а) проеритробласт; б) мієлобласт; в) макрофаг; г) сегментоядерний нейтрофіл
Світловий мікроскоп.х1000. Зabarвлення за Папенгеймом

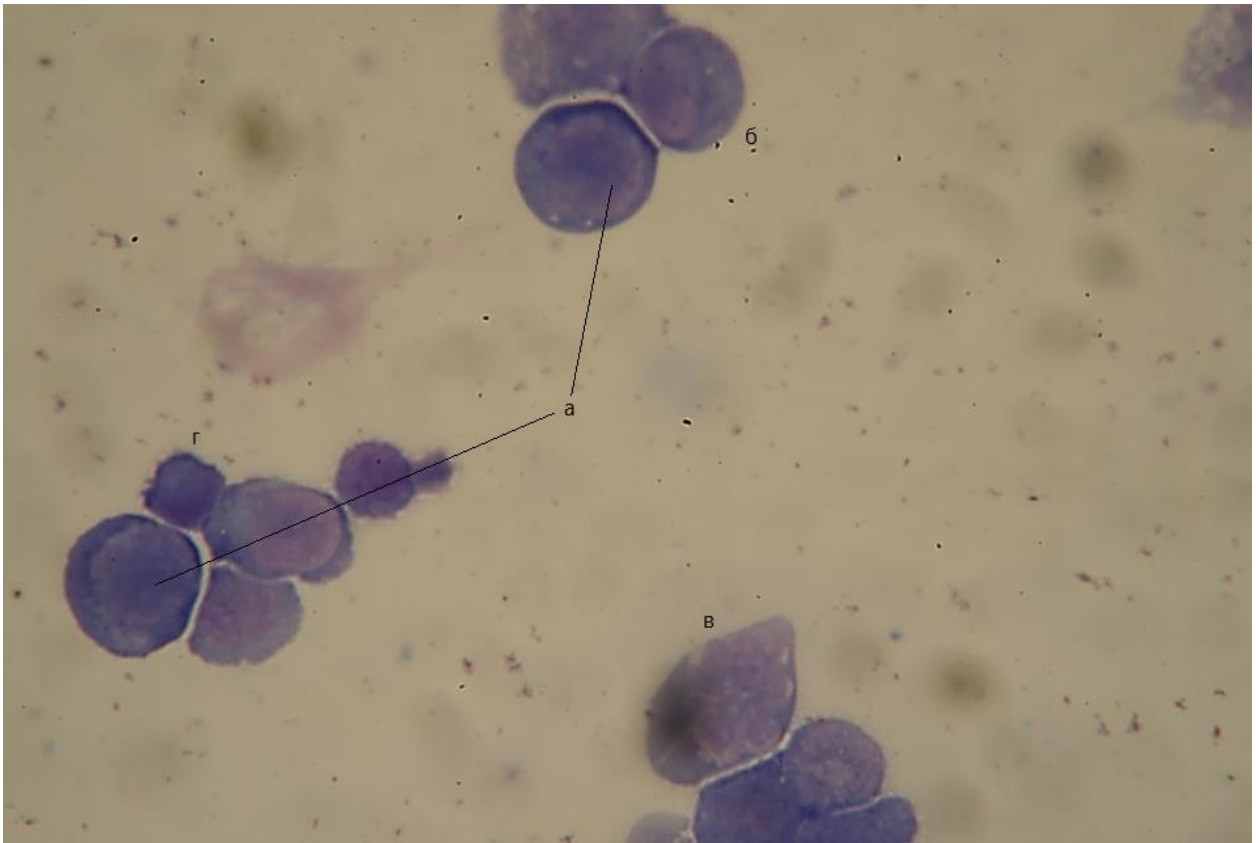


Рис.3.4. Угрупування бластних клітин на 3-й тиждень культивування у дифузійних камерах над фідером з фетальних клітин. а) проеритробласт б) мієлобласт в) зруйнована клітина г) базофільний еритробласт. Світловий мікроскоп.х1000 Забарвлення за Папенгеймом

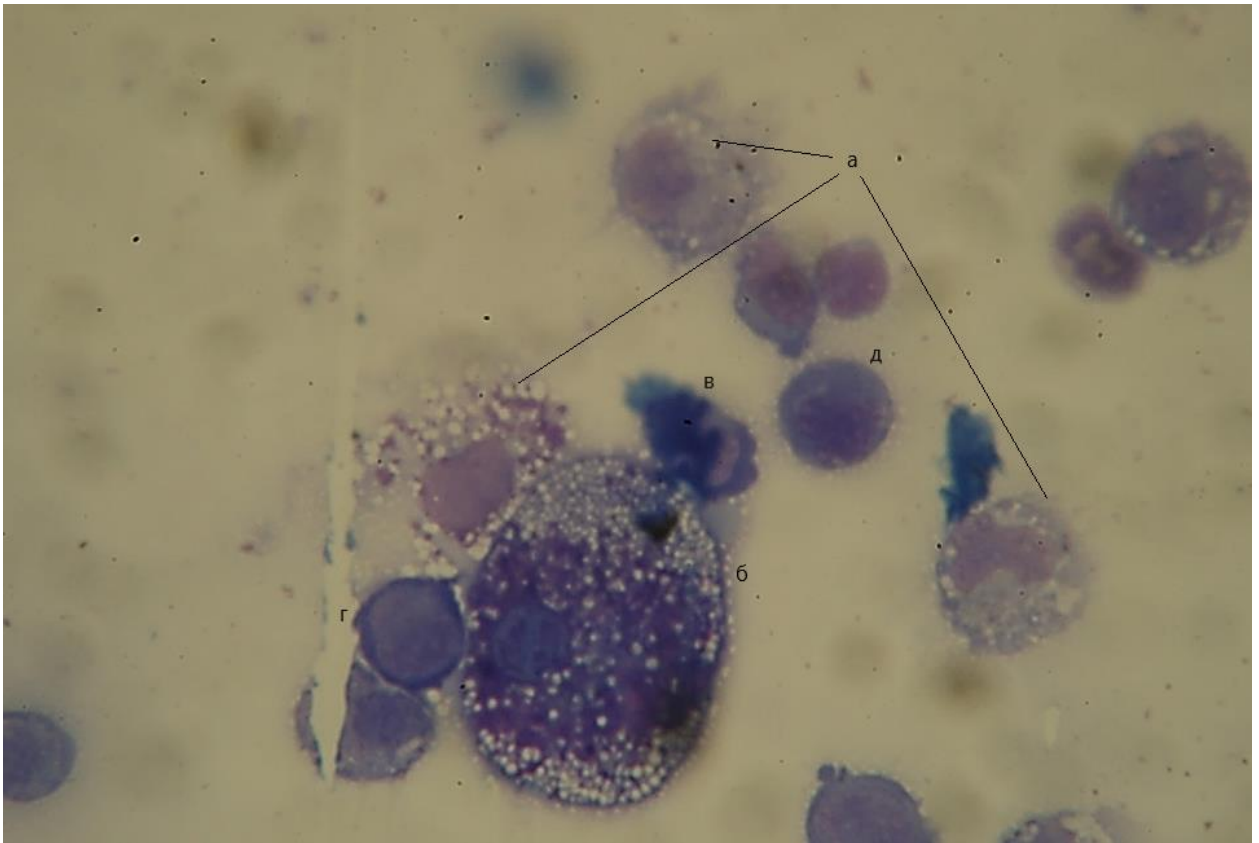


Рис.3.5. Фрагмент колонії II типу у камерах без фідера. а) зруйновані клітини б) макрофаг в) базофільний еритробласт г) проеритробласт д) мієлобласт. Світловий мікроскоп.х1000. Забарвлення за Папенгеймом

Зниження кількості клітин в дифузійних камерах до 5-го тижня культивування, мабуть, є результатом пониження концентрації факторів росту і регуляторних молекул у культуральній системі внаслідок метаболічних процесів (живлення клітин в камері і викид продуктів метаболізму у середовище) і, внаслідок цього можливою появою в культурі інгібіторів проліферації і диференціювання гемопоетичних клітин, що продукуються як клітинами фідера, так і самими гемопоетичними клітинами. Перевага у рості клітин, що культивуються над шаром фетальних клітин, кому поставити свідчить про їх більший проліферативний потенціал.

3.2. Оцінка колонієутворюючої активності гранулоцитарно-макрофагальних клітин-попередників, культивованих у дифузійних камерах на різних фідерах *in vitro*

На 2-му, 3-му і 5-му тижнях культивування у дифузійних камерах, занурених у середовище з фідерними шарами, клітини після демонтажу камер підраховували, змішували з напіврідким агаром у присутності ГМ-КСФ. як описано у розділі 2 і повторно культивували *in vitro* для визначення їх клоногенної активності. Кількість гемопоетичних попередників, які представляли колонієутворюючі одиниці - гранулоцитарно-макрофагальні (КУО-ГМ) отримані на кожному етапі культивування, порівнювали між собою. Таким чином, якщо на першому етапі ми оцінювали кількість клітин миші, культивованих у живильному середовищі без фідера, з фідером з фетальної тканини і фідером з кісткової тканини дорослої миші, то на другому етапі ми оцінювали потенціал культивованих у дифузійних камерах гемопоетичних клітин; з цією метою проводили їх субкультивування у напіврідкому агарі *in vitro*.

У першій серії експериментів відсутність фідера негативно впливала на кількість ядровмісних клітин в культурі, не зважаючи на присутність повного живильного середовища. Виходячи з того, що ядровмісних клітин, культивованих без фідера, нараховувалось $0,2 \pm 0,05 \times 10^5$, тобто в 5 разів менше, ніж посадили, в одній камері кількості клітин для подальшого культивування не вистачало. Тому об'єднували вміст клітин 5 камер. Через 2 тижні КУО-ГМ при наявності у середовищі ГМ-КСФ (в разі відсутності фідера) дорівнювала $3,5 \pm 0,3$ з розрахунку на 1×10^5 експлантованих клітин. За типом це були дифузні колонії. Колоній I і II типу в культурі не визначали. Проте кількість малих кластерів у варіанті без фідера збільшувалась і становила $(8,8 \pm 0,4)$ ($p < 0,05$). При продовженні культивування кровотворення згасало.

На наступному етапі експериментів проводили клоногенний аналіз вихідної суспензії ядровмісних клітин, вилучених з дифузійних камер, які культивувалися в живильному середовищі над шаром фідера, отриманого заздалегідь з фетальних тканин ембріона миші. Культивування проводили у напіврідкому агарі *in vitro* у присутності ГМ-КСФ; КУО-ГМ становила $56,50 \pm 4,2$ (табл. 1). У культурах переважали компактні колонії I типу ($38,2 \pm 2,7$), вони склали приблизно 50 % від загальної кількості всіх колоній (рис.1).

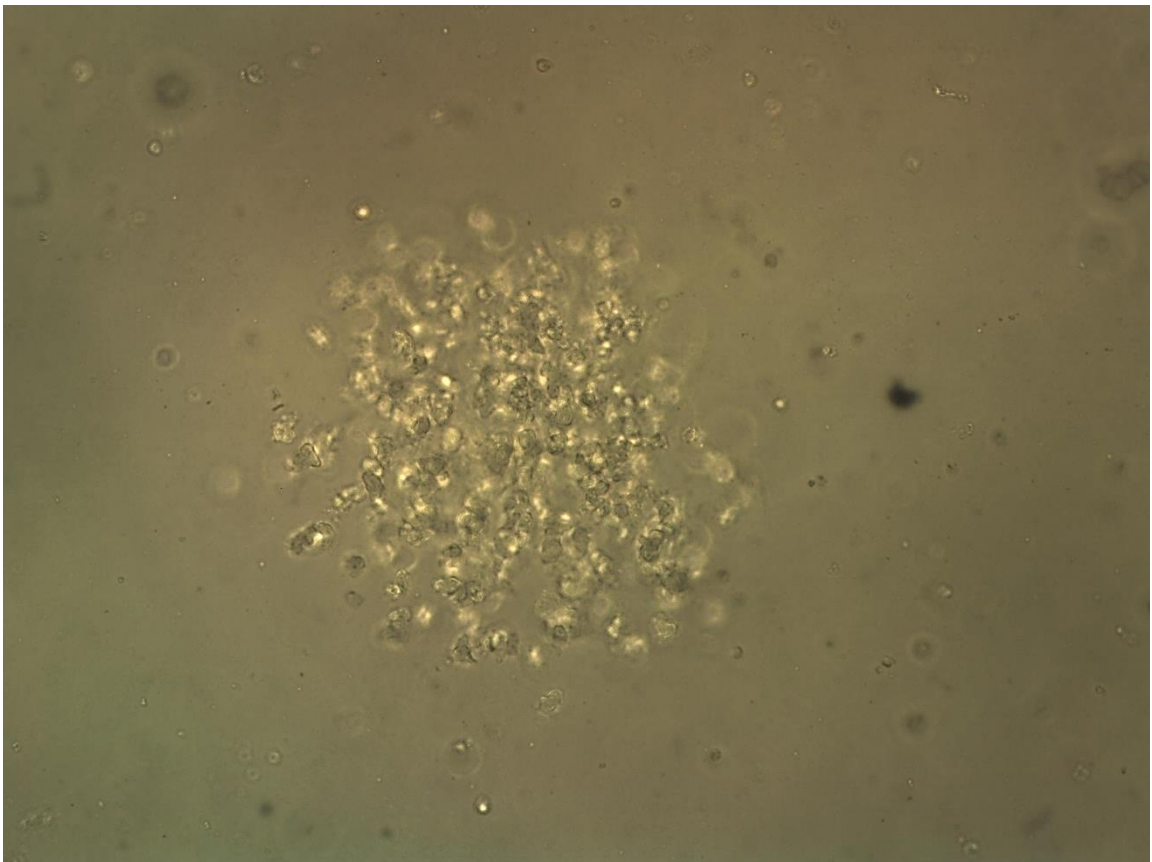


Рис. 3.6 Колонія I-го типу в культурі з напіврідким агаром *in vitro*, отримана з клітин, культивованих у дифузійних камерах. Інвертований мікроскоп. x200

Колонії II-го і III-го типу були на рівні $13,0 \pm 2,7$ і $5,3 \pm 1,5$, відповідно. Кластери в сумі склали $25,8 \pm 1,5$, причому кількість великих була $6,3 \pm 0,6$, а малих – $19,5 \pm 1,5$.

Суспензії клітин, вилучених з дифузійних камер, які культивувалися в живильному середовищі над шаром фідера, отриманого заздалегідь з кісткової тканини дорослої миші (ФКМ), так само проводили у напіврідкому агарі *in vitro* у присутності ГМ-КСФ. КУО-ГМ становила $38,50 \pm 3,14$ (табл.1).

У культурах переважали колонії I типу ($22,2 \pm 1,6$), вони склали приблизно 50 % від загальної кількості всіх колоній. Колонії II і III типу були на рівні $10,2 \pm 1,7$ і $6,3 \pm 1,5$, відповідно. Кластери в сумі склали $15,8 \pm 1,5$, причому кількість великих була $4,3 \pm 0,8$, а малих – $11,5 \pm 1,2$.

Таблиця 3,1

Колонієутворююча активність гемопоетичних клітин-попередників з кісткового мозку мишей, культивованих 2 тижні у культурі з напіврідким агаром при різних умовах культивування де ФФТ - фідер з фетальної тканини, ФКМ – фідер з кісткової тканини дорослої миші

Показник	Термін культивування								
	2			3			5		
	Тип колоній								
	I	II	III	I	II	III	I	II	III
КУОк/1 x 10 ⁵	0	0	$3,5 \pm 0,3$	$38,2 \pm 2,7$	$13,0 \pm 2,7$	$13,0 \pm 2,7$	$22,2 \pm 1,6$	$10,2 \pm 1,7$	$6,3 \pm 1,5$
Сума КУО-ГМ/1x10 ⁵	$3,5 \pm 0,3$			$56,50 \pm 4,2$			$38,50 \pm 3,14$		
	Великі		Малі	Великі		Малі	Великі		Малі
КЛУОк/1x10 ⁵	$2,3 \pm 2,2$		$6,5 \pm 2,0$	$6,3 \pm 0,6$		$19,5 \pm 1,5$	$4,3 \pm 0,8$		$11,5 \pm 1,2$
Сума КЛУО/1x10 ⁵	$8,8 \pm 0,4$			$25,8 \pm 1,5$			$15,8 \pm 1,5$		

Величину III визначали як співвідношення колоній до кластерів. Для клітин-попередників, які сформувалися в культурі з напіврідким агаром з клітин, культивованих заздалегідь над фідером з фетальних клітин і з клітин дорослої миші дорівнювали 2,2 і 2,4 відповідно, що свідчить про переважання

колоній над кластерами. Значення даного показника для гемопоетичних клітин, що культивуються протягом 2 тижнів у дифузійних камерах за відсутності фідерного шару, було у край низьким і складало 0,4 ($p < 0,001$). У культурах переважали кластерутворюючі клітини, що володіють обмеженою проліферативною активністю і здатні пройти незначну кількість поділів (рис.2).

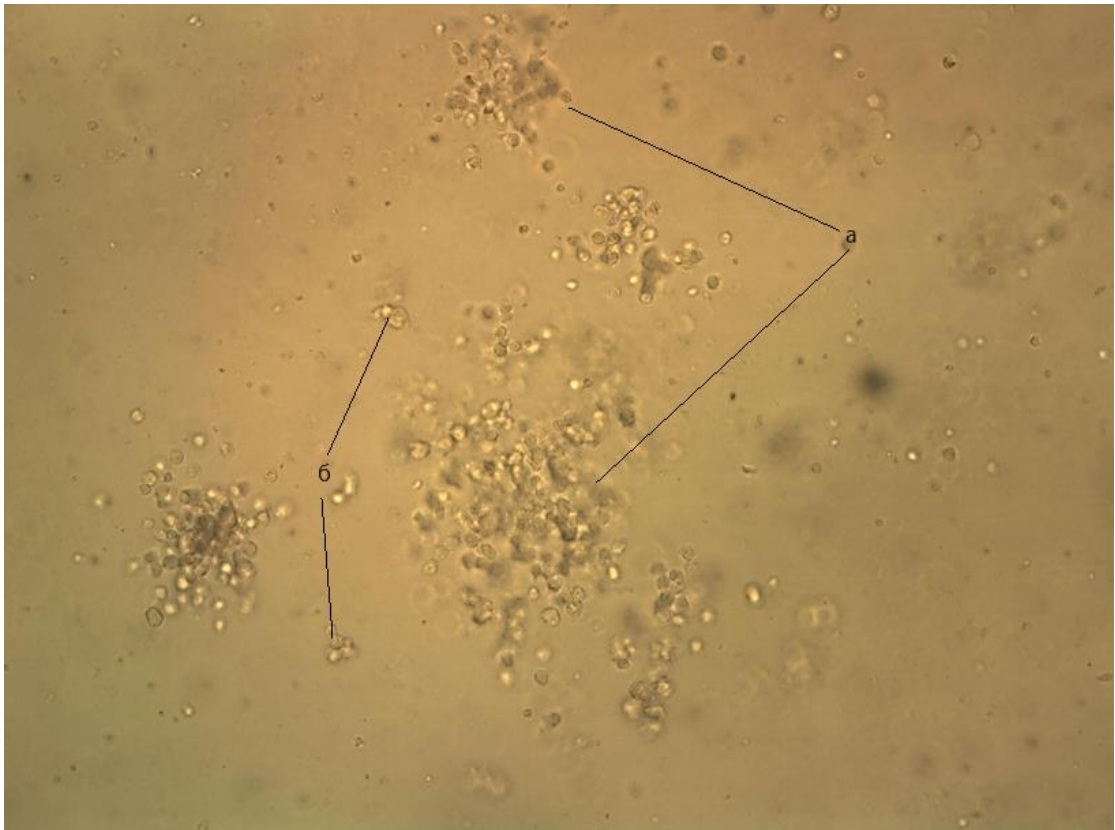


Рис.3.7. Кластери великі (а) і малі (б) в культурі з напіврідким агаром, отримані з клітин, культивованих у дифузійних камерах. Інвертований мікроскоп. X100

Зниження кількості ядровмісних клітин і низькі показники клоногенної активності клітин, що перебувають у культурі протягом перших 2 тижнів за відсутності фідерного шару, свідчили про згасання проліферативної і диференціувальної активності клітин у зв'язку з відсутністю стимуляторів

гемопоезу. Продовження культивування клітин у такій системі було недоцільне.

Культивування до 3 тижнів гемопоетичних клітин-попередників з кісткового мозку миші показало, що у випадку наявності фідерної підложки з кістки дорослої миші (ФКМ) колонієутворення в культурі дифузійних камер збільшувалось і сумарне значення КУО-ГМ дорівнювало ($48,7 \pm 3,5$) ($p < 0,05$) переважно за рахунок збільшення колоній I типу ($28,6 \pm 2,8$) ($p < 0,05$) порівняно з попереднім терміном культивування. Достовірного збільшення КлУО виявлено не було.

Проте вже з 5-го тижня в культурі на фідері ФКМ відбувалося зниження колонієутворюючої функції. КУО-ГМ становила $42,6 \pm 5,1$ ($p < 0,05$) відносно показників, отриманих при культивуванні протягом 3 тижнів (табл. 2).

Таблиця 3.2

Динаміка колонієутворюючої активності ГКП миші, культивованих у дифузійних камерах у присутності фідера ФКМ (n=8)

Показник	Термін культивування								
	2			3			5		
	Тип колоній								
	I	II	III	I	II	III	I	II	III
КУОк/1 x 10 ⁵	22,2 ± 1,6	10,2 ± 1,7	6,3 ± 1,5	28,6 ± 2,8	11,2 ± 3,4	9,7 ± 3,0	17,6 ± 6,46	15,1 ± 2,57	10,0 ± 2,85
Сума КУО-ГМ/1x10 ⁵	38,50 ± 3,14			48,7 ± 3,5			42,6 ± 5,1		
	Великі		Малі	Великі		Малі	Великі		Малі
КлУОк/1x10 ⁵	4,1 ± 1,3		12,8 ± 2,8	3,9 ± 1,4		10,0 ± 2,7	4,9 ± 1,6		11,3 ± 2,6
Сума КлУО/1x10 ⁵	16,9 ± 3,2			13,9 ± 3,4			16,2 ± 2,8		

Примітка: * – відмінності достовірно відрізняються порівняно з попереднім терміном культивування ($p < 0,05$).

Оцінка проліферативного потенціалу протягом 5 тижнів показала, що цей показник на 2-й, 3-й і 5-й тижень становив 2,3, 3,5 і 2,6 відповідно (рис 3.8).

Таким чином, найкращий результат, що відображається у максимальному збільшенні як ядровмісних клітин, так і клоногенних попередників у порожнині дифузійної камери у присутності фідерного шару ФКМ, був отриманий на 3-му тижні перебування клітин в даній системі (рис.1).

Культивування гемопоетичних клітин, вилучених з дифузійних камер, культивованих у живильному середовищі з фідером фетальної кістки миші (ФФТ), призвело до формування колоній-клонів на 3-й тижень, кількість яких перевищувала результати культивування у 2-тижневий термін, зростаючи з $56,50 \pm 4,2$, до $68,50 \pm 5,8$ колоній. Це зростання відбувалося за рахунок колоній першого порядку, які становили $44,0 \pm 3,5$ агрегатів на 1×10^5 експлантованих клітин.

Подальше збільшення терміну культивування до 5 тижнів у культурах з фідером ФФТ призводило до зниження наступних показників клоногенної активності гемопоетичних клітин: числа колоній I типу – до $27,6 \pm 3,2$ ($p < 0,05$), суми колоній – до $48,7 \pm 5,2$ ($p < 0,05$), порівняно з аналогічними значеннями на попередньому терміні. Кластероутворююча активність істотно не змінювалась (табл.2).

Таблиця 3.2

Динаміка колонієутворюючої активності гемопоетичних клітин кісткового мозку миші при культивуванні у присутності фідера ФФТ (n=8)

Показник	Термін культивування								
	2			3			5		
	Тип колоній								
	I	II	III	I	II	III	I	II	III
КУОк/1 x 10 ⁵	38,2 ± 2,7	13,0 ± 2,7	5,3 ± 1,5	44,0 ± 3,5	15,8 ± 2,2	8,2 ± 1,3	27,6 ± 3,2	11,0 ± 2,8	10,3 ± 3,2
Сума КУО-ГМ/1x10 ⁵	56,7 ± 4,2			68,50 ± 5,8			68,50 ± 5,8		
	Великі		Малі	Великі		Малі	Великі		Малі
КЛУОк/1x10 ⁵	5,9 ± 1,90		13,3 ± 2,5	5,4 ± 1,80		12,8 ± 2,7	5,2 ± 1,7		14,3 ± 2,8
Сума КЛУО/1x10 ⁵	19,2 ± 2,26			18,1 ± 3,0			18,1 ± 3,0		

Примітка: відмінності достовірно відрізняються порівняно з попереднім терміном культивування (p < 0,05).

Кількість КЛУО у період з 2-го по 3-й тиждень культивування не змінювалася.

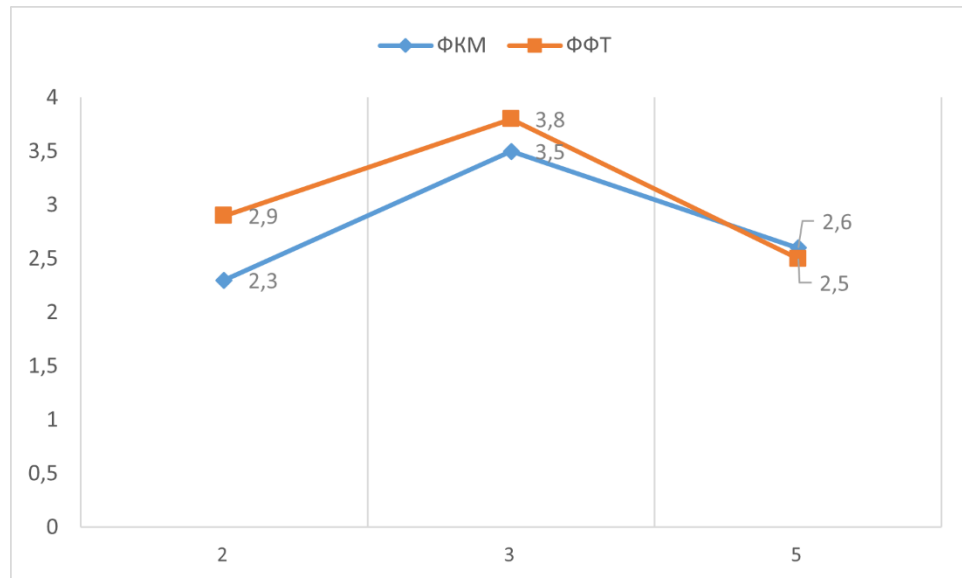


Рис. 3.8 Зміна проліферативного потенціалу клітин-попередників з клітин, культивованих над ФФТ (фідер з фетальної кістки) і ФКТ (фідер кісткового мозку) протягом 2, 3, 5 тижнів

На 2-му, 3-му і 5-му тижнях культивування гемопоетичних клітин на фідерних шарах ФФТ, величина ПП складала 2,9, 3,8 і 2,5 відповідно (рис. 3.8).

Таким чином, виявилось, що найкращим терміном для культивованих у дифузійних камерах клітин є 3-й тиждень. Ця закономірність виявляється як у випадку культивування на фідері з клітин дорослої миші, так і на фідері з фетальних тканин. Проте колонієутворююча здатність була вищою у другому випадку. Різниця між показниками статистично достовірна ($p < 0,05$). Кількість кластерів суттєво не відрізнялася у вказані терміни. Це можна пояснити тим, що кластери утворюються з більш зрілих попередників, які пройшли кілька ділень до попадання у культуру і не можуть в повній мірі відобразити гемопоез. Проте ця роль повністю належала колонієутворенню, на що вказують отримані результати.

Аналіз проведених експериментів показав перевагу фідерного шару, утвореного клітинами строми фетальної кісткової тканини порівняно з фідером із клітин кісткової тканини дорослої миші. Таким чином, клітини строми є гетерогенними за своїми функціональними властивостями. В ембріональному і постнатальному періоді вони виділяють різний комплекс

цитокінів, які впливають на ефективність колонієутворення клітин-попередників в культурі *in vitro*. Проте у першому і у другому випадку фідерний шар з стромальних клітин є ефективним субстратом для підтримки кровотворення *in vitro*, що підтверджується експансією гранулоцитарно-макрофагальних клітин-попередників кісткового мозку миші. Кількісний розподіл кластерів не має вирішального значення при оцінці проліферативного потенціалу культивованих клітин.

ОБГОВОРЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕНЬ

У природніх умовах компоненти будь-якої біологічної системи є взаємопов'язаними, завдяки чому підтримується рівновага між утворенням та елімінацією клітин, забезпечується їх диференціювання (у випадку стовбурових клітин) та проліферація. Гемопоетичні стовбурові клітини є компонентом ніші кісткового мозку, тому є взаємопов'язаними із стромальними клітинами, наприклад, фібробластами, остеобластами тощо.

Вже відомо, що продукування та транспорт факторів росту та цитокінів забезпечується клітинами мікрооточення кісткового мозку, проте невизначеним залишалось питання, чи є безпосередній контакт між клітинами необхідним для повноцінного існування клітин *in vitro* та *in vivo*. Використання гелевих дифузійних камер дозволило модифікувати модель кровотворення *in vitro*, завдяки чому стало можливим культивування гемопоетичних стовбурових клітин у середовищі без безпосереднього контакту із фідерними шарами. Крім того, створена модель дозволила визначити ефективність фідерних шарів ембріонального походження та фідерних шарів, отриманих з кісткового мозку дорослої миші у порівнянні між собою та контрольними культурами, створеними в умовах агарового середовища із додаванням факторів росту.

Культивуючи клітини у дифузійних гелевих камерах над фідерними шарами, ми виявили, що проліферативний потенціал гемопоетичних стовбурових клітин збільшується, починаючи з другого тижня, досягаючи піку на третьому тижні культивування. Проте, потім цей потенціал іде на спад і на п'ятому тижні відновлюється до початкових значень. Ця динаміка є закономірною як для клітин, що культивувались на фідері з фетальної кістки, так і на фідері, отриманому з кісткового мозку дорослої миші. Натомість, у зразках клітин, які культивували у дифузійних камерах без фідерного шару, кількість ядровмісних клітин вже на другому тижні стрімко падала, а сама

культура втрачала свої фізіологічні властивості. Така неефективність була обумовлена зниженням кількості ядровмісних клітин і низькими показниками клоногенної активності клітин.

При культивуванні клітин у присутності як фідери ФКМ, так і ФФТ, у культурах переважали компактні колонії першого типу, які утворюються найпершими та дають початок компактним колоніям з дифузним вінчиком та дифузним колоніям. У таких типах колоній менша кількість макрофагальних клітин, ніж в інших, що свідчить про її високу проліферативну здатність.

Отримані результати підтвердили думку про те, що культивування клітин за участю фідерних шарів є більш успішним за культивування в агаровому середовищі. Крім того, серед двох варіантів фідерних шарів більш продуктивною виявилась модель із використанням фетального фідера [62]. Тривала підтримка примітивних гемопоетичних клітин та їх клоногенної здатності та функціональних характеристик у культурах з живильним шаром вказує на те, що дифузійні фактори є достатніми для підтримки гемопоезу. Виходячи з отриманих даних культивування кровотворних клітин у гелевих дифузійних камерах над шаром стромальних клітин *in vitro*, ми прийшли до висновку, що безпосередні контакти між клітинами не є обов'язковими для успішного довгострокового гемопоезу *in vitro*.

У майбутньому модель може бути використана для експансії гемопоетичних стовбурових клітин *in vitro* та вивчення того, як модифікації фідерних шарів впливають на розвиток дистантно культивованих гемопоетичних стовбурових клітин [63].

ВИСНОВКИ

1. Удосконалена модель довготривалої підтримки гемопоезу у гелевих дифузійних камерах, занурених у живильне середовище над фідерним шаром, дозволила довести думку про те, що непосредній контакт з матриксом стромальної підложки не є обов'язковим для підтримки гемопоезу в культурі *in vitro*. Цитокіни і ростові фактори, продуцентами яких є клітини фідерного шару, дистантно діяли на культивовані у дифузійних камерах клітини.

2. Виявилось, що найкращим терміном для культивованих гемопоетичних клітин у дифузійних камерах *in vitro* є 14 днів.

3. Не зважаючи на морфологічну схожість клітин фідерного моношару, що належать до категорії фібробластоподібних, вони виявилися різними за функціональними властивостями. Так ефективність колонієутворення дорівнювала на фідері з клітин дорослої миші ($48,7 \pm 3,5$), а на фідері з фетальних тканин ($68,50 \pm 5,8$), тобто колонієутворююча здатність була вищою у другому випадку. Різниця між показниками статистично достовірна ($p < 0,05$).

4. Кількість кластерів суттєво не відрізнялася у вказані терміни культивування. Це можна пояснити тим, що кластери утворюються з більш зрілих попередників, які пройшли кілька ділень до попадання у культуру і не можуть в повній мірі відображати процеси гемопоезу.

5. Результати культивування гемопоетичних клітин у гелевих дифузійних камерах, занурених у середовище над фідерним шаром, показали адекватність такої моделі для вивчення клітинних взаємодій.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Hematopoiesis Madhumita Jagannathan-Bogdan and Leonard I. Zon. *Development*. 2013 Jun 15; 140(12): 2463–2467. doi: 10.1242/dev.083147
2. Histology, Hematopoiesis. Joseph Chapman; Yaoping Zhang. StatPearls Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2020 Jan-.
3. Hematopoietic Stem Cells - ROBERT G. HAWLEY, ALI RAMEZANI, and TERESA S. HAWLEY. *Methods Enzymol*. Author manuscript; available in PMC 2008 May 19. doi: 10.1016/S0076-6879(06)19007-2
4. Receptor tyrosine kinases and the regulation of hematopoiesis - R F Paulson, A Bernstein. *Affiliations* expand DOI: 10.1006/smim.1995.0031
5. Stem cell factor - I K McNiece 1, R A Briddell. *J Leukoc Biol* 1995 Jul;58(1):14-22. doi: 10.1002/jlb.58.1.14.
6. Concise Review: Stem Cell Antigen-1: Expression, Function, and Enigma - Ashley P Ng, and Warren S Alexander, Christina Holmes William L. Stanford Ph.D. 02 January 2009 <https://doi.org/10.1634/stemcells.2006-0644>
7. Haematopoietic stem cells: past, present and future. *Cell Death Discov*. 2017; 3: 17002. doi: 10.1038/cddiscovery.2017.2
8. Morrison SJ, Uchida N, Weissman IL. The biology of hematopoietic stem cells. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 1995;11:35-71. doi: 10.1146/annurev.cb.11.110195.000343. PMID: 8689561.
9. Alessandro Aiuti, Serena Scala, and Christian Chabannon - The EBMT Handbook: Hematopoietic Stem Cell Transplantation and Cellular Therapies [Internet]. 7th edition Chapter 7 Biological Properties of HSC: Scientific Basis for HSCT.
10. Hematopoietic Stem Cells The Paradigmatic Tissue-Specific Stem Cell - David Bryder, Derrick J. Rossi, and Irving L. Weissman *Am J Pathol*. 2006 Aug; 169(2): 338–346. doi: 10.2353/ajpath.2006.060312

11. Rieger, Michael A, and Timm Schroeder. "Hematopoiesis." *Cold Spring Harbor perspectives in biology* vol. 4,12 a008250. 1 Dec. 2012, doi:10.1101/cshperspect.a008250
12. New paradigms on hematopoietic stem cell differentiation - Hui Cheng, Zhaofeng Zheng, and Tao Cheng. *Protein Cell*. 2020 Jan; 11(1): 34–44. doi: 10.1007/s13238-019-0633-0
13. Factors and Networks that Underpin Early Hematopoiesis - Elinore M. Mercer,^{a,c} Yin C. Lin,^a and Cornelis Murre^{a,b} *Semin Immunol*. 2011 Oct; 23(5): 317–325. doi: 10.1016/j.smim.2011.08.004
14. Zhang CC, Lodish HF. Cytokines regulating hematopoietic stem cell function. *Curr Opin Hematol*. 2008;15(4):307-311. doi:10.1097/MOH.0b013e3283007db5
15. Li WM, Huang WQ, Huang YH, Jiang DZ, Wang QR. Positive and negative hematopoietic cytokines produced by bone marrow endothelial cells. *Cytokine*. 2000 Jul;12(7):1017-23. doi: 10.1006/cyto.1999.0678. PMID: 10880247.
16. Alexander WS. Cytokines in hematopoiesis. *Int Rev Immunol*. 1998;16(5-6):651-82. doi: 10.3109/08830189809043013. PMID: 9646181.
17. Wlodawer A, Pavlovsky A, Gustchina A. Hematopoietic cytokines: similarities and differences in the structures, with implications for receptor binding. *Protein Sci*. 1993 Sep;2(9):1373-82. doi: 10.1002/pro.5560020902. PMID: 8401223; PMCID: PMC2142454.
18. Baker SJ, Rane SG, Reddy EP. Hematopoietic cytokine receptor signaling. *Oncogene*. 2007 Oct 15;26(47):6724-37. doi: 10.1038/sj.onc.1210757. PMID: 17934481.
19. Foxwell BM, Barrett K, Feldmann M. Cytokine receptors: structure and signal transduction. *Clin Exp Immunol*. 1992;90(2):161-169. doi:10.1111/j.1365-2249.1992.tb07922.x

20. Cecchi F, Rabe DC, Bottaro DP. The Hepatocyte Growth Factor Receptor: Structure, Function and Pharmacological Targeting in Cancer. *Curr Signal Transduct Ther*. 2011;6(2):146-151. doi:10.2174/157436211795659955
21. Kaushansky K. Hematopoietic growth factors, signaling and the chronic myeloproliferative disorders. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2006;17(6):423-430. doi:10.1016/j.cytogfr.2006.09.005
22. Lord BI. Myeloid cell kinetics in response to haemopoietic growth factors. *Baillieres Clin Haematol*. 1992 Jul;5(3):533-50. doi: 10.1016/s0950-3536(11)80006-5. PMID: 1281018.
23. de Haan G, Donte B, Engel C, Loeffler M, Nijhof W. Prophylactic pretreatment of mice with hematopoietic growth factors induces expansion of primitive cell compartments and results in protection against 5-fluorouracil-induced toxicity. *Blood*. 1996 Jun 1;87(11):4581-8. PMID: 8639826.
24. Pazhakh V, Lieschke GJ. Hematopoietic growth factors: the scenario in zebrafish. *Growth Factors*. 2018 Dec;36(5-6):196-212. doi: 10.1080/08977194.2019.1567506. Epub 2019 Feb 15. PMID: 30764671.
25. Bone Marrow and Hematopoiesis. David C. Linch, in *Encyclopedia of Immunology (Second Edition)*, 1998
26. Ralph J. Hauke, MD, FACP Stefano R. Tarantolo, *Hematopoietic Growth Factors*
27. Laurenti E, Göttgens B. From hematopoietic stem cells to complex differentiation landscapes. *Nature*. 2018;553(7689):418-426. doi:10.1038/nature25022
28. Bone Marrow Microenvironment in Health and Disease Ronald Hoffman, Bridget K. Marcellino, in *Encyclopedia of Bone Biology*, 2020
29. Klaus Podar, Kenneth C. Anderson, in *Handbook of Cell Signaling (Second Edition)*, 2010
30. Méndez-Ferrer S, Michurina TV, Ferraro F, Mazloom AR, Macarthur BD, Lira SA, Scadden DT, Ma'ayan A, Enikolopov GN, Frenette PS. Mesenchymal

and haematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche. *Nature*. 2010 Aug 12;466(7308):829-34. doi: 10.1038/nature09262. PMID: 20703299; PMCID: PMC3146551.

31. Crippa S, Bernardo ME. Mesenchymal Stromal Cells: Role in the BM Niche and in the Support of Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Hemasphere*. 2018;2(6):e151. Published 2018 Nov 16. doi:10.1097/HS9.0000000000000151

32. Moreau I, Duvert V, Caux C, Galmiche MC, Charbord P, Banchereau J, Saeland S. Myofibroblastic stromal cells isolated from human bone marrow induce the proliferation of both early myeloid and B-lymphoid cells. *Blood*. 1993 Oct 15;82(8):2396-405. PMID: 7691259.

33. Aqmasheh S, Shamsasanjan K, Akbarzadehlaleh P, Pashoutan Sarvar D, Timari H. Effects of Mesenchymal Stem Cell Derivatives on Hematopoiesis and Hematopoietic Stem Cells. *Adv Pharm Bull*. 2017;7(2):165-177. doi:10.15171/apb.2017.021

34. Anthony BA, Link DC. Regulation of hematopoietic stem cells by bone marrow stromal cells. *Trends Immunol*. 2014;35(1):32-37. doi:10.1016/j.it.2013.10.002

35. Bernal A, Arranz L. Nestin-expressing progenitor cells: function, identity and therapeutic implications. *Cell Mol Life Sci*. 2018;75(12):2177-2195. doi:10.1007/s00018-018-2794-z

36. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*. 1998 Nov 6;282(5391):1145-7. doi: 10.1126/science.282.5391.1145. Erratum in: *Science* 1998 Dec 4;282(5395):1827. PMID: 9804556.

37. Namba M, Fukushima F, Kimoto T. Effects of feeder layers made of human, mouse, hamster, and rat cells on the cloning efficiency of transformed human cells. *In Vitro*. 1982 May;18(5):469-75. doi: 10.1007/BF02796475. PMID: 6749654.

38. Namba M, Fukushima F, Kimoto T. Effects of feeder layers made of human, mouse, hamster, and rat cells on the cloning efficiency of transformed human cells. *In Vitro*. 1982 May;18(5):469-75. doi: 10.1007/BF02796475. PMID: 6749654.
39. Roy A, Krzykwa E, Lemieux R, Néron S. Increased efficiency of gamma-irradiated versus mitomycin C-treated feeder cells for the expansion of normal human cells in long-term cultures. *J Hematother Stem Cell Res*. 2001 Dec;10(6):873-80. doi: 10.1089/152581601317210962. PMID: 11798513.
40. Namba M, Fukushima F, Kimoto T. Effects of feeder layers made of human, mouse, hamster, and rat cells on the cloning efficiency of transformed human cells. *In Vitro*. 1982 May;18(5):469-75. doi: 10.1007/BF02796475. PMID: 6749654.
41. Correia AS, Anisimov SV, Li JY, Brundin P. Growth factors and feeder cells promote differentiation of human embryonic stem cells into dopaminergic neurons: a novel role for fibroblast growth factor-20. *Front Neurosci*. 2008;2(1):26-34. Published 2008 Jul 7. doi:10.3389/neuro.01.011.2008
42. Davis SM, Pennypacker KR. The role of the leukemia inhibitory factor receptor in neuroprotective signaling. *Pharmacol Ther*. 2018;183:50-57. doi:10.1016/j.pharmthera.2017.08.008
43. Pastuschek J, Poetzsch J, Morales-Prieto DM, Schleußner E, Markert UR, Georgiev G. Stimulation of the JAK/STAT pathway by LIF and OSM in the human granulosa cell line COV434. *J Reprod Immunol*. 2015 Apr;108:48-55. doi: 10.1016/j.jri.2015.03.002. Epub 2015 Mar 16. PMID: 25817464.
44. Llames S, García-Pérez E, Meana Á, Larcher F, del Río M. Feeder Layer Cell Actions and Applications. *Tissue Eng Part B Rev*. 2015;21(4):345-353. doi:10.1089/ten.TEB.2014.0547
45. Yue XS, Fujishiro M, Nishioka C, et al. Feeder cells support the culture of induced pluripotent stem cells even after chemical fixation. *PLoS One*. 2012;7(3):e32707. doi:10.1371/journal.pone.0032707

46. SROUR, E. F., HOFFMAN, R., & ZANJANI, E. D. (1992). Animal Models for Human Hematopoiesis. *Journal of Hematotherapy*, 1(2), 143–153. doi:10.1089/scd.1.1992.1.143
47. Mike McGarry Ph.D, Consultant to Rad Source Technologies BONE MARROW TRANSPLANTATION IN MICE
48. Niskanen E, Cline MJ. Growth of mouse and human bone marrow in diffusion chambers in mice. Development of myeloid and erythroid colonies and proliferation of myeloid stem cells in cyclophosphamide- and erythropoietin-treated mice. *Cell Tissue Kinet.* 1979 Jan;12(1):59-70. doi: 10.1111/j.1365-2184.1979.tb00113.x. PMID: 421241.
49. Abarrategi, Ander et al. “Modeling the human bone marrow niche in mice: From host bone marrow engraftment to bioengineering approaches.” *The Journal of experimental medicine* vol. 215,3 (2018): 729-743. doi:10.1084/jem.20172139
50. Boris M. Holzapfel, Dietmar W. Hutmacher, Bianca Nowlan, Valerie Barbier, Laure Thibaudeau, Christina Theodoropoulos, John D. Hooper, Daniela Loessner, Judith A. Clements, Pamela J. Russell, Allison R. Pettit, Ingrid G. Winkler, Jean-Pierre Levesque - Tissue engineered humanized bone supports human hematopoiesis in vivo, *Biomaterials*, Volume 61, 2015, Pages 103-114
<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2015.04.057>.
51. Implantable microenvironments to attract hematopoietic stem/cancer cells - Jungwoo Lee, a Matthew Li, et al. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012 Nov 27; 109(48): 19638–19643. doi: 10.1073/pnas.1208384109
52. Leisten I, Kramann R, Ventura Ferreira MS, Bovi M, Neuss S, Ziegler P, Wagner W, Knüchel R, Schneider RK. 3D co-culture of hematopoietic stem and progenitor cells and mesenchymal stem cells in collagen scaffolds as a model of the hematopoietic niche. *Biomaterials.* 2012 Feb;33(6):1736-47. doi: 10.1016/j.biomaterials.2011.11.034. Epub 2011 Dec 1. PMID: 22136713.

53. Congrains, Ada et al. "3D Scaffolds to Model the Hematopoietic Stem Cell Niche: Applications and Perspectives." *Materials* (Basel, Switzerland) vol. 14,3 569. 26 Jan. 2021, doi:10.3390/ma14030569
54. Glenn H. Algire, James M. Weaver, Richmond T. Prehn, Growth of Cells In Vivo in Diffusion Chambers. I. Survival of Homografts in Immunized Mice, *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, Volume 15, Issue 3, December 1954, Pages 493–507, <https://doi.org/10.1093/jnci/15.3.493>
55. Niskanen E, Cline MJ. Growth of mouse and human bone marrow in diffusion chambers in mice. Development of myeloid and erythroid colonies and proliferation of myeloid stem cells in cyclophosphamide- and erythropoietin-treated mice. *Cell Tissue Kinet.* 1979 Jan;12(1):59-70. doi: 10.1111/j.1365-2184.1979.tb00113.x. PMID: 421241.
56. Sharma MB, Limaye LS, Kale VP. Mimicking the functional hematopoietic stem cell niche in vitro: recapitulation of marrow physiology by hydrogel-based three-dimensional cultures of mesenchymal stromal cells. *Haematologica.* 2012;97(5):651-660. doi:10.3324/haematol.2011.050500
57. Pearson T, Greiner DL, Shultz LD. Creation of "humanized" mice to study human immunity. *Curr Protoc Immunol.* 2008 May;Chapter 15:Unit 15.21. doi: 10.1002/0471142735.im1521s81. PMID: 18491294; PMCID: PMC3023233.
58. Huey DD, Niewiesk S. Production of Humanized Mice through Stem Cell Transfer. *Curr Protoc Mouse Biol.* 2018 Mar;8(1):17-27. doi: 10.1002/cpmo.38. Epub 2018 Mar 30. PMID: 29988984; PMCID: PMC6034996.
59. Lan P, Tonomura N, Shimizu A, Wang S, Yang YG. Reconstitution of a functional human immune system in immunodeficient mice through combined human fetal thymus/liver and CD34+ cell transplantation. *Blood.* 2006 Jul 15;108(2):487-92. doi: 10.1182/blood-2005-11-4388. Epub 2006 Jan 12. PMID: 16410443.
60. Huang J, Li X, Coelho-dos-Reis JG, Wilson JM, Tsuji M. An AAV vector-mediated gene delivery approach facilitates reconstitution of functional

human CD8+ T cells in mice. PLoS One. 2014 Feb 6;9(2):e88205. doi: 10.1371/journal.pone.0088205. PMID: 24516613; PMCID: PMC3916402

61. Білько ДІ, винахідник. Спосіб довготривалого культивування гемопоетичних стовбурових клітин. Патент на корисну модель №146819. 2021 17 бер.

62. Bilko, N. M., et al. "Characterization of the Interactions between Stromal and Haematopoietic Progenitor Cells in Expansion Cell Culture Models." Cell Biology International, vol. 29, no. 1, 2005, pp. 83–86, doi:10.1016/j.cellbi.2004.11.016.

63. Briquet, Alexandra et al. "Prolonged ex vivo culture of human bone marrow mesenchymal stem cells influences their supportive activity toward NOD/SCID-repopulating cells and committed progenitor cells of B lymphoid and myeloid lineages." Haematologica vol. 95,1 (2010): 47-56. doi:10.3324/haematol.2009.008524

64. Benestad, H B. "Formation of granulocytes and macrophages in diffusion chamber cultures of mouse blood leucocytes." Scandinavian journal of haematology vol. 7,4 (1970): 279-88. doi:10.1111/j.1600-0609.1970.tb01899.x.

65. Gordon, M Y. "Quantitation of haemopoietic cells from normal and leukaemic RFM mice using an in vivo colony assay." British journal of cancer vol. 30,5 (1974): 421-8. doi:10.1038/bjc.1974.216.

66. Theocharides, Alexandre P A et al. "Humanized hemato-lymphoid system mice." Haematologica vol. 101,1 (2016): 5-19. doi:10.3324/haematol.2014.115212.