

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

Магістерська робота

освітній ступінь — магістр

на тему: **«МОРФОФУНКЦІОНАЛЬНІ ОСОБЛИВОСТІ КРОВОТВОРНИХ
КЛІТИН-ПОПЕРЕДНИКІВ КІСТКОВОГО МОЗКУ ССАВЦІВ У
КУЛЬТУРИ КЛІТИН *IN VITRO*»**

Виконав: студентка 2-го року навчання,

Спеціальність: 091 Біологія

Освітньо-наукова програма: Лабораторна
діагностика біологічних систем

Жукова Карина Олександрівна

Керівник

Руссу І. З.,

доцент, кандидат біологічних наук

Рецензент

Стародуб М.Ф.

Магістерська робота захищена

з оцінкою _____

Секретар ЕК

Пахаренко М. В.

«___» червня 2020 року

Київ — 2020

ЗМІСТ

	Стор.
ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ _____	4
ВСТУП _____	5
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ _____	7
1.1. Регуляція кровотворення у кістковому мозку гемопоетичними ростовими факторами, які виділяються мікрооточенням _____	7
1.1.1. Загальна характеристика факторів росту _____	7
1.1.2. Будова та функції Multi-CSF _____	8
1.1.3. Загальний опис структури та особливостей G-CSF людини _____	9
1.1.4. Макрофагальний колонієстимулюючий фактор макрофагів (M-CSF) _____	11
1.1.5. Основні характеристики еритропоезу та роль еритропоєтину, як фактора росту _____	12
1.2. Культура гемопоетичних клітин як модель дослідження гемопоезу <i>ex vivo</i> _____	14
1.2.1. Стромальне мікрооточення _____	14
1.2.2. Моделювання специфічного мікрооточення для експансії гемопоетичних стовбурових та клітин-попередників пуповинної крові <i>ex vivo</i> _____	17
ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА _____	23
РОЗДІЛ 2. ОБ'ЄКТ, МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ _____	23
2.1. Об'єкт дослідження _____	23
2.2. Реактиви, матеріали та обладнання _____	24
2.2.1. Витратні матеріали _____	24
2.2.2. Реактиви _____	25
2.2.3. Лабораторний посуд _____	25
2.2.4. Обладнання _____	26
2.3. Отримання кісткового мозку досліджуваних видів ссавців _____	26
2.3.1. Виділення клітин кісткового мозку миші та щура _____	26
2.3.2. Виділення клітин кісткового мозку людини _____	28
2.4. Оцінка життєздатності та підрахунок кількості кровотворних клітин _____	28
2.5. Приготування суспензії та культивування клітин кісткового мозку <i>in vitro</i> _____	30

2.6. Оцінка результатів культивування кровотворних клітин <i>in vitro</i> _____	30
2.7. Приготування препаратів гемопоетичних клітин _____	30
2.7.1. Приготування препаратів клітин, культивованих клітин <i>in vitro</i> (pick-up) _____	30
2.7.2. Приготування цитоцентрифужних препаратів клітин кісткового мозку _____	31
2.7.3. Приготування препаратів клітин периферійної крові лабораторних тварин _____	31
2.8. Забарвлення препаратів _____	32
2.8.1. Методика забарвлення препаратів за Паппенгеймом _____	32
2.9. Мікроскопія препаратів кісткомозкових клітин _____	33
2.10. Статистична обробка експериментальних результатів _____	33
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ _____	35
3.1. Особливості культивування гемопоетичних клітин-попередників кісткового мозку ссавців за умов <i>in vitro</i> _____	35
3.2. Кінетика формування клітинних агрегатів із кісткового мозку ссавців у живильному середовищі із різними факторами росту _____	36
3.3. Формування клітинних агрегатів із кісткового мозку щура у живильному середовищі із фактором росту миші та людини _____	39
3.4. Формування клітинних агрегатів із кісткового мозку миші у живильному середовищі із фактором росту миші та щура _____	42
3.5. Порівняльний аналіз ефективності колонієутворення гемопоетичних клітин-попередників при дії різних факторів росту _____	45
3.6. Клітинний склад кісткового мозку ссавців у нормі _____	48
УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ _____	51
ВИСНОВКИ _____	55
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ _____	56

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

ГСК — гемопоетичні стовбурові клітини

ГСПК — гемопоетичні стовбурові та прогеніторні клітини

МСК — мезенхімальні стовбурові клітини

ПК — пуповинна кров

СК — стовбурова клітина

Еро — еритропоетин (Erythropoietin)

G-CSF — гранулоцитарний колонієстимулюючий фактор (Granulocyte-colony stimulating factor)

GM-CSF — гранулоцитарно-макрофагальний колонієстимулюючий фактор (Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor)

IL — інтерлейкіни

M-CSF — макрофагальний колонієстимулюючий фактор (Macrophagic-colony-stimulating factor)

Multi-CSF — мультипотентний колонієстимулюючий фактор (Multipotent colony-stimulating factor)

VEGF — судинний ендотеліальний фактор росту (Vascular endothelial growth factor)

ВСТУП

Червоний кістковий мозок – центральний орган гемопоезу та імунопоезу, що має підвищену чутливість до травмуючої дії різних екопатогенних чинників [1].

Гемопоетична стовбурова клітина (ГСК) – це недиференційована клітина, здатна до самовідтворення та диференціювання у будь-яку клітину крові та імунної системи. Термін “стовбурова клітина” А. А. Максимов запропонував ще у 1908 році, щоб пояснити механізм швидкого самовідновлення клітин крові. Найближчі нащадки ГСК – це кровотворні клітини-попередники, що диференціюються у всі типи клітин крові.

ГСК виявляються у кістковому мозку людини та тварин. Велика кількість знаходиться у тазових кістках, стегнових кістках та грудині. Також у великих кількостях ГСК виявляються у плацентарній та пуповинній крові плоду. У невеликих кількостях ГСК виявляються у периферійній крові. Відомо, що їхня кількість у периферійній крові різко зростає після введення колонієстимулюючих факторів або під час фази відновлення після цитостатичної хіміотерапії [2].

У стовбурових клітин є дві важливі особливості, що відрізняють їх від клітин всіх інших типів. Вони є неспеціалізованими клітинами, які здатні протягом тривалого часу самовідновлюватись шляхом поділу. Також деякі фізіологічні умови викликають їхнє перетворення у спеціалізовані клітини – наприклад, у кардіоміоцити (клітини серцевого м'яза).

Зараз стовбурові клітини, зокрема, ГСК, доволі широко застосовуються для лікування багатьох захворювань, у тому числі хвороб системи крові. Проте знадобилося майже 20 років, щоб трансплантація кісткового мозку увійшла у методики практичної медицини. Тільки у кінці 60-х рр. були отримані переконливі дані про можливість застосування трансплантації кісткового мозку при лікуванні гострих лейкозів [3].

Нові клітини-попередники продукуються зі стовбурових клітин при

взаємодії стовбурових клітин і клітин строми. Після отримання відповідних стимулів для дозрівання відбуваються проліферація та диференціювання клітин, що завершуються міграцією більшості зрілих клітин із кісткового мозку. Гемопоез регулюється за допомогою численних цитокінів та експресії адгезивних молекул на клітинах-попередниках та клітинах строми.

Метою дипломної роботи було визначення морфологічних та функціональних особливостей кровотворних клітин-попередників кісткового мозку ссавців у культурі клітин *in vitro*.

Відповідно до мети було поставлено такі завдання:

1. відпрацювати та вдосконалити методику культивування кровотворних клітин-попередників кісткового мозку ссавців *in vitro*;
2. оцінити морфофункціональні особливості та проліферативний потенціал гемопоетичних клітин у культурі *in vitro*;
3. дати характеристику функціонування кровотворних клітин-попередників кісткового мозку ссавців *ex vivo*.

Об'єктом дослідження був процес культивування клітин-попередників кісткового мозку ссавців за різних умов *in vitro*. Предметом дослідження було визначення морфологічних та функціональних особливостей кровотворних клітин-попередників кісткового мозку ссавців у культурі клітин *in vitro*.

Методи дослідження – культивування гемопоетичних клітин *in vitro*, оцінка життєздатності клітин, морфофункціональні методи, мікроскопія препаратів кісткомозкових клітин, статистична обробка результатів.

Експериментальну частину роботи було виконано на базі Центру молекулярних та клітинних досліджень Національного університету «Києво-Могилянська академія».

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Регуляція кровотворення у кістковому мозку гемопоетичними ростовими факторами, які виділяються мікрооточенням

1.1.1. Загальна характеристика факторів росту. Фактори росту є одним із різновидів цитокінів. Цитокіни – білки, що здійснюють передачу сигналів між різними клітинами організму. У людини ідентифіковано більше ста різних цитокінів, і постійно з'являються повідомлення про відкриття нових. Цитокіни впливають на клітину, зв'язуючись зі специфічними рецепторами на мембрані цитоплазми та викликають каскадну реакцію, що веде до індукції, посилення або стримування активності ряду регульованих ними генів [4].

Цитокіни є найбільш універсальним класом внутрішньо- та міжтканинних регуляторних речовин. Вони представляють собою глікопротеїди, які в дуже низьких концентраціях впливають на реакції росту, проліферації та диференціювання клітин. Дія цитокінів обумовлена наявністю рецепторів до них на поверхні клітин-мішеней. Клітини різних тканин мають велику кількість рецепторів до різноманітних цитокінів (від 10 до 10000 на клітину), ефекти яких нерідко перекриваються, що забезпечує високу надійність функціонування цієї системи внутрішньоклітинної регуляції. Найбільш важливими закономірностями функціонування системи цитокінів є локальність дії та взаємодія її компонентів [5].

Для цитокінів характерний складний мережевий характер функціонування. Один цитокін може володіти декількома ефектами, декілька цитокінів – однаковими ефектами.

Наразі існує поділ факторів росту на дві великі групи. Перша група – це фактори з широким діапазоном клітинної та тканинної специфічності. Друга група факторів – це специфічні для певної групи клітин [6].

Ангіогенез регулюється численними «класичними» факторами, такими як фактор росту ендотелію судин (VEGF) і багатьма іншими ендогенними «некласичними» пептидами, включаючи еритропоетин (Еро) та гранулоцитарно-макрофагальний колонієстимулюючий фактор (GM-CSF). Останні відіграють важливу регуляторну роль в ангіогенезі, особливо в патологічних умовах, і являють собою поперечний зв'язок між ангіогенезом та гемопоезом. На початку ХХІ століття була сформульована гіпотеза, що загальний попередник – гемангіобласт дає початок клітинам як ендотеліальній, так і гемопоетичній лінії [7].

Взаємозв'язок між ендотеліальними та гемопоетичними клітинами вважається ознакою того, що загальний попередник, гемангіобласт, дає початок двом типам клітин у жовтковому мішку, початковій ділянці кровотворення та крові. Кровотворення регулюється кількома цитокінами та інтерлейкінами (IL) [8], що володіють плейотропною активністю, включаючи еритропоетин (Еро), гранулоцитарний колонієстимулюючий фактор (G-CSF), гранулоцитарно-макрофагальний колонієстимулюючий фактор (GM-CSF), IL-3, IL-4, IL-6 і IL-8 [9].

Рецептори G-CSF і GM-CSF були виявлені на поверхні ендотеліальних клітин. Відповідно, ендотеліальні клітини піддаються впливу ендотеліального фактора росту (VEGF), що проявляється через збільшення мРНК для декількох кровотворних факторів росту, включаючи G-CSF, GM-CSF, фактор стовбурових клітин та IL-6, які можуть діяти як фактори росту для мієлоїдних та лімфоїдних клітин. Таким чином, VEGF може відігравати важливу роль в рості гематологічних новоутворень через паракринний механізм. Фактори росту фібробластів (FGFs) позитивно регулюють кровотворення, впливаючи на стромальні клітини [9].

1.1.2. Будова та функції Multi-CSF. Із лінії гібонових Т-клітин було виділено клон кДНК, яка кодує CSF приматів [10]. Амінокислотна послідовність цього CSF має значну гомологію з послідовністю мишачого IL-3 або мульти-CSF. Рекombінантний білок, що експресується в клітинах COS-1,

виявляв широкий розподіл молекулярних частинок з розміром у діапазоні від 20000 до 26000 D, гетерогенність, яка характерна для невеликих глікопротеїнів. Попередні результати показують, що він підтримує проліферацію еритроїдних та мієлоїдних попередників кісткового мозку людини. кДНК гібона використовується для виділення гена людини, який також має значну гомологію з мишачим IL-3; обидва гени мають п'ять екзонів однакового розміру та розташування, а кодують райони людського та мишачого генів, гомологічних на 45 %. Ген локалізований у 5-й хромосомі. Білок, який кодується геном людини, відрізняється в 11 з 152 кодонів від послідовності гібона. Розбіжність послідовностей між щурячим, мишачим, гібоновим і людським IL-3 істотно більша, ніж розбіжність, що спостерігається серед інших генів CSF [11].

У той час як мишачий мульти-CSF або IL-3 впливає на плюрипотентні стовбурові клітини (PPSC), для його людського гомолога не було доведено, що він виконує цю роль, оскільки аналізи не були встановлені (рис. 1.1).

Гранулоцитарний колонієстимулюючий фактор (G-CSF) є гемопоетичним фактором росту, необхідним для проліферації та диференціювання гемопоетичних попередників нейтрофілів, і наразі використовується для подолання вродженої та набутої нейтропенії [12]. На додаток до збільшення числа нейтрофілів *in vivo* та модуляції функцій нейтрофілів, G-CSF може індукувати вироблення цитокінів, таких як фактор некрозу пухлин альфа (TNF- α) [13].

1.1.3. Загальний опис структури та особливостей G-CSF людини.

Загалом G-CSF людини продукується головним чином моноцитами та макрофагами [15], але також продукується фібробластами [16], ендотеліальними клітинами [17] та стромальними клітинами кісткового мозку [18]. Хоча у здорових людей експресуються низькі рівні білка G-CSF у сироватці, помітне підвищення вироблення G-CSF може бути викликано декількома запальними процесами, включаючи підвищену присутність прозапальних цитокінів та LPS під час інфекцій [19].

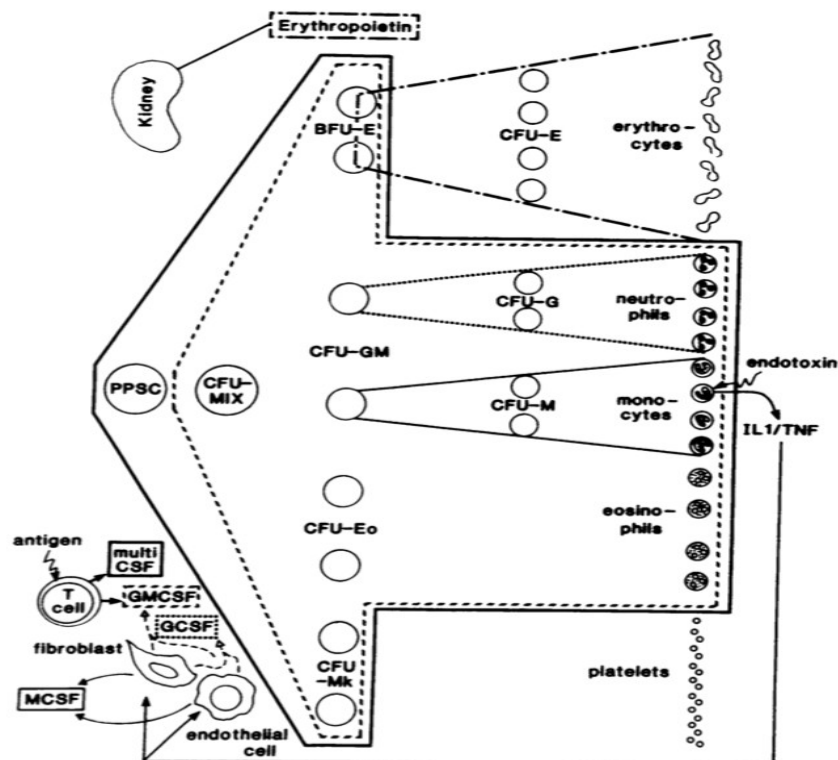


Рис. 1.1. Схематичне зображення основних спектрів біологічної активності 5 клонованих гемопоетичних факторів росту, позначені прямокутниками, прив'язаними до різних факторів. Адаптовано за [14].

Ефекти опосередковуються зв'язуванням G-CSF з його родинним рецептором G-CSFR на нейтрофілах та їх попередниках, активуючи нижчестоячі сигнальні каскади і тим самим впливаючи на подальшу експресію генів та клітинні імунні відповіді. У мишей, у яких відсутня передача сигналів G-CSF / G-CSFR (G-csf-дефіцитні або G-csfr-дефіцитні миші), спостерігається зниження кількості мієлоїдних попередників та порушення мобілізації нейтрофілів у кровообіг, що призводить до хронічної нейтропенії [20]. Це говорить про те, що G-CSF є основним регулятором розвитку нейтрофілів та сприяє регуляції функціонування мультипотентних гемопоетичних попередників [21]. У той же час, G-CSF також впливає на фенотип та функцію зрілих нейтрофілів і робить це, модулюючи експресію, наприклад, хемокінових рецепторів, посилюючи фагоцитоз та продукцію активних форм кисню (АФК)

та посилюючи бактерицидну активність нейтрофілів [22].

1.1.4. Макрофагальний колонієстимулюючий фактор (M-CSF).

Спочатку описаний як мікробіотичний фактор розвитку системи моноклеарних фагоцититів, також бере участь в імунологічних та запальних реакціях, метаболізмі кісток. Вся його біологічна активність опосередковується рецептором тирозинкінази (M-CSF-R), який кодується протоонкогеном *c-fms*. Автори зазначають, що різні ізоформи M-CSF (тобто розчинні, пов'язані з клітиною та закріплені в матриці форми) грають різні специфічні ролі на клітинах-мішенях, що несуть M-CSF-R на своїй поверхні. Згадуються інфекційні, запальні та пухлинні захворювання, в яких бере участь M-CSF і які можуть брати участь патологіях [23]. Ген M-CSF людини має розмір близько 21 тис. пар основ на короткому плечі хромосоми 1 в положенні p13 - p21.4. Він містить десять екзонів і дев'ять інтронів, кодуючі послідовності розташовані в перших восьми екзонах [24].

П'ять кДНК були клоновані зі зрілих альтернативних транскриптів (мРНК) розміром від 1,5 до 4,4 т.п.н. Ця неоднорідність обумовлена різними комбінаціями диференціального сплайсингу екзонів 6 і 3'-некодуючих ділянок (екзонів 9 і 10) гена M-CSF. 5' і 3' частини (загальні для всіх кДНК) екзона 6 кодують два сайти N-глікозилювання та трансмембранний домен, в той час як центральна частина з диференційованим сплайсингом кодує два сайти внутрішньоклітинного протеолітичного розщеплення, сайт додавання глікозаміноглікану, сайт O-глікозилювання та два інших сайти N-глікозилювання. Альтернативний сплайсинг некодуючих екзонів 9 або 10 модифікує стабільність зрілих мРНК. У поєднанні зі складними до- та посттрансляційними модифікаціями ці мРНК генерують різні зрілі ізоформи M-CSF: гомодимерний секреторний глікопротеїн M-CSF з молекулярною масою 85 кДа; гомодимерні або гетеродимерні протеоглікани M-CSF (PG-M-CSF) з масою до 150 кДа; гомодимерний глікопротеїн, асоційований із клітинною поверхнею, повільно вивільняється у вигляді розчинної молекули з молекулярною масою 44 кДа. Ці ізоформи, ймовірно, розрізняються за своїми

ділянками, які відповідають за регуляцію синтезу продуктів [23].

1.1.5. Основні характеристики еритропоезу та роль еритропоєтину, як фактора росту. У людей та інших ссавців еритропоез зазвичай протікає з низькою швидкістю, замінюючи старіючі еритроцити молодими ретикулоцитами. У людей продукція еритроцитів може бути збільшена у 8 разів у порівнянні з вихідним рівнем у різних клінічних умовах, включаючи крововилив, гемоліз та інші види стресу, які погіршують оксигенацію артеріальної крові або доставку кисню до тканин. Еро є первинним і, ймовірно, єдиним медіатором гіпоксичної індукції еритропоезу. Під час розвитку плоду Еро виробляється головним чином у печінці. Однак, після народження близько 80 % за виробництво Еро відбувається у нирках (рис. 1.2). Розуміючи, що нирковий кортикальний кровотік відповідає за споживання кисню, було висунуто припущення, що проксимальні каналці є ідеальним місцем для виробництва Еро. У печінці Еро продукується як в гепатоцитах, так і в інтерстиціальних клітинах. Як у гепатоцитів, так і в ниркових фібробластах експресія Еро *in situ* корелює з експресією екто-5-нуклеотидази, ймовірно, тому, що цей фермент також контролюється локальним натягом кисню [25].

Молекулярне клонування гена Еро відразу призвело до високого рівня виробництва рекомбінантного людського еритропоєтину (rhЕро) в клітинній культурі з достатньою чистотою і кількістю як для наукового дослідження, так і для розвитку терапії. РНК-месенджер людини (мРНК) кодує поліпептид з 193 залишків. Було показано, що первинна структура rhЕро ідентична структурі ендогенного гормону, за винятком посттрансляційно розщепленого аргініну на карбоксильних кінцях *in vivo*. Ендогенні Еро і rhЕро мають близько 40 % вуглеводів дуже схожої структури, що складається з трьох N-пов'язаних полісахаридних груп і однієї O-зв'язаної групи. Глікозилювання Еро злегка перешкоджає його біологічній активності, але важливе для забезпечення тривалої циркуляції в плазмі.

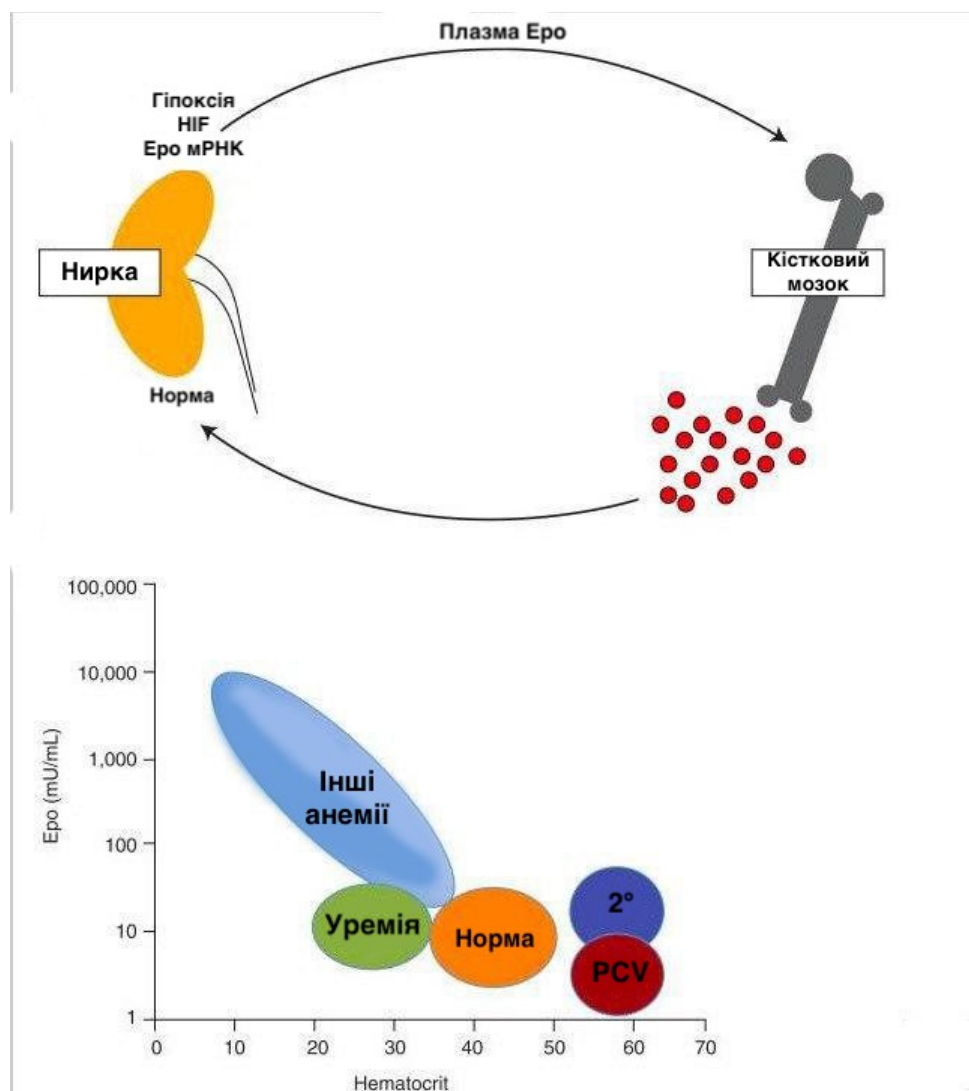


Рис. 1.2. Схематичне зображення регулювання продукції еритроцитів за допомогою Еро. А — зниження доставки кисню до спеціалізованих клітин в нирках призводить до збільшення експресії і секреції Еро, який циркулює в плазмі і стимулює попередники кісткового мозку, тим самим збільшуючи вироблення еритроцитів. Якщо збільшення кількості еритроцитів послаблює гіпоксичний сигнал, експресія Еро знижується. Б — рівні Еро в плазмі у пацієнтів з різними типами і ступенями анемії і у пацієнтів з первинним еритроцитозом і вторинним еритроцитозом. Адаптовано за [25].

Виходячи з його первинної структури, було передбачено, що Еро, як і інші гемопоетичні цитокіни, складається в глобулярну тривимірну структуру (рис. 1.3), що складається з пучка чотирьох амфіпатичних α -спіралей, з'єднаних

петлями, які не мають вторинної структури, і стабілізується критичним дисульфідним містком.

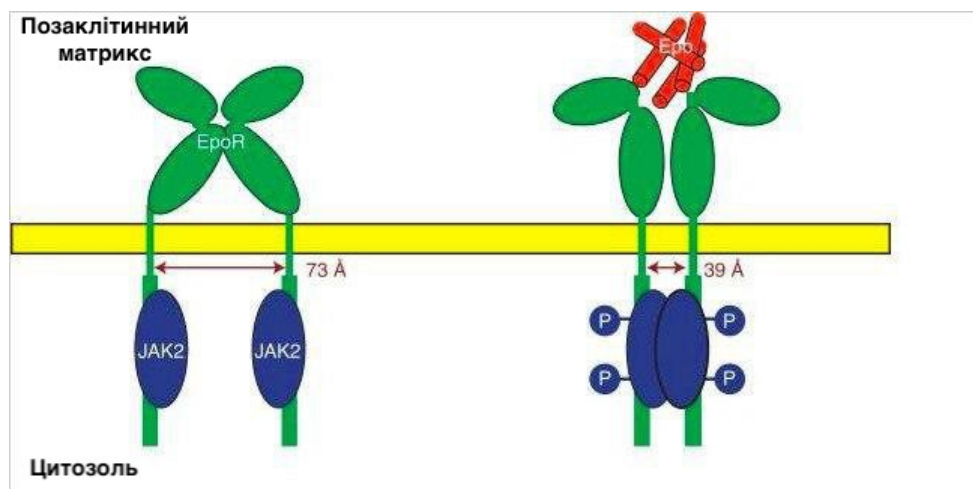


Рис. 1.3. Схематичне зображення Еро-залежного шляху сигналіngu. Адаптовано за [25].

Еро циркулює в плазмі з періодом напіврозпаду в $\sim 7-8$ годин та зв'язується з високоафінними (~ 100 пМ) рецепторами, присутніми у відносно невеликих кількостях (~ 1000 / клітина) на поверхні еритроїдних клітин-попередників (КУО) в кістковому мозку [25].

1.2. Культура гемопоетичних клітин як модель дослідження гемопоезу *ex vivo*

1.2.1. Стромальне мікрооточення. Починаючи з 20-го тижня гестації і до кінця життя єдиним органом кровотворення у людини є кістковий мозок. Він розташовується у губчастих (плоских) кістках скелета та в епіфізах трубчатих кісток. Кровотворний, або червоний, кістковий мозок відрізняється високою васкуляризацією. Його судинна мережа утворюється з двох джерел: центральної приносячої артерії кістки та множинних періостальних та м'язових артерій, які пронизують зовнішню пластинку кістки. Кінцеві капіляри цих двох судинних систем, з'єднуючись, утворюють кістковомозкові синуси (рис. 1.4)

[26]. Кровотворення відбувається на кісткомозкових балках поза межами судинних синусів. Для проникнення у кровотік зрілі клітини крові долають стінку кісткомозкового синусу, що слугує бар'єром між кістковим мозком та циркуляторним руслом [26].

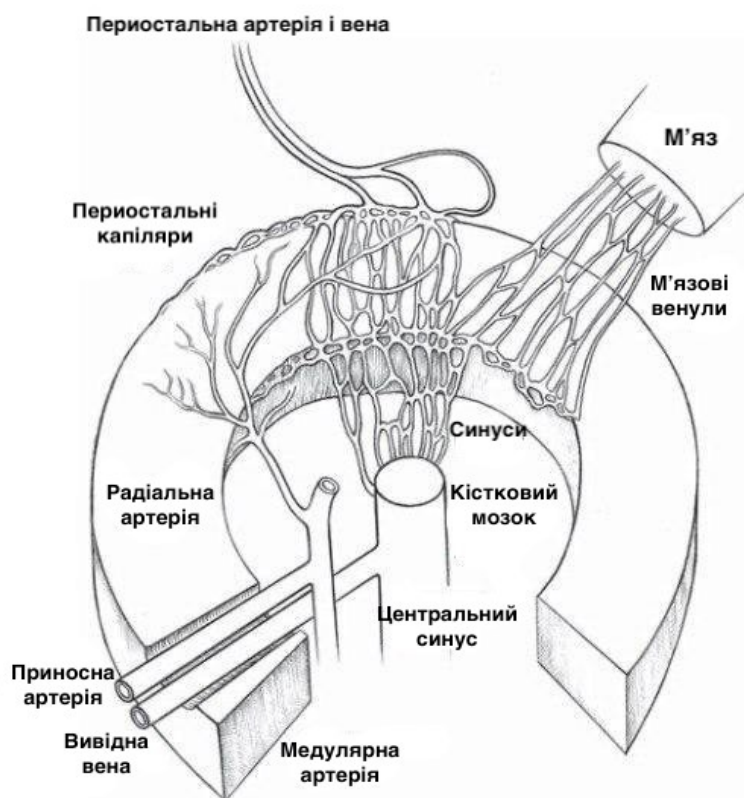


Рис. 1.4. Схематичне зображення кровопостачання червоного кісткового мозку. Адаптовано за [26].

Цей ефект забезпечується стромальним мікрооточенням червоного кісткового мозку. Строма кісткового мозку — це шар кісткомозкових балок, на яких розташовуються островці кровотворних клітин. Строма складається з клітин (фібробласти, жирові клітини, макрофаги та ендотеліальні клітини) та екстрацелюлярного матриксу — продуктів екскреції клітин стромы (фібронектин, колаген, тромбосподин, вітронектин, ламінін та глікозаміноглікани) (рис. 1.5) [26].

Матрикс забезпечує специфічне «прилипання» стовбурових кровотворних клітин. Стромальні клітини виділяють велику кількість специфічних регулюючих факторів, включаючи фактори росту, без яких

неможливі проліферація стовбурових клітин, диференціювання та функціонування їхніх нащадків [27]. Продукція факторів росту клітинами строми та їх взаємодія у цьому процесі схематично представлені на рис. 1.6 [26].

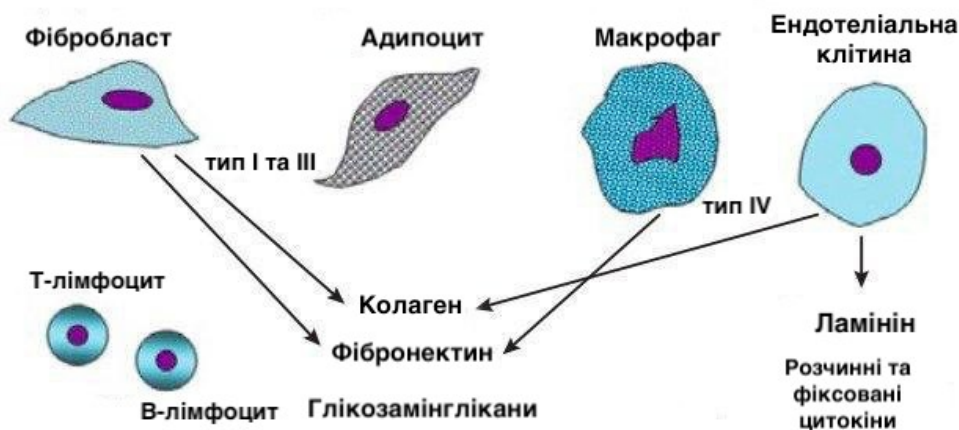


Рис. 1.5. Зображення вмісту стромального мікрооточення. Адаптовано за [26].

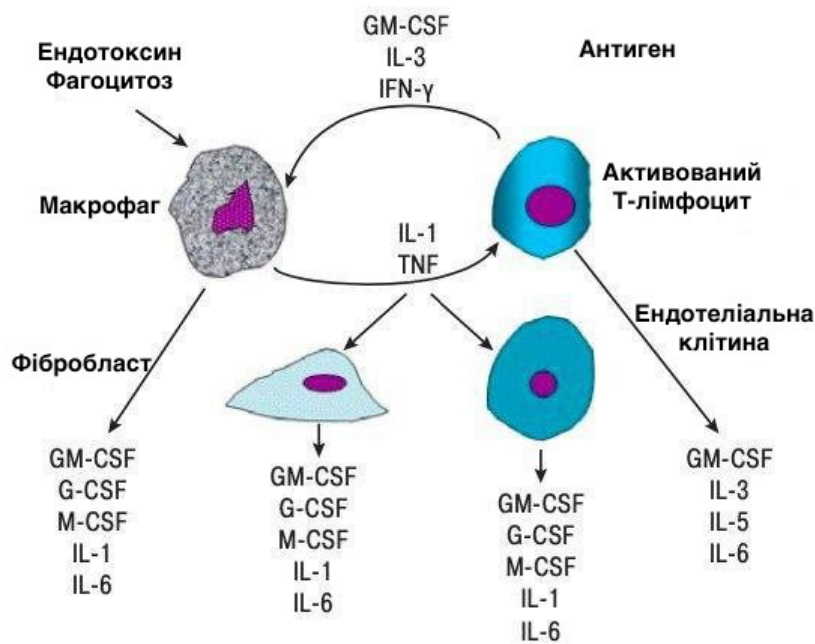


Рис. 1.6. Схематичне зображення продукції факторів росту клітинами строми кісткового мозку G-CSF — гранулоцитарний колонієстимулюючий фактор; IL — інтерлейкіни; $\text{INF}\gamma$ — інтерферон- γ ; M-CSF — макрофагальний колонієстимулюючий фактор; TNF — фактор некрозу пухлин. Адаптовано за [26].

За однією версією індуктивна функція стромального мікрооточення

забезпечується клітинною кооперацією складових його елементів. За іншою — провідна роль у цьому належить фібробластам. Незважаючи на відмінність в існуючих точках зору, очевидно, що для підтримки кровотворення як *ex vivo*, так і в організмі людини необхідне повноцінне стромальне мікрооточення. Тривале кровотворення у культурі можливе тільки на попередньо сформованій основі, що складається з перелічених вище елементів стромального мікрооточення. Потрібно відзначити, що пухлинні клітини позбавлені цього “відчуття”, для їх існування не потрібне специфічне стромальне мікрооточення, що і лежить в основі здатності пухлинних клітин до метастазування [28].

1.2.2. Моделювання специфічного мікрооточення для експансії гемопоетичних стовбурових та клітин-попередників пуповинної крові *ex vivo*. Варто зазначити, що перші етапи вивчення гемопоетичних стовбурових клітин дорослого організму були пов'язані зі створенням природного мікрооточення [29]. Так, початкові спроби культивування клітин у суспензійних гемопоетичних культурах показували швидке згасання гемопоезу та заміщення гемопоетичних клітин на макрофаги. Використання системи культивування, що містить підкладку з клітин кісткового мозку, дозволило отримати культуру, яка містить кровотворні попередники, що мають властивості гемопоетичних стовбурових клітин інтактного кісткового мозку [30]. Подальші дослідження були спрямовані на створення різних модифікацій та удосконалень даної системи культивування.

Співкультивування разом із стромальними фідерними клітинами є більш фізіологічною альтернативою використанню рекомбінантних цитокінів, яке застосовувалося з самого початку вивчення кісткомозкових гемопоетичних клітин [29]. Наразі активно проводиться пошук нових ліній клітин, які підтримують експансію *in vitro* гемопоетичних стовбурових та прогеніторних клітин (ГСПК) при співкультивуванні [31]. Спільне культивування гемопоетичних попередників з різними типами клітин, які виявляють фідерні властивості по відношенню до них, не тільки може бути застосовано для експансії малодиференційних попередників з метою їх клінічного

використання, але також дозволяє досліджувати взаємовідносини клітин в межах кровотворної ніші.

Традиційним і найбільш практичним підходом є використання мезенхімальних стромальних клітин в якості фідерного шару для експансії ГСПК *in vitro* [32]. Крім того, що МСК проявляють фідерні властивості по відношенню до гемопоетичних клітин, вони мають високу проліферативну активність, а також більш доступні, ніж інші типи фідерних клітин людини (наприклад, дуктальні епітеліоцити або спленоцити) [33]. Показано, що стромальні клітини кісткового мозку в декстерівських культурах можуть підтримувати кровотворення *in vitro* більше 6 місяців [29]. Деякі дослідники використовують МСК після спрямованого диференціювання в остеобласти, створюючи таким чином копію ендостальної ніші [34].

МСК та більш диференційовані стромальні клітини секретують різні цитокіни [35]. Практично вся інформація про продукцію цитокінів МСК людини отримана на культурі клітин, тому як саме кожен цитокін залучений в паракринну регуляцію *in vivo*, з упевненістю сказати не можна. Проте показано, що МСК продукують велику кількість цитокінів, що підтримують ГСПК у стані спокою або сприяють їх самовідновленню, зокрема SCF, лейкоїє-інгібуючий фактор, фактор стромальних клітин 1 (SDF-1), онкостатин М, морфогенетичний білок кісток-4, ліганд Flt-3, TGF- β , IL-1, -6, -7, -8, -11, -12, -14, -15 [36]. Крім того, при додаванні в середовище культивування IL-1 α МСК можуть продукувати такі фактори росту, як GM-CSF і G-CSF, що впливають на більш зрілі гемопоетичні попередники, що свідчить про взаємну регуляцію МСК і гемопоетичних клітин [37].

Дослідники, моделюючи *in vitro* умови кісткомозкової ніші, використовують МСК з різних джерел [38]. Між МСК з різних джерел існують деякі відмінності, що стосуються експресії ряду маркерів, здатності до проліферації та диференціювання, але в цілому їх характеристики подібні [39].

Відомо, що МСК зі стромально-васкулярної фракції жирової тканини людини здатні підтримувати гемопоез *in vitro*. Тому вони представляють

альтернативу МСК з кісткового мозку та є легкодоступним джерелом фідерних клітин для експансії ГСПК пуповинної крові з метою масштабного клінічного використання [40].

McNiese та співавт. розробили протокол культивування ГСПК, згідно з яким 14-денна експансія клітин ПК забезпечується спільним їх культивуванням з МСК з кісткового мозку у присутності гемопоетичних цитокінів протягом 7 діб, а також культивуванням протягом 7 діб в присутності тільки цитокінів. За допомогою даної методики вдалося істотно скоротити час відновлення нейтрофілів і тромбоцитів після трансплантації 2 мл пуповинної крові, одна з яких була збагачена ГСПК з використанням описаного протоколу. Таким чином, застосування фідерних шарів для експансії ГСПК ПК дозволяє обмежити використання екзогенних факторів росту без зниження ефективності ампліфікації клітин [41].

Вміст кисню у тканинах — один з основних неклітинних факторів кровотворного мікрооточення, що беруть участь у регуляції розвитку гемопоетичних клітин. У кістковому мозку вміст кисню варіює від 1 до 6 %, при цьому в області гіпоксії знаходяться ГСПК у стані спокою, тоді як в місцях з більш високим вмістом кисню — ГСПК у стані проліферації. Низький парціальний тиск кисню грає важливу роль у підтримці тих чи інших фізіологічних властивостей гемопоетичних клітин, що є важливим при вивченні взаємодії гемопоетичних та стромальних клітин *in vitro*, а також має обов'язково враховуватися при розробці протоколів ампліфікації клітин ПК [42].

Відомо, що низький вміст кисню значно впливає на гемопоетичні клітини *in vitro*, їх здатність до колонієутворення, стійкість до опромінення та потенціал до відновлення гемопоезу у летально опромінених тварин. Крім того, низький парціальний тиск кисню сприяє підтримці життєздатності та проліферації малодиференційованих гемопоетичних клітин у порівнянні з комітованими попередниками [43].

Проте, варіювання вмісту кисню у поєднанні з різними комбінаціями

цитокінів дозволяє ампліфікувати клітини ПК з різними властивостями. Так, групою дослідників під керівництвом Ivanović було показано, що при 3 % кисню у присутності SCF, G-CSF, TPO і IL-3 забезпечується одночасно підтримання примітивних гемопоетичних клітин, здатних відновлювати кровотворення у опромінених тварин при трансплантації, та експансія комітованих попередників (КУО). Показано також, що культивування збагаченої CD133 + клітинами фракції ПК з додаванням рекомбінантних цитокінів SCF, Flt-3, TPO, IL-6, IL-3 у присутності 5 % кисню дозволяє збільшити кількість CD34 + CD38- клітин майже у 27 разів (незалежно від присутності сироватки в середовищі), що значно ($P < 0.01$) вище, ніж при стандартному вмісті кисню. Серед клітин, ампліфікованих в умовах зниженого вмісту кисню, був високий вміст КУО з мієлоїдним потенціалом, а також вища здатність до відновлення гемопоезу при трансплантації опроміненим тваринам. Показано, що знижений вміст кисню індукує в гемопоетичних клітинах експресію генів HIF-1 α , VEGF та ABCG2, а також активує експресію СХС рецептора хемокінів 4 (CXCR4) [44].

У роботі Tursky та співавт. культивування клітин ПК при 10 % кисню з додаванням цитокінів (TPO, SCF, Flt-3 ліганду та IL-6) призводило до більшої експансії ГСПК, ніж при використанні найбільш поширеного протоколу культивування клітин ПК (20 % кисню, TPO, SCF і G-CSF) [45].

Із залежністю від вмісту кисню пов'язана одна важлива особливість гемопоетичних клітин — займати певні «ніші» при співкультивуванні із стромальними клітинами. Ще у 1977 році в роботах Dexter та співавт. було описано розподіл гемопоетичних клітин у таких співкультурах: частина гемопоетичних попередників знаходиться в суспензії над підшаром, частина адгезується до поверхні підшару, а деякі клітини мігрують у субстромальний простір (рис. 1.7 А). При тривалому співкультивуванні утворюються ділянки активної проліферації гемопоетичних клітин, які виявляються за допомогою фазово-контрастної мікроскопії та візуально представляють щільні скупчення клітин, що розташовуються під шаром МСК (рис. 1.7 Б) [46].

Просторова організація гемопоетичних клітин у спільній культурі порівнянна з їх розподілом у кістковому мозку: клітини в залежності від стану спокою / активної проліферації розташовуються у районах з різним вмістом кисню та доступністю поживних речовин. Так, фракція клітин, адгезуючих на поверхню МСК, містила найбільшу частку активно проліферуючих клітин. У порівнянні з іншими фракціями гемопоетичних попередників у співкультурі клітини, що мігрували під стромальний моношар, діляться рідко та зберігають незрілий фенотип CD34 + CD38-. З огляду на особливості гемопоетичних клітин займати певне положення у співкультурі в залежності від проліферативного потенціалу, можна фракціонувати клітини за їхньою здатністю до адгезії і виділяти популяції клітин з певними властивостями (рис. 1.8) [47].

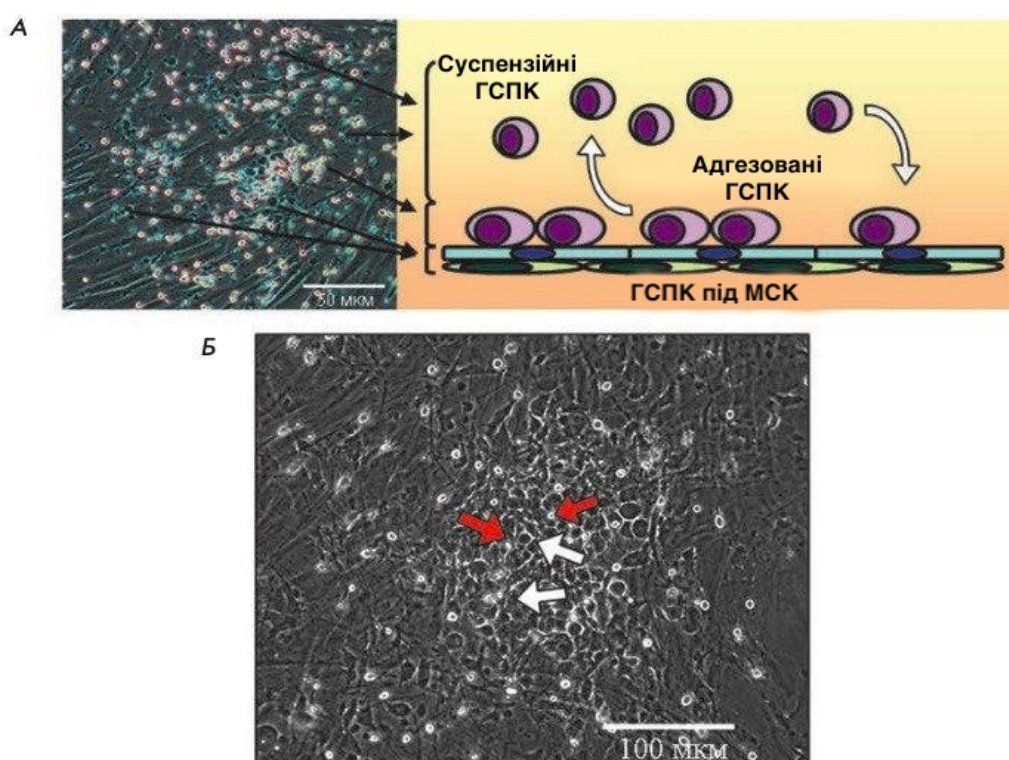


Рис. 1.7. Культивування мононуклеарних клітин пуповинної крові на підшарі МСК: А — зображення співкультури та графічне зображення розподілу у ній гемопоетичних клітин; Б — ділянки активної проліферації (білим позначено ГСПК, адгезовані до поверхні МСК, червоним позначено ГСПК, що розташовані під МСК). Адаптовано за [48].

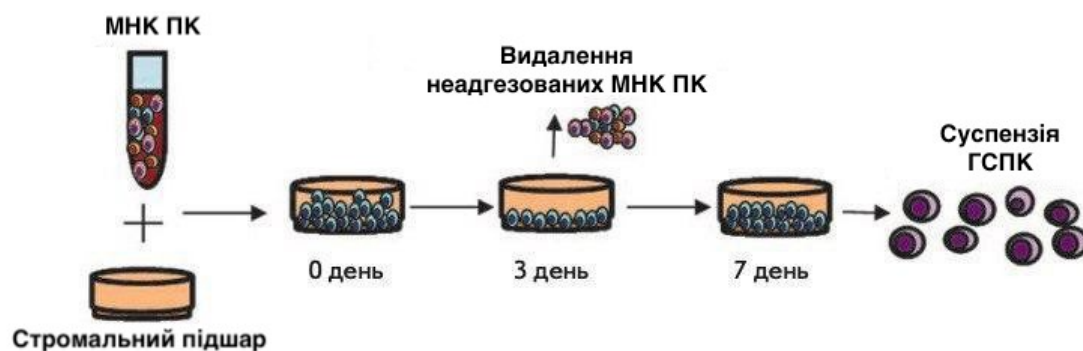


Рис. 1.8. Схема культивування моноклеарних клітин пуповинної крові на стромальному підшарі [48].

Таким чином, для створення ефективних та контрольованих методичних підходів, що забезпечують отримання великої кількості гемопоетичних стовбурових та клітин-попередників для трансплантації, необхідно враховувати особливості мікрооточення кровотворної ніші, в тому числі вміст кисню.

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА

РОЗДІЛ 2

ОБ'ЄКТ, МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1. Об'єкт дослідження

Об'єктом дослідження була суспензія гемопоетичних клітин-попередників ссавців та колонії клітин, отримані в умовах культивування *in vitro*. Джерелом клітин слугував кістковий мозок мишей лінії СВА та щурів Wistar. Крім того, було проведене дослідження із використанням кісткового мозку людини.

Стовбурові клітини кісткового мозку локалізуються безпосередньо на кістковій поверхні, клітини-попередники – ближче до центральної венозної пазухи. Функціональна одиниця кісткового мозку має назву “сфероїд” та представлена адипоцитами, клітинами строми і макрофагами. Ці ретикулярні клітини формують мікрооточення для розвитку клітин-попередників, яке отримало назву “гематон”. Нові клітини-попередники продукуються зі стовбурових клітин при взаємодії стовбурових клітин і клітин строми. Після отримання відповідних стимулів для дозрівання відбуваються проліферація та диференціювання клітин, що завершуються міграцією більшості зрілих клітин із кісткового мозку. Гемопоез регулюється за допомогою численних цитокінів та експресії адгезивних молекул на клітинах-попередниках та клітинах строми.

Гемопоетичні стовбурові клітини (ГСК) дають початок усім іншим клітинам крові та походять від гемангіобластів та прегемангіобластів, а ті, у свою чергу – від клітин первинної ембріональної мезодерми. ГСК розташовуються у червоному кістковому мозку.

Плюрипотентні гемопоетичні стовбурові клітини (гемоцитобласти) дають початок як мієлоїдним клітинам (моноцити та макрофаги, три різновиди

гранулоцитів – нейтрофіли, базофіли та еозинофіли, а також еритроцити, мегакаріоцити / тромбоцити, міелоїдні дендритні клітини), так і лімфатичним клітинам (Т-лімфоцити, В лімфоцити, НК-лімфоцити, лімфоїдні дендритні клітини) [5].

2.2. Реактиви, матеріали та обладнання

2.2.1. Витратні матеріали:

- ємності для дезінфекції;
- дезрозчин (“Regent Medical”, Великобританія);
- спиртові серветки;
- пробірки;
- нестерильні пастерівські піпетки;
- пластикові насадки для автоматичних піпеток;
- стерильні пеніцилінові флакони;
- гумові корки для пеніцилінових флаконів;
- предметні скельця (“АРТАСА”, Італія);
- нестерильні рукавички;
- дистильована вода;
- фільтрувальний папір;
- мийний засіб для скелець (“Regent Medical”, Великобританія);
- шприци на 1, 5, 10 мл (“Terumo”, Бельгія);
- голки для шприців різного діаметру (“Microlance”, Іспанія);
- стерильні чашки Петрі (“Termo”, США);
- камера Горяєва;
- дифузійні камери;
- стерильні 24-лункові планшети (“Termo”, США);
- підстилка у вигляді маленьких чіпів деревини широколистих порід дерев;

- корм для лабораторних тварин (ПП “РЕЗОН-1”, Україна).

2.2.2. Реактиви:

- барвник Гімза (“ACROS ORGANICS”, США);
- імерсійна олія (“Gardall”, США);
- барвник Май-Грюнвальд (“ACROS ORGANICS”, США);
- лимонна кислота;
- перекис водню 3 % (“Віола”, Україна);
- мідний купорос (“Bayer”, Німеччина);
- натрію хлорид (“Дарниця”, Україна);
- пеніцилін (“Arterium”, Україна);
- стрептоміцин (“Arterium”, Україна);
- вода для ін'єкцій (“Дарниця”, Україна);
- фактор росту (GM-CSF), (“Sigma”, США);
- агар-агар (“Sigma”, США);
- середовище MEM у модифікації Дульбекко (DMEM), (“GIBCO”, США);
- FBS (fetal bovine serum) 9 % (“Medicago”, Швеція);
- етиловий спирт 96 % (“Біолік”, Україна);
- етиловий спирт 70 %.

2.2.3. Лабораторний посуд:

- склянки для миття скелець;
- скляні банки з кришками для розчинів;
- вимірювальні циліндри;
- скляні стакани для розчину барвника Романовського-Гімза;
- флакони для води;
- леза для скальпелів (“Swann-Morton”, Великобританія);
- хірургічні ножиці;
- пінцети;
- затискачі;

- тримачі скелець.

2.2.4. Обладнання:

- ваги (“SARTORIUS”, Німеччина);
- автоклав (“Labcaire”, Великобританія);
- термостат (“JP Selecta”, Іспанія);
- морозильна камера (“Nova Scotia”, Канада);
- витяжна шафа (“Labcaire”, Великобританія);
- ламінарний бокс (“Inter Med”, США);
- бактерицидні лампи (“Медпромсервіс”, Україна);
- цитоцентрифуга (“Shandon”, Великобританія);
- холодильник (“Атлант”, Україна);
- світловий мікроскоп (“LEICA”, Німеччина);
- автоматичні мікропіпетки (“Termo”, США);
- камера для світлового мікроскопа (“Canon”, Японія);
- інвертований мікроскоп (“OLYMPUS”, Японія);
- таймер;
- лічильник лабораторний СЛ-1 (Україна);
- операційні столики;
- клітки для лабораторних тварин.

2.3. Отримання кісткового мозку досліджуваних видів ссавців

2.3.1. Виділення клітин кісткового мозку миші та щура. Виділення клітин кісткового мозку проводили за загальною методикою у нашій модифікації. Джерелом клітин у лабораторних тварин є стегнова, плечова та гомілкорова кістки. Вибір тварин для експерименту залежить від поставлених завдань експериментатора. Найчастіше використовують лінійних лабораторних тварин, яких отримують шляхом імбридингу. В експерименті використовували мишей лінії СВА, статевозрілих самців вагою 30 – 32 г, а також щурів Wistar,

статево зрілих самців вагою 450 – 480 г.

При проведенні досліджень дотримувались міжнародних правил та принципів Європейської конвенції «Про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментів та інших наукових цілях» (Страсбург, 1986), і «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах» (Київ, 2001) та Закону України № 3447 «Про захист тварин від жорстокого поводження» IV від 21.02.2006 р. [49, 50].

Евтаназію тварин проводили методом цервікальної дислокації спинного мозку у шийному відділі. Після цього поміщали тушку тварини в ємність із 3 % розчином пероксиду водню на кілька хвилин для знезараження шкіри та хвоста. Тушку висушували за допомогою нестерильної марлі та поміщали в іншу ємність із 70 % розчином етилового спирту на кілька хвилин для знезараження шкіри, хутра та хвоста (зазначені маніпуляції можна проводити у нестерильних умовах). Далі робили розріз на шкірі в нижній третині живота по середній лінії, акуратно, щоб не пошкодити очеревину, продовжуючи розріз по середній лінії стегна вниз до стопи.

Для акуратного відділення шкіри від тканин, робився круговий надріз в районі таза, після чого відділяли шкіру, відтягнувши її в напрямку таз-стопа. Для виділення комплексу задніх кінцівок в області вертлюжної западини робився надріз, таким чином, щоб тазостегновий суглоб залишався інтактним. У середині стопи робився круговий надріз, що дозволяло відокремити шкірний клапоть. При цьому гомілковостопний суглоб залишався цілий.

Після виділення комплекс кісток нижніх кінцівок переносили у першу із трьох чашок Петрі діаметром 60 мм (перша та друга нестерильні, третя – стерильна). Акуратно, використовуючи новий стерильний комплект ножиці та пінцет, відокремлювали м'язи від кісток та відрізали суглоб, не пошкодивши епіфізи кістки. Після цього гомілкову кістку промивали кілька разів у фізіологічному розчині з додаванням антибіотиків пеніциліну та стрептоміцину. Після промивання кістки у першій чашці Петрі поміщали кістку у другу нестерильну чашку Петрі та повторно промивали у розчині з

антибіотиками. У цій же чашці Петрі проводили транспортування кістки до ламінарного бокса, де за дотриманням умов асептики перекладали кістку у третю стерильну чашку Петрі. Наступні маніпуляції та очищення кістки проводили в асептичних умовах.

2.3.2. Виділення клітин кісткового мозку людини. Донорами кісткового мозку виступали умовно здорові особи, що проходили планове лікування в ДУ «Інститут травматології та ортопедії НАМН України». Кістковий мозок надавали у вигляді суспензії клітин у стерильних пластикових гепаринізованих пробірках. Дослідження виконувались згідно з загальноприйнятими етичними нормами та принципами, визнаними Гельсінською декларацією Всесвітньої Медичної Асоціації, яка передбачає інформовану згоду донорів на участь у наукових дослідженнях.

Досліджуваним матеріалом людини виступав кістковий мозок з фрагментів ребер 6 гематологічно здорових осіб, котрі перенесли операцію на грудній клітці. Із цих випадків у 5 використовувався стернальний пунктат.

Із зразків кісткового мозку готували суспензію кістково-мозкових клітин. Клітини вимивали з фрагментів ребер та здійснювали розділення у градієнті щільності Histopaque. Для цього суспензію клітин кісткового мозку в обсязі 1 мл змішували із 3 мл розчину PBS. Отриману суміш обережно нашаровували на 3 мл розчину Histopaque (під кутом 45°) у центрифужній пробірці. Здійснювали центрифугування протягом 30 хв. при 1500 об./хв. Результатом центрифугування було розділення гемопоетичних клітин. Після цього вилучали моноклеари та тричі відмивали центрифугуванням у 10 мл PBS протягом 10 хв. при 1000 об./хв. Після цього клітини змішували із живильним середовищем та проводили культивування за умов *in vitro*.

2.4. Оцінка життєздатності та підрахунок кількості кровотворних клітин

Для отримання суспензії моноклеарів кісткового мозку у стерильний

пеніциліновий флакон за допомогою шприца на 1 мл вносили поживне середовище типу DMEM, із 9 % FBS, 1 % L-глутаміну (2мМ) та антибіотики: пеніцилін та стрептоміцин. Новим стерильним набором, тримаючи кістку за діафіз, обережно відрізали епіфізи.

Тримаючи кістку у вертикальному положенні над пеніциліновим флаконом, за допомогою шприца з голкою великого діаметра вставляли голку у кістковомозковий канал, але не глибоко та обережно, щоб не пошкодити кістку. Злегка підтягували поршень шприца трохи вгору, щоб створити вакуум всередині каналу для більш легкого виділення клітин. Після цього над пеніциліновим флаконом починали повільно промивати кістковомозковий канал з двох сторін до повного видалення клітин з каналу (при цьому кістка ставала білою і злегка прозорою). Потім двічі змінювали голки меншого діаметру та ресуспендували отриману суспензію кілька разів. Далі відбирали 100 мкл суспензії та вносили в інший пеніциліновий флакон та додавали 900 мкл середовища.

Таким чином, нами було отримано суспензію, розведену у 10 разів. Після цього, для підрахунку кількості кровотворних клітин, за допомогою автоматичної піпетки відбирали 10 мкл суспензії та вносили у камеру Горяєва. Підрахунок кількості клітин проводили за допомогою інвертованого мікроскопа у 5 квадратах по діагоналі.

Далі робили розрахунок за формулою:

$$X \cdot 5 \cdot 1000 \cdot 10$$

X – отримана кількість клітин;

5 – перерахунок на 25 квадратів;

1000 – початковий об'єм середовища (1 мл);

10 – кількість розведень.

Після завершення роботи з концентрованою суспензією, пеніциліновий флакон залишали при 0 °С, при температурі танучого льоду.

2.5. Приготування суспензії та культивування клітин кісткового мозку *in vitro*

Перед приготуванням суспензії для подальшого культивування проводили розрахунки кількості клітин для постановки експерименту у 24-лунковому планшеті. В одну лунку, об'ємом 500 мкл, вміщується суспензія наступного складу: поживне середовище типу DMEM, із 9 % FBS, 1 % L-глутаміну (2мМ) та з антибіотиками пеніциліном і стрептоміцином; ростовий фактор (GM-CSF) у концентраціях 20 та 50 нг/мл; агар у концентрації 0,33 %; початкова суспензія з клітин. Для достовірності отриманих результатів дослідження проводили у 3 повторах, тобто використовували 3 лунки. Таким чином, розрахунок проводили на 4 лунки, щоб запобігти недостатці суспензії. Розраховану кількість суспензії розкапували у 3 лунки планшета. У пусті лунки вносили по 50 мкл фізіологічно розчину для створення мікроклімату. Культивування клітин кісткового мозку відбувалось у термостаті протягом 8 діб при 5 % вуглекислого газу, абсолютній вологості, 37 °С.

2.6. Оцінка результатів культивування кровотворних клітин *in vitro*

Аналіз результатів культивування кровотворних клітин проводили за допомогою інвертованого мікроскопа.

Шукали та підраховували 3 види колоній – компактні, компактні з “вінчиком” (змішані) та дифузні. За колонію приймали структури, що містили більше 40 клітин. Клітинні агрегати, які складаються з 20 – 40 клітин, вважали великими кластерами, а від 3 до 20 клітин – малими кластерами.

2.7. Приготування препаратів гемопоетичних клітин

2.7.1. Приготування препаратів клітин, культивованих *in vitro* (pick-up).

Цей метод дозволив нам більш детально дослідити клітини однієї колонії,

використовуючи світловий мікроскоп. Спочатку під інвертованим мікроскопом обрали колонію (більше 40 клітин) нормальної форми. За допомогою ліхтарика освітили низ культурального планшета та, використовуючи автоматичну піпетку, вилучали колонію. Потім її переносили на заздалегідь підготовлене предметне скло та розподіляли по всій площі. Забарвлювали за Паппенгеймом та досліджували під світловим мікроскопом.

2.7.2. Приготування цитоцентрифужних препаратів клітин кісткового мозку. Метод приготування цитоцентрифужних препаратів дозволив нам провести якісний аналіз досліджуваних клітин. Для цього, нами було використано залишки суспензії для культивування *in vitro* з відомою кількістю клітин. Препарати кісткового мозку отримували за допомогою центрифугування на цитоцентрифузі протягом 1 хв., при 500 об/хв. Під час використання спеціальних кювет для цитоцентрифуги клітинний матеріал розпластувався на предметному склі у фіксованому колі діаметром близько 5 мм. Далі препарати висушували на повітрі, забарвлювали за Паппенгеймом та мікроскопіювали.

2.7.3. Приготування препаратів клітин периферійної крові лабораторних тварин. Мазки крові робили на предметних скельцях з використанням більш широкого шліфованого предметного скла. Перед початком роботи скло витримували у мильному розчині протягом 1 год. Далі ретельно промивали та висушували. Скельця зберігали у спеціальній коробці. Перед початком експерименту знежирювали необхідну кількість скелець 70 % етиловим спиртом.

Нами було проведено забір периферійної крові мишей та щурів за допомогою видалення кінчика хвоста. Процедура виконувалась шляхом підрізання (ампутації) кінчика хвоста довжиною не більше 1 мм (у мишей) або 2 мм (у щурів). Попередньо, хвіст обробляли марлею, змоченою розчином 70 % етилового спирту. Отримані проби крові мали різну якість та могли забруднюватися тканинними елементами. Якість зразків знижується при збільшенні часу кровотечі або при спробах “видіти” з хвоста більше крові.

Об'єм крові, який отримували цим методом – невеликий. При підрізанні хвоста необхідно вирішити питання про анестезію / аналгезію. Далі, взявши предметне скло за довгі краї, торкалися його поверхнею (відступивши 1 см від вузького краю) до краплі крові. Потім предметне скло рукою тримали на столі за вузькі краї. Правою рукою приставляли шліфоване скло вузьким краєм до скла з кров'ю зліва від краплі під кутом 45° та просували його вправо до зіткнення з кров'ю. Чекали поки кров розпливеться по всьому ребру шліфованого скла, а потім легким швидким рухом вели його справа наліво, поки не вичерпалась вся кров. Мазки висушували на повітрі та маркували. Висохлий мазок був рівномірно тонким, рожевого кольору. Густо-рожеві або червоні мазки непридатні для дослідження, оскільки вони товсті та при цьому неможливо розрізнити клітини. Наступним етапом було забарвлення отриманих препаратів та дослідження під світловим мікроскопом.

2.8. Забарвлення препаратів

2.8.1. Методика забарвлення препаратів за Паппенгеймом. Для забарвлення мазків периферійної крові, ріск-ур та цитоцентрифужних препаратів нами був використаний один метод, так званий за Паппенгеймом. Всі етапи проведення забарвлення виконувались виключно під витяжною шафою. Після висушування всіх препаратів робили, власне, забарвлення, що складалося з кількох етапів.

По-перше, необхідно було фіксувати препарати. Це було зроблено за рахунок основного розчину барвника Май-Грюнвальда, до складу якого входить метиловий спирт, який здійснює токсичний вплив на організм людини. На предметні скельця наносили барвник та чекали протягом 3 – 8 хв (час залежав від типу препарату).

По-друге, зверху на барвник накапували дистильовану воду для змішування та чекали ще 1 – 3 хв, не зупиняючи таймер. У цей час проходила екзотермічна реакція, внаслідок якої теж відбувалась фіксація клітин на склі.

При взаємодії води та барвника спирт проникав у воду. Після завершення загального часу експозиції зливали воду з барвником та промивали скельця дистильованою водою (делікатний метод). Потім струшували препарати на повітрі.

По-третє, готували робочий барвник Романовського-Гімза (1 : 4). На препарати пастерівською піпеткою вносили барвник та чекали 6 – 8 хв. Після завершення часу експозиції препарати промивали, висушували та досліджували під світловим мікроскопом.

2.9. Мікроскопія препаратів кістковомозкових клітин

В препаратах з культур, отриманих на цитоцентрифузі і забарвлених за Паппенгеймом, оцінювали клітинний склад культивованих клітин. Щоб проаналізувати статус проліферації/диференціювання, клітини класифікували у наступні підтипи: бластні форми, ранні гранулоцити, пізні гранулоцити, макрофаги. Підрахунок клітинних елементів кісткового мозку проводили на 400 клітин на кожному склі та перераховували у відсотки. Морфологічний аналіз препаратів проводили під світловим мікроскопом при збільшенні 200х за обліком клітин різного ступеня зрілості, які формували колонії.

2.10. Статистична обробка експериментальних результатів

Статистичну обробку результатів проводили за допомогою програми MS Excel, використовуючи середнє значення, стандартне відхилення та t-критерій Ст'юдента. Вірогідним вважали результати, якщо $p < 0,05$. Перевірка статистичної гіпотези дозволила нам зробити строгий висновок про характеристики генеральної сукупності на основі вибірових даних. Гіпотези бувають різні. Одна з них - це гіпотеза про середню (математичне сподівання). Суть її в тому, щоб на основі тільки наявної вибірки зробити чіткий висновок про те, де може або не може знаходитися генеральна середня (правду ми ніколи

не дізнаємося, але можемо звузити коло пошуку).

T-статистика будується зазвичай за загальним принципом: у чисельнику – випадкова величина з нульовим математичним очікуванням (при виконанні нульової гіпотези), а у знаменнику – вибіркове стандартне відхилення цієї випадкової величини, що отримується як квадратний корінь з незмінної оцінки дисперсії.

На відміну від χ^2 -квадрат, t-критерій може бути одно- та двостороннім. Зазвичай дослідники використовують двосторонній, припускаючи, що відхилення може відбуватися в обидві сторони від середньої. Але якщо умова завдання допускає відхилення тільки в одну сторону, то необхідно використовувати односторонній критерій. Від цього трохи збільшується потужність критерію.

РОЗДІЛ 3

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

3.1. Особливості культивування гемопоетичних клітин-попередників кісткового мозку ссавців за умов *in vitro*

Культивування гемопоетичних стовбурових клітин та клітин-попередників із використанням різних моделей *in vivo* та *in vitro* сприяє отриманню нових даних щодо функціонування системи гемопоезу.

Гемопоетичні стовбурові клітини (ГСК) є основними учасниками процесу кровотворення. Невелика популяція ГСК здатна дати початок значній кількості клітин-нащадків із високою проліферативною активністю, які в свою чергу можуть диференціюватися у мільйони зрілих лімфогемопоетичних клітин.

У нашій роботі було відпрацьовано один із методів культивування нащадків стовбурової клітини – гемопоетичних клітин-попередників – у культуральній системі *in vitro* з метою здійснення оцінки морфофункціональних властивостей гемопоетичних клітин. Було проведено культивування кістково-мозкових клітин-попередників мишей та щурів, а також кісткового мозку людини, у системі *in vitro*, після чого здійснювали підрахунок кількості утворених клітинних агрегатів та аналізували їх тип.

Джерелом клітин для отримання колоній слугував кістковий мозок мишей лінії СВА та щурів Wistar, а також кістковий мозок людини. Культивування клітин за умов *in vitro* проводили протягом 7-14 діб, використовуючи 24-лунковий планшет. У лунках виявляли колонії та кластери різного типу. Проводили кількісний підрахунок отриманих колоній під інвертованим мікроскопом.

Колонії являють собою структури, які складаються більше, ніж із 40 клітин. Кластери – це агрегати, що містять менше, ніж 40 клітин. Кластери зустрічаються у середовищі, коли вони ще не встигли перерости у колонію або

коли клітина-попередник перебувала на пізньому етапі диференціювання.

Для повноцінного росту та функціонування клітин-попередників *ex vivo* було використано напіврідке живильне середовища із певними додатками. Відмінність полягала у використанні різних факторів росту, які забезпечують стимулювання росту та диференціювання клітин у культурі *in vitro*. GM-CSF – це кровотворний фактор, який виробляється Т-клітинами, макрофагами, фібробластами та ендотеліальними клітинами. Цей багатofункціональний цитокін стимулює клітини-попередники нейтрофілів, еозинофілів та макрофагів. GM-CSF також є фактором диференціювання та активізації для гранулоцитарних та моноцитарних клітин.

Нами було використано гранулоцитарно-макрофагальний фактор росту миші, щура та людини, щоб мати змогу оцінити, котрий з них є найбільш перспективним для культивування тих чи інших гемопоетичних клітин-попередників. Використовували дві концентрації (20 та 50 нг/мл) відповідно до інструкції виробника.

3.2. Кінетика формування клітинних агрегатів із кісткового мозку ссавців у живильному середовищі із різними факторами росту

Досліджуючи кінетику формування у культурі *in vitro* клітинних агрегатів із кісткового мозку, нами було встановлено оптимальний термін для культивування гемопоетичних клітин-попередників.

Результати підрахунку кількості клітинних агрегатів, що утворились у поживному середовищі за умов *in vitro*, показали, що початок проліферативної активності зазвичай спостерігався на 3–4-ту добу культивування, за наявності найбільш придатного фактора росту та його оптимальної концентрації.

Дослідження показало, що кластери гемопоетичних клітин-попередників щура з'являються на 4-ту добу культивування *in vitro*. Їх кількість збільшується з кожною наступною добою культивування, також збільшується проліферативна активність, аж до 8-ї доби, коли кількість клітинних структур (колоній) досягає

свого піку. Починаючи з цього часу кількість кластерів зменшується, а колонії перетворюються на гранулоцитарно-макрофагальні, переважно дифузного типу (рис. 3.1).

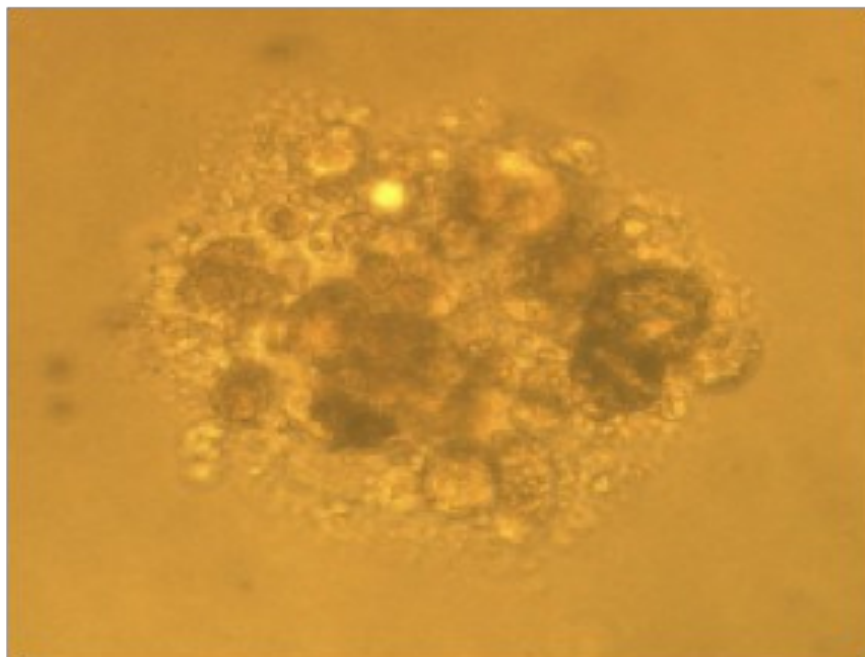


Рис. 3.1. Гранулоцитарно-макрофагальна колонія клітин кісткового мозку щура у культурі *in vitro*. Зб. 200х. Інвертований мікроскоп.

Описаний процес спостерігався за наявності у живильному середовищі фактора росту людини у концентрації 20 нг / мл. За наявності інших факторів росту та інших концентрацій ріст клітинних агрегатів був уповільнений або спостерігалась повна відсутність проліферативної активності, про що свідчила відсутність колоній клітин та наявність макрофагів у кластерах.

Під час культивування гемопоетичних клітин-попередників кісткового мозку миші було встановлено, що кластери у середовищі з'являлись вже на 3-тю добу, а наявність колоній спостерігали вже на 7 – 8-у добу. Після цього відбувався спад активної проліферації і спостерігали загибель клітинних агрегатів. Оптимальна ефективність колонієутворення спостерігалася за наявності у середовищі фактора росту щура у концентрації 50 нг/мл. За наявності іншого фактора росту та інших концентрацій ситуація була ідентичною до писаного вище дослідження, тобто ефективність

колонієутворення була нижчою.

Отже, аналізуючи проведені дослідження, можна стверджувати, що оптимальним часом для культивування гемопоетичних клітин-попередників щура за умов *in vitro* є 8-а доба, а для культивування гемопоетичних клітин-попередників миші – 7-а доба.

Для можливості подальшого порівняння провели також дослідження кінетики утворення кластерів та колоній клітинами кісткового мозку людини. Перші агрегати клітин (кластери) були виявлені вже на 3–4-ту добу культивування, а перші колонії з'явилися на 6-ту добу культивування. З кожною наступною добою збільшувалась кількість колоній у живильному середовищі. Найбільшу кількість колоній було виявлено на 14-ту добу культивування. У цей час, коли кількість колоній збільшувалась, спостерігали зупинку появи нових кластерів. Можливо, це пов'язано із тим, що клітини під час активної проліферації формували колонії, а кластери, що дали поштовх до появи колоній, зупинилися у розвитку.

Під час дослідження спостерігали також за зовнішнім виглядом колоній кісткового мозку людини та виявили, що він не залежав від їх клітинного складу, як це було з колоніями клітин кісткового мозку миші та щура. У цьому випадку компактна колонія відповідала гранулоцитарній, дифузна – макрофагальній, компактна з “вінчиком” – змішаній. У центрі колоній розташовувались молоді клітини, а на периферії знаходились метамієлоцити, поодинокі розміщені макрофаги із залишками зруйнованих клітин.

На 14-добу культивування кісткового мозку людини ще знаходили гранулоцитарні колонії, тоді як всі колонії кісткового мозку щура та миші перетворилися у макрофагальні вже на 7–8-му добу культивування.

Отже, аналізуючи отримані дані, можна стверджувати, що колонії клітин кісткового мозку щура та миші у культурі клітин *in vitro* формуються швидше, ніж колонії кісткового мозку людини. Також слід зазначити, що за умов, несприятливих для культивування клітин, перетворення гранулоцитарних колоній у макрофагальні відбувається набагато швидше.

3.3. Формування клітинних агрегатів із кісткового мозку щура у живильному середовищі із фактором росту миші та людини

Для даного дослідження було використано кістковий мозок здорового щура Wistar. Клітини-попередники культивували з використанням двох факторів росту (миші та людини), у двох концентраціях (20 та 50 нг/мл), по 6 лунок планшету на кожний фактор.

При використанні гранулоцитарно-макрофагального фактора росту людини у концентрації 20 нг/мл було отримано такі результати:

лунка №1 – ідентифіковано 9 колоній неправильної форми, дифузного типу різного розміру (рис. 3.2); 11 кластерів невеликого розміру, неправильної форми;

лунка №2 – було знайдено 5 колоній неправильної форми, поодинокі розташовані; 8 кластерів нормальної форми;

лунка №3 – виявлено 7 колоній неправильної форми, поодинокі розташовані; 10 кластерів різного розміру, нормальної форми.

При використанні гранулоцитарно-макрофагального фактора росту людини у концентрації 50 нг/мл було отримано такі результати:

лунка №1 – знайдено 2 нормальні колонії, поодинокі розташовані; 11 кластерів неправильної форми;

лунка №2 – виявлено 3 колонії нормальної форми, дифузного типу (рис. 3.3); 8 кластерів нормальної форми;

лунка №3 – містила 8 колоній нормальної форми, компактного типу (рис. 3.4); 9 кластерів різного розміру, також нормальної форми.

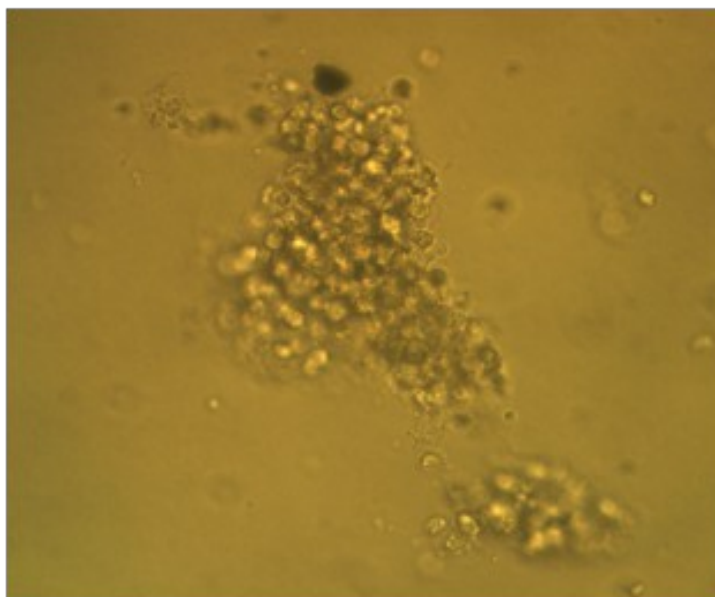


Рис. 3.2. Колонія гемопоетичних клітин-попередників кісткового мозку щура дифузного типу на 8-му добу культивування (фактор росту людини, 20 нг/мл). Зб. 200х. Інвертований мікроскоп.

Застосування гранулоцитарно-макрофагального фактора росту миші у концентрації 20 нг/мл дозволило отримати такі результати:

лунка №1 – знайдено 3 колонії та 7 кластерів;

лунка №2 – колоній не було виявлено; 7 кластерів різного розміру та нормальної форми;

лунка №3 – виявлено 2 колонії компактного типу; 6 нормальних кластерів.

У той же час застосування цього фактора у концентрації 50 нг/мл дало такі результати:

лунка №1 – знайдено 1 колонію неправильної форми; 7 кластерів;

лунка №2 – виявлено 1 колонію неправильної форми; 4 кластери неправильної форми;

лунка №3 – виявлено 1 нормальну колонію компактного типу (рис. 3.5); 4 кластери нормальної форми.

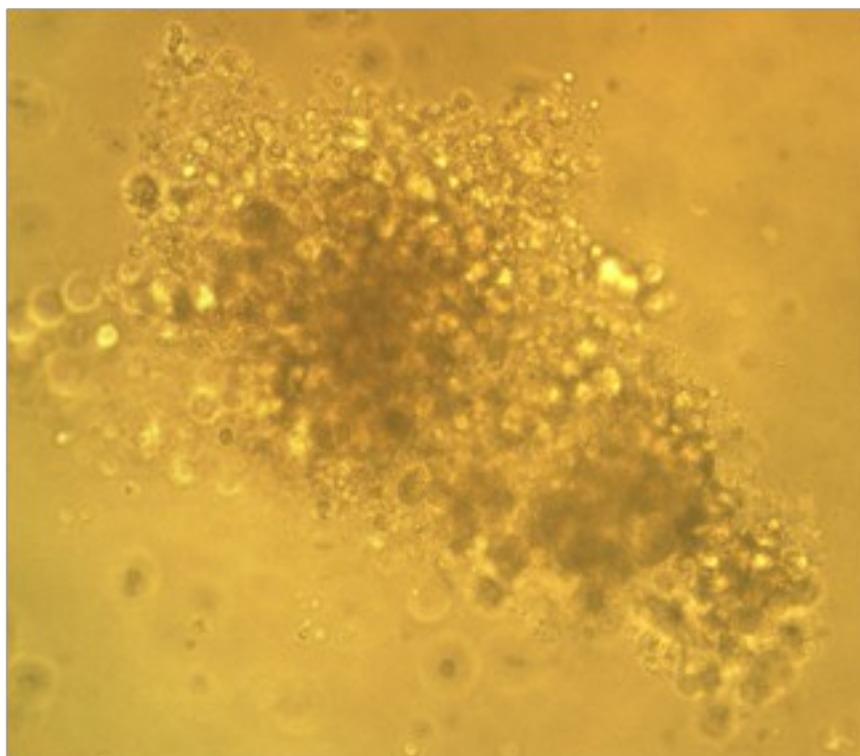


Рис. 3.3. Колонія гемопоетичних клітин-попередників кісткового мозку щура дифузного типу на 8-му добу культивування (фактор росту людини, 50 нг/мл). Зб. 200х. Інвертований мікроскоп.

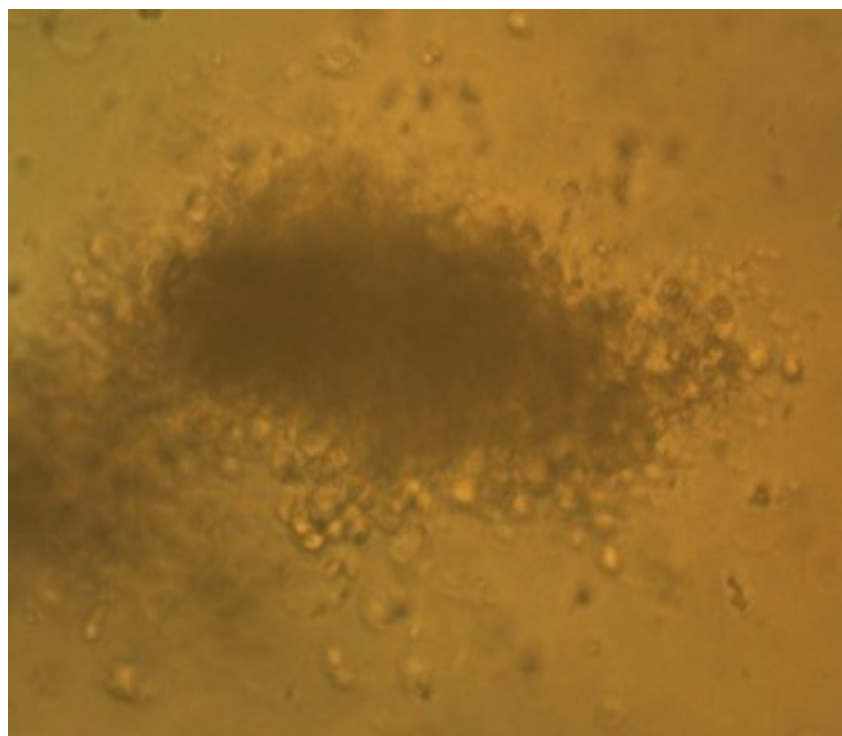


Рис. 3.4. Колонія гемопоетичних клітин-попередників кісткового мозку щура компактного типу на 8-му добу культивування (фактор росту людини, 50 нг/мл). Зб. 200х. Інвертований мікроскоп.

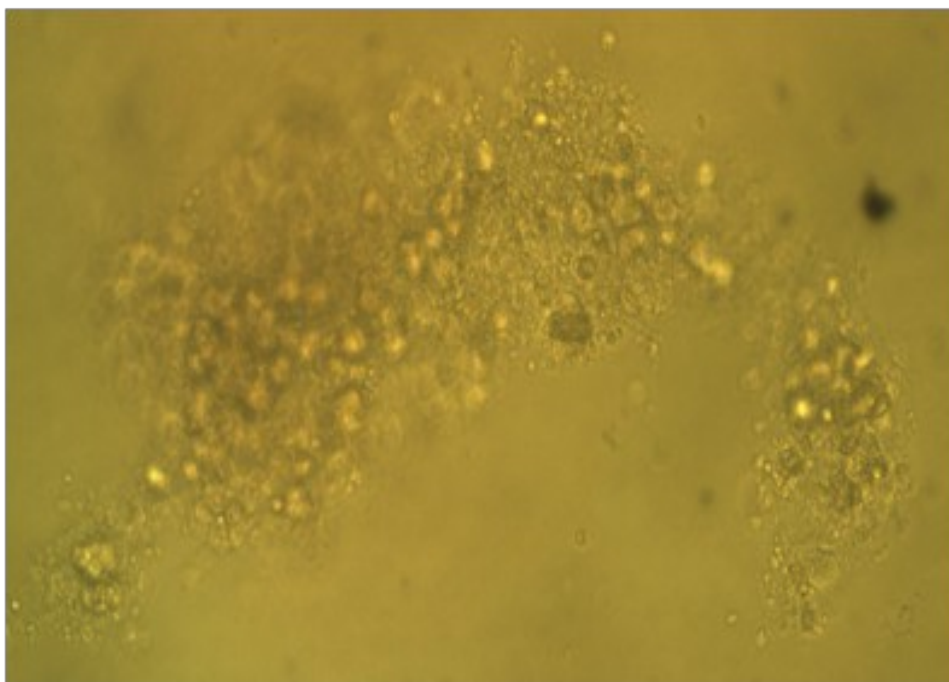


Рис. 3.5. Колонія гемопоетичних клітин-попередників кісткового мозку щура компактного типу на 8-му добу культивування (фактор росту миші, 50 нг/мл). Зб. 200х. Інвертований мікроскоп.

Отже, беручи до уваги отримані результати, можна стверджувати, що для культивування гемопоетичних клітин-попередників, отриманих з кісткового мозку щура, наявність гранулоцитарно-макрофагального фактора росту людини є більш сприятливим фактором, у порівнянні із фактором росту миші.

3.4. Формування клітинних агрегатів із кісткового мозку миші у живильному середовищі із фактором росту миші та щура

Для отримання даних для подальшого порівняльного аналізу, нами було проведено дослідження із використанням кісткового мозку здорової миші лінії СВА. Клітини-попередники культивували з використанням двох гранулоцитарно-макрофагальних факторів росту (миші та щура), у двох концентраціях (20 та 50 нг/мл), по 6 лунок планшету на кожний фактор.

Застосування гранулоцитарно-макрофагального фактора росту миші у концентрації 20 нг/мл дало такі результати:

лунка №1 – колоній не було виявлено, зустрічались поодинокі клітини на стадії апоптозу;

лунка №2 – колонії були відсутні, наявні 4 кластери неправильної форми;

лунка №3 – колонії були відсутні, виявлено 3 нормальних кластери неправильної форми та поодинокі клітини.

При концентрації гранулоцитарно-макрофагального фактора росту миші 50 нг/мл було отримано такі результати:

лунка №1 – колоній не виявлено, 2 кластери на стадії руйнації, відзначили наявність макрофагів;

лунка №2 – колонії були відсутні, поодинокі клітини;

лунка №3 – колоній не було, наявні 3 кластери із макрофагами.

У той же час застосування гранулоцитарно-макрофагального фактора росту щура у концентрації 20 нг/мл дало змогу виявити наступні результати культивування:

лунка №1 – виявлено поодинокі кластери на стадії руйнації;

лунка №2 – виявлено 3 кластери з макрофагами;

лунка №3 – отримано 2 кластери з адипоцитами та кілька поодиноких клітин.

Цей же фактор при концентрації 50 нг/мл зумовлював такі результати процесу колонієутворення:

лунка №1 – було виявлено 2 колонії дифузного типу та 3 кластери неправильної форми;

лунка №2 – відзначили присутність 1 колонії дифузного типу (рис. 3.6) та 2 кластери, також дифузного типу;

лунка №3 – виявлена 1 колонія неправильної форми та 3 кластери дифузного типу (рис. 3.7).

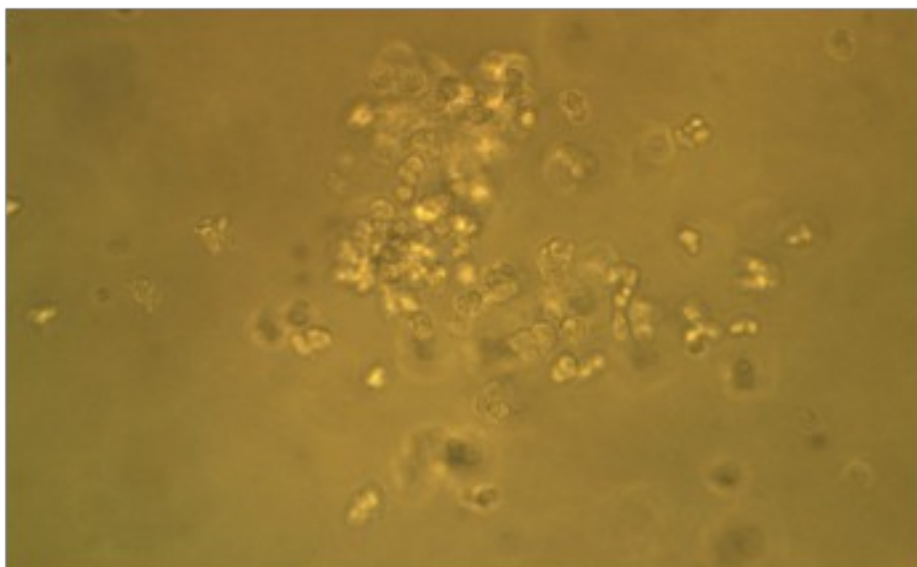


Рис. 3.6. Колонія гемопоетичних клітин-попередників кісткового мозку миші дифузного типу на 8-му добу культивування (фактор росту щура, 50 нг/мл). Зб. 200х. Інвертований мікроскоп.

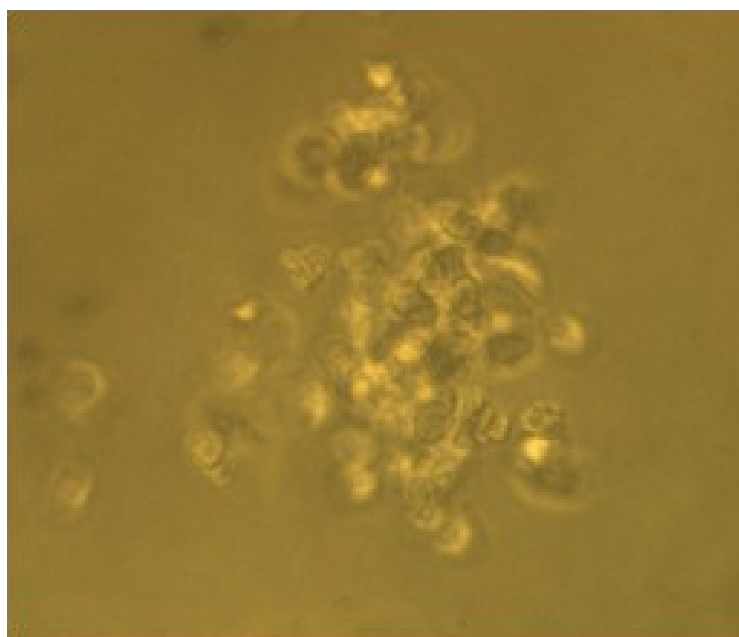


Рис. 3.7. Кластер гемопоетичних клітин-попередників кісткового мозку миші дифузного типу на 8-му добу культивування (фактор росту щура, 50 нг/мл). Зб. 200х. Інвертований мікроскоп.

Отже, можна зробити висновок, що для культивування клітин-попередників, виділених із кісткового мозку миші, серед проаналізованих варіантів найбільш сприятливою умовою є використання гранулоцитарно-

макрофагального фактора росту щура.

3 . 5 . Порівняльний аналіз ефективності колонієутворення гемопоетичних клітин-попередників при дії різних факторів росту

Культивування кісткового мозку ссавців за умов *in vitro* проводили з використанням різних факторів росту (GM-CSF миші, щура та людини) у різних комбінаціях та двох концентраціях (20 нг/мл та 50 нг/мл).

Перший етап експерименту полягав у культивуванні гемопоетичних клітин-попередників кісткового мозку щура протягом 8 діб із використанням двох факторів росту – GM-CSF миші та людини. Суспензію клітин кісткового мозку додавали таким чином, щоб на одну концентрацію кожного фактора припадало 1 млн. клітин.

Внаслідок проведених досліджень було виявлено, що оптимальною концентрацією обох досліджуваних факторів росту є 20 нг/мл; ефективність колонієутворення при концентрації 50 нг/мл була в обох випадках значно нижчою. Результати культивування клітин кісткового мозку щура у культурі *in vitro* на 8-му добу представлено на рис. 3.8.

Було з'ясовано, що в оптимальний термін, тобто на 8-му добу, ефективність колонієутворення кістково-мозкових клітин щура при застосуванні гранулоцитарно-макрофагального фактора росту людини становить $7,0 \pm 2,0$ колоній у порівнянні із $2,5 \pm 0,7$ при застосуванні гранулоцитарно-макрофагального фактора росту миші. Кількість кластерів, які було отримано у культурі при дії GM-CSF людини у порівнянні із GM-CSF миші теж була достовірно вищою – $9,7 \pm 1,5$ та $6,7 \pm 0,6$, відповідно.

Отже, гранулоцитарно-макрофагальний фактор росту людини був більш ефективним при культивуванні клітин кісткового мозку щура у культурі *in vitro*.

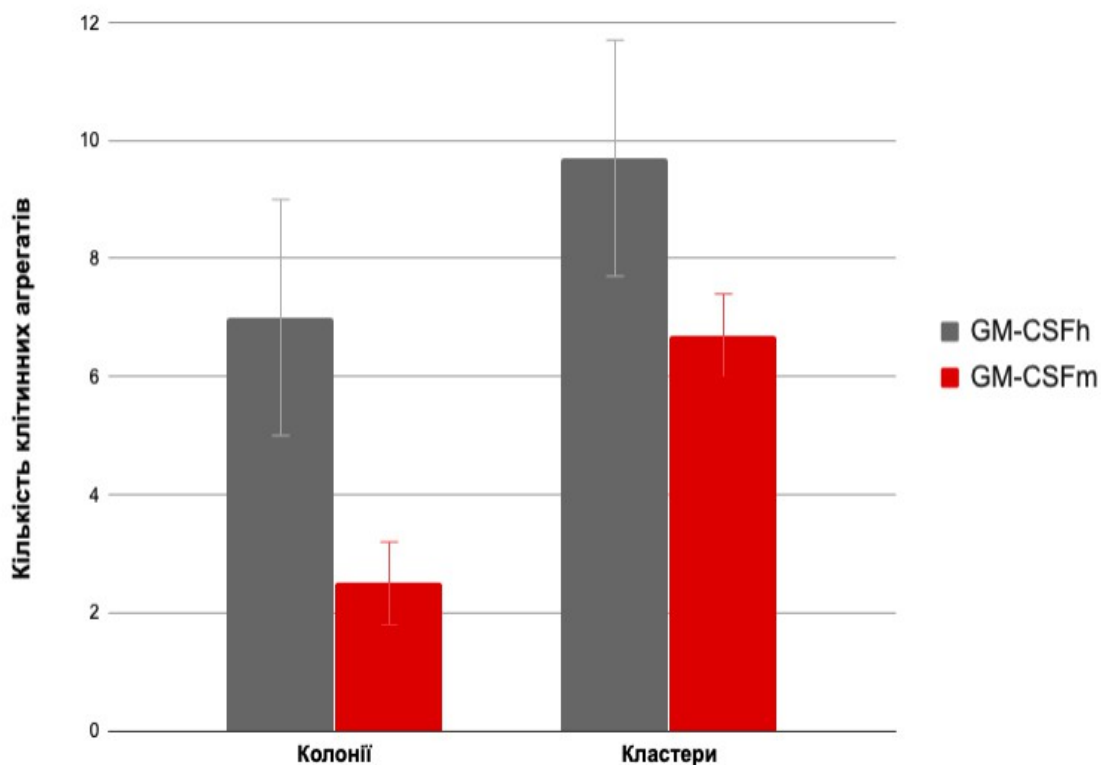


Рис. 3.8. Ефективність колонієутворення клітин кісткового мозку щура у культурі клітин *in vitro* на 8-му добу при застосуванні гранулоцитарно-макрофагальних факторів росту людини (GM-CSFh) та миші (GM-CSFm) у концентрації 20 нг/мл.

Другий етап експерименту полягав у культивуванні гемопоетичних клітин-попередників кісткового мозку миші із використанням двох факторів росту – GM-CSF миші та щура. На кожну концентрацію фактора також було використано 1 млн. клітин.

Було визначено ефективність колонієутворення гемопоетичних клітин миші за таких умов культивування (див. рис. 3.9.). З'ясувалося, що саме при концентрації факторів 50 нг/мл кількість утворених клітинних агрегатів вища, ніж при концентрації 20 нг/мл. При цьому більш ефективним виявився гранулоцитарно-макрофагальний фактор щура. Так, у цьому випадку було отримано $1,3 \pm 0,5$ колоній та $2,7 \pm 0,6$ кластерів, тоді як при застосуванні GM-CSF миші колонії у культурі клітин були відсутні взагалі, а кластерів було

виявлено $2,5 \pm 0,7$.

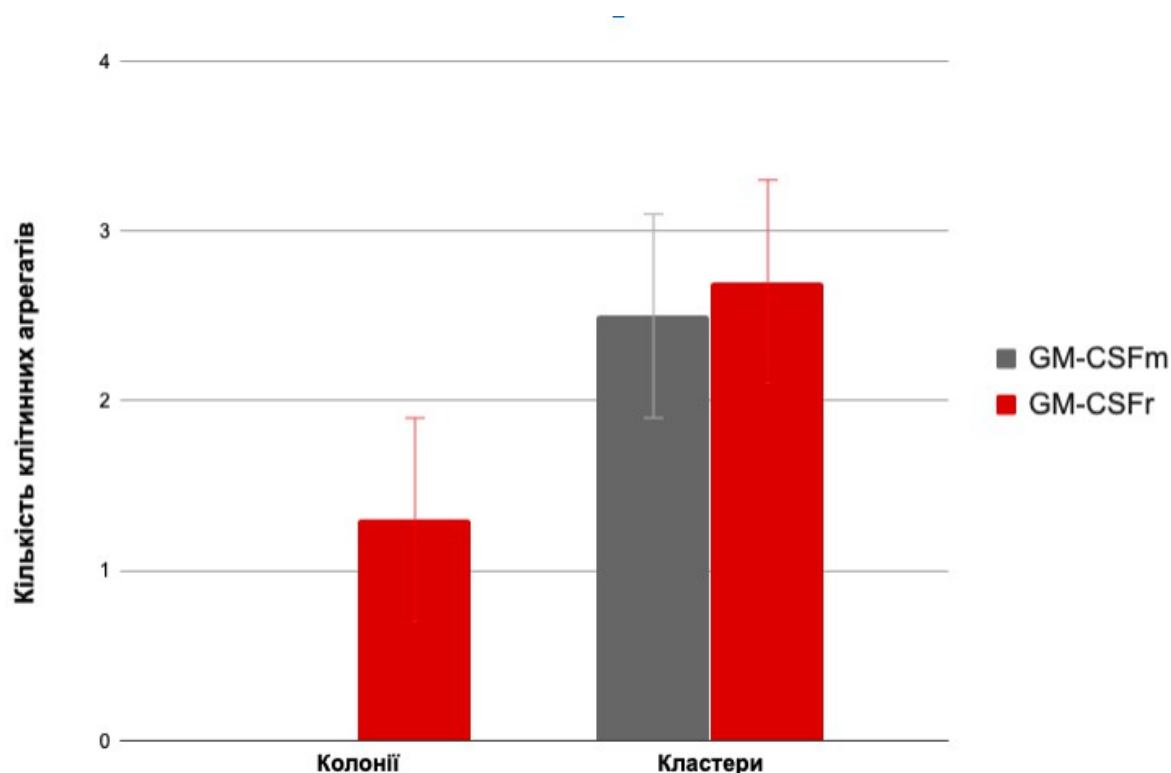


Рис. 3.9. Ефективність колонієутворення клітин кісткового мозку миші у культурі клітин *in vitro* на 7-му добу при застосуванні гранулоцитарно-макрофагальних факторів росту миші (GM-CSFm) та щура (GM-CSFr) у концентрації 50 нг/мл.

Отже, у результаті культивування клітин кісткового мозку миші було визначено найбільш придатний для них термін – 7 днів, оптимальний фактор – гранулоцитарно-макрофагальний фактор росту щура та оптимальну концентрацію фактора – 50 нг/мл.

Третій етап експерименту проводили з використанням гемопоетичних клітин-попередників кісткового мозку людини, де було використано лише один фактор росту (GM-CSF людини) у двох концентраціях. Це було зроблено для виявлення оптимальної концентрації цього фактора росту для культивування клітин *in vitro* (рис. 3.10).

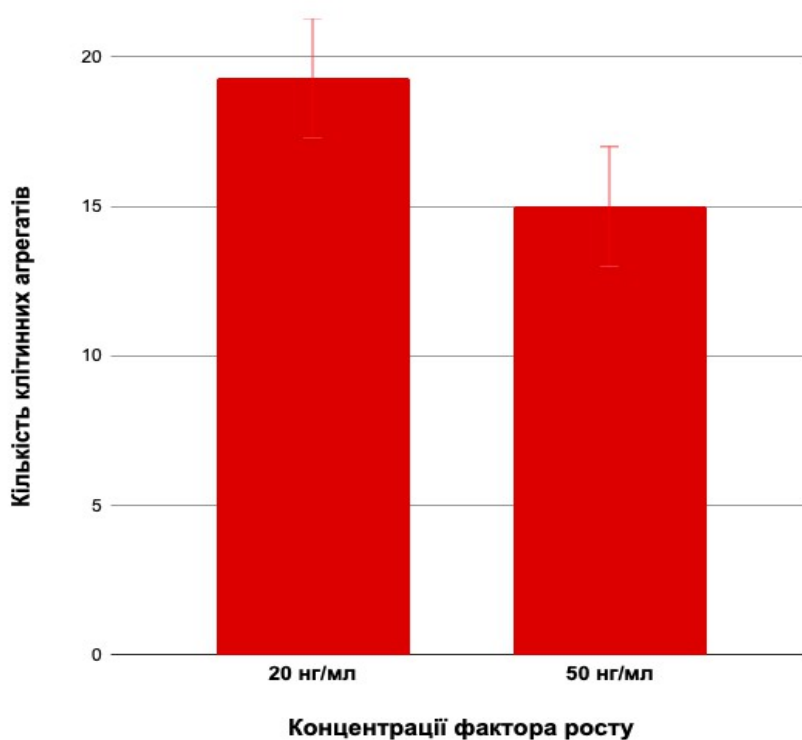


Рис. 3.10. Ефективність колонієутворення клітин кісткового мозку людини у культурі клітин *in vitro* на 14-му добу при застосуванні гранулоцитарно-макрофагального фактора росту людини (GM-CSF) у концентраціях 20 нг/мл та 50 нг/мл.

Результати, отримані під час культивування гемопоетичних клітин-попередників кісткового мозку людини, вказують, що оптимальною умовою є концентрація фактору росту людини 20 нг/мл. Це підтверджують і літературні джерела, які було проаналізовано для порівняння під час статистичної обробки отриманих даних. Зокрема, при застосуванні GM-CSF у концентрації 20 нг/мл було отримано $19,3 \pm 1,8$ колоній, а при концентрації 50 нг/мл – $15,0 \pm 1,5$.

3.6. Клітинний склад кісткового мозку ссавців у нормі

Про зміни стану кровотворення вказують дані клітинного складу червоного кісткового мозку та фонові показники мієлограми.

Було проведено дослідження з використанням кісткового мозку щура Wistar та миші лінії СВА. Лабораторних тварин виводили з експерименту дотримуючись правил Європейської конвенції про захист хребетних тварин. Готували препарати кісткового мозку, забарвлювали їх за Паппенгеймом та досліджували за допомогою світлого мікроскопа (зб. 100х та 200х).

Підрахунок клітинних елементів кісткового мозку здійснювали на 400 клітин на кожному склі, розділяючи на певні категорії: еритроїдні, лімфоїдні, плазматичні, мієлоїдні тощо. Отримували середнє значення та перераховували у відсоткове значення. Далі визначали морфологічні відмінності клітин кісткового мозку щура та миші. У більшості еозинофілів, юних та паличкоподібних нейтрофілів – кільцеподібне ядро. Тому що у щурів та мишей розвиток гранулоцитів проходить за кільчастим типом. Зернистість нейтрофільних гранулоцитів дуже дрібна, їх ядра більш сегментовані (5–8 сегментів). Базофільні гранулоцити великих розмірів. Еозинофільні гранули дрібні, округлі, густо заповнювали цитоплазму. Лімфоцити та моноцити, еритроїдні елементів щурів та мишей мали типовий вигляд.

Відсоткове співвідношення клітин кісткового мозку щура становить: бластні клітини – 0,2 %, мієлобласти – 0,3 %, нейтрофільні мієлоцити – 6,5 %, нейтрофільні метамієлоцити – 10 %, нейтрофільні промієлоцити – 5 %, паличкоядерні – 15 %, сегментоядерні – 45,3 %, лімфоцити – 2,6 %, моноцити – 1 %, еритробласти – 1,9 %, плазматичні клітини – 0,6 %.

Відсоткове співвідношення клітин кісткового мозку миші (рис. 3.11) становить: бластні клітини – 1,3 %, мієлобласти – 2,4 %, нейтрофільні мієлоцити – 5,5 %, нейтрофільні метамієлоцити – 12 %, нейтрофільні промієлоцити – 3,3 %, паличкоядерні – 17 %, сегментоядерні – 42,2 %, лімфоцити – 1,5 %, моноцити – 0,7 %, еритробласти – 1,2 %, плазматичні клітини – 0,7 %.

Тривалість еритропоезу у людини (від СК до еритроцита) – 2 тижні. Інтенсивність еритропоезу контролює еритропоетин. Основний стимул для продукції еритропоетину – гіпоксія. Клітини еритроцитарного ряду у

червоному кістковому мозку скупчуються навколо макрофага, формуючи гемопоетичний острівцець.

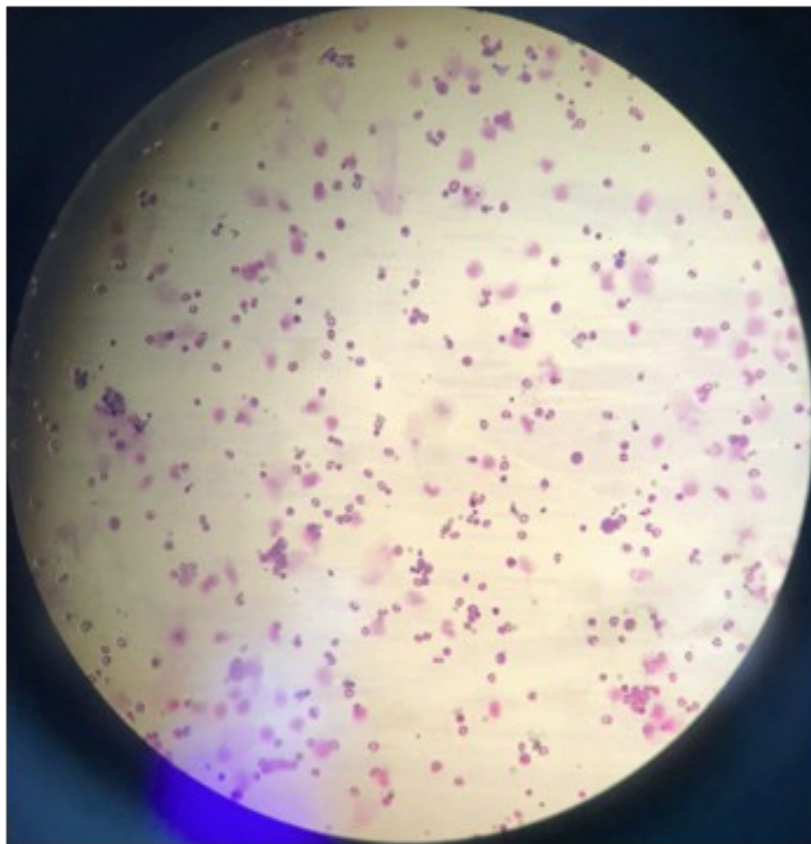


Рис. 3.11. Мазок кісткового мозку миші. Зб. 200х. Світловий мікроскоп.

Відсоткове співвідношення клітин кісткового мозку людини становить: бластні клітини – 3,5 %, мієлобласти – 0,3 %, нейтрофільні мієлоцити – 15,5 %, нейтрофільні метамієлоцити – 16,3 %, нейтрофільні промієлоцити – 4,2 %, паличкоядерні – 21,2 %, сегментоядерні – 20,6 %, лімфоцити – 5,5 %, моноцити – 1,2 %.

УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ

Гемопоетичні органи – органи, в яких відбувається утворення формених елементів крові. До цих належать червоний кістковий мозок, селезінка, лімфатичні вузли, тимус (вилочкова залоза). До центральних органів належать червоний кістковий мозок і тимус. До периферичних – селезінка та лімфатичні вузли. Червоний кістковий мозок є головний органом кровотворення. У дорослої людини червоний кістковий мозок зберігається лише в епіфізах довгих трубчастих кісток, у губчастих кістках і в губчастій речовині плоских кісток [51].

Кістковий мозок виконує безліч життєво важливих функцій в організмі людини [52]. Процес гемопоезу полягає у диференціюванні стовбурових клітин кісткового мозку за кількома напрямками: еритропоез – утворення еритроцитів; тромбоцитопоез – тромбоцитів; гранулопоез – гранулярних лейкоцитів; лімфоцитопоез – клітин імунної системи – лімфоцитів, які потім потрапляють у тимус, селезінку та лімфатичні вузли, де проходять подальшу диференціацію на Т- і В-лімфоцити. На відміну від червоного, жовтий кістковий мозок, не здійснює кровотворної функції, але при крововтратах та токсичних отруєннях у ньому з'являються стовбурові клітини з периферичної крові. На їх основі виникають вогнища гемопоезу [51].

Унікальною особливістю мікрооточення кісткового мозку є присутність там поліпотентних стовбурових клітин. Розуміння процесів, що відбуваються у мікрооточенні стовбурових клітин, які знаходяться в кістковому мозку, зможуть дати нам можливість впливати на функціональний стан цих клітин та керувати ними. Наразі до елементів мікрооточення відносять також остеогенні, жирові, адвентиційні, ендотеліальні клітини і макрофаги.

Макрофаги у кістковому мозку представлені неоднорідними клітинами, але завжди багатими на лізосоми та фагосоми. Деякі з популяцій макрофагів секретують ряд біологічно активних речовин (еритропоетин, колонієстимулюючий фактор, інтерлейкіни, простагландини, інтерферон тощо)

[53].

У загально-біологічному сенсі, стовбурова клітина має здатність до самопідтримання популяції та одночасного диференціювання у той чи інший тип клітин. У червоному кістковому мозку при поділі материнської стовбурової клітини крові утворюється одна клітина за всіма властивостями тотожна материнській і одна уніпотентна напівстовбурова, що дає початок певному виду формених елементів крові [53].

Нові клітини-попередники продукуються зі стовбурових клітин при взаємодії стовбурових клітин і клітин строми. Після отримання відповідних стимулів для дозрівання відбуваються проліферація та диференціювання клітин, що завершуються міграцією більшості зрілих клітин із кісткового мозку. Гемопоез регулюється за допомогою численних цитокінів та експресії адгезивних молекул на клітинах-попередниках та клітинах строми.

Культивування гемопоетичних стовбурових клітин та клітин-попередників із використанням різних моделей *in vivo* та *in vitro* сприяє отриманню нових даних щодо функціонування системи гемопоезу.

У нашій роботі було відпрацьовано один із методів культивування нащадків стовбурової клітини – гемопоетичних клітин-попередників – у культуральній системі *in vitro* з метою здійснення оцінки морфофункціональних властивостей гемопоетичних клітин. Було проведено культивування кістково-мозкових клітин-попередників мишей та щурів, а також кісткового мозку людини, у системі *in vitro*, після чого здійснювали підрахунок кількості утворених клітинних агрегатів та аналізували їх тип.

Джерелом клітин для отримання колоній слугував кістковий мозок мишей лінії СВА та щурів Wistar, а також кістковий мозок людини. Культивування клітин за умов *in vitro* проводили протягом 7-14 діб, використовуючи 24-лунковий планшет. У лунках виявляли колонії та кластери різного типу. Проводили кількісний підрахунок отриманих колоній під інвертованим мікроскопом.

Колонії являють собою структури, які складаються більше, ніж із 40

клітин. Кластери – це агрегати, що містять менше, ніж 40 клітин. Кластери зустрічаються у середовищі, коли вони ще не встигли перерости у колонію або коли клітина-попередник перебувала на пізньому етапі диференціювання.

Для повноцінного росту та функціонування клітин-попередників *ex vivo* було використано напіврідке живильне середовища із певними додатками. Відмінність полягала у використанні різних факторів росту, які забезпечують стимулювання росту та диференціювання клітину культури *in vitro*. GM-CSF – це кровотворний фактор, який виробляється Т-клітинами, макрофагами, фібробластами та ендотеліальними клітинами. Цей багатфункціональний цитокін стимулює клітини-попередники нейтрофілів, еозинофілів та макрофагів. GM-CSF також є фактором диференціювання та активізації для гранулоцитарних та моноцитарних клітин.

Нами було використано гранулоцитарно-макрофагальний фактор росту миші, щура та людини, щоб мати змогу оцінити, котрий з них є найбільш перспективним для культивування тих чи інших гемопоетичних клітин-попередників. Використовували дві концентрації (20 та 50 нг/мл) відповідно до інструкції виробника.

У результаті проведених досліджень було визначено, як підтримується гемопоез у здорових ссавців у культурі *in vitro*. Це відображалось на активності колонієутворення гемопоетичних клітин-попередників.

Досліджуючи кінетику формування у культурі *in vitro* клітинних агрегатів із кісткового мозку, нами було встановлено оптимальний термін для культивування гемопоетичних клітин-попередників. Аналіз утворення клітинних агрегатів свідчив про більш раннє колонієутворення клітинами кісткового мозку миші та щура (максимальна кількість колоній на 7-му та 8-му добу, відповідно) у порівнянні із кістковим мозком людини (14-та доба).

Отже, аналізуючи отримані дані, можна стверджувати, що колонії клітин кісткового мозку щура та миші у культурі клітин *in vitro* формуються швидше, ніж колонії кісткового мозку людини. Також слід зазначити, що за умов, несприятливих для культивування клітин, перетворення гранулоцитарних

колоній у макрофагальні у культурі відбувається набагато швидше.

Під час дослідження спостерігали також за зовнішнім виглядом колоній кісткового мозку людини та виявили, що він не залежав від їх клітинного складу, як це було з колоніями клітин кісткового мозку миші та щура. У цьому випадку компактна колонія відповідала гранулоцитарній, дифузна – макрофагальній, компактна з “вінчиком” – змішаній. У центрі колоній розташовувались молоді клітини, а на периферії знаходились метамієлоцити, поодинокі розміщені макрофаги із залишками зруйнованих клітин.

Показники колонієутворюючої активності при культивуванні *in vitro* клітин кісткового мозку щура свідчать про те, що оптимальними умовами для високої ефективності колонієутворення серед усіх досліджених комбінацій є наявність у середовищі гранулоцитарно-макрофагального фактора росту людини у концентрації 20 нг/мл.

У культурі клітин *in vitro* кісткового мозку миші було отримано максимальну ефективність колонієутворення при застосуванні гранулоцитарно-макрофагального фактора росту щура у концентрації 50 нг/мл.

Результати, отримані під час культивування гемопоетичних клітин-попередників кісткового мозку людини, вказують, що оптимальною умовою є концентрація фактора росту людини 20 нг/мл. Зокрема, при застосуванні GM-CSF у вказаній концентрації було отримано $19,3 \pm 1,8$ колоній у лунці, а при концентрації 50 нг/мл – лише $15,0 \pm 1,5$.

Отримані результати сприятимуть кращому розумінню процесу кровотворення *ex vivo* та, у майбутньому, дадуть змогу вдосконалити протоколи культивування гемопоетичних клітин *ex vivo*.

ВИСНОВКИ

1. Було проведено визначення оптимального терміну культивування клітин кісткового мозку ссавців у культурі *in vitro*. Аналіз кінетики утворення клітинних агрегатів свідчив про більш раннє колонієутворення клітинами кісткового мозку миші та щура (максимальна кількість колоній на 7-му та 8-му добу, відповідно) у порівнянні із кістковим мозком людини (14-та доба).
2. Показники колонієутворюючої активності при культивуванні *in vitro* клітин кісткового мозку щура свідчать про те, що оптимальними умовами для високої ефективності колонієутворення серед усіх досліджених комбінацій є наявність у середовищі гранулоцитарно-макрофагального фактора росту людини у концентрації 20 нг/мл. Ефективність колонієутворення кістково-мозкових клітин щура при застосуванні фактора росту людини становить $7,0 \pm 2,0$ колоній у порівнянні із $2,5 \pm 0,7$ при застосуванні фактора росту миші. Кількість кластерів, які було отримано у культурі при дії GM-CSF людини у порівнянні із GM-CSF миші була достовірно вищою – $9,7 \pm 1,5$ та $6,7 \pm 0,6$, відповідно.
3. У культурі клітин *in vitro* кісткового мозку миші було отримано максимальну ефективність колонієутворення при застосуванні гранулоцитарно-макрофагального фактора росту щура у концентрації 50 нг/мл. Було отримано $1,3 \pm 0,5$ колоній та $2,7 \pm 0,6$ кластерів, тоді як при застосуванні GM-CSF миші колонії у культурі клітин були відсутні взагалі, а кластерів було виявлено $2,5 \pm 0,7$.
4. Результати, отримані під час культивування гемопоетичних клітин-попередників кісткового мозку людини, вказують, що оптимальною умовою є концентрація фактора росту людини 20 нг/мл. Зокрема, при застосуванні GM-CSF у вказаній концентрації було отримано $19,3 \pm 1,8$ колоній у лунці, а при концентрації 50 нг/мл – лише $15,0 \pm 1,5$.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Малоштан Л М, Рядних О К, Жегунова Г П. Фізіологія з основами анатомії людини: Підручн. 2003.
2. Чертков И Л, Фриденштейн А Я. Клеточные основы кроветворения. "Медицина", 1977.
3. Оспанова, М І, Рамильева И Р, Турганбекова А А. Гемопозитические стволовые клетки. *Клиническая медицина Казахстана*. 2011.
4. Komarcevic A. The modern approach to wound treatment. *Med Pregl* 2000. N. 53.– P. 363–368.
5. Никитенко В И, Павловичев С А, Полякова В С. Использование факторов роста фибробластов для лечения ран и ожогов . *Хирургия*. 2012.
6. Smiell JM. Efficacy and safety of becaplermin (recombinant human platelet-derived growth factor-BB) in patients with nonhealing, lower extremity diabetic ulcers: a combined analysis of four randomized studies. *Wound Repair Regen* 1999. N. 7(5). P. 335–346.
7. Antman KS, Griffin JD, Elias A et al. Effect of recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor on chemotherapy-induced myelosuppression// *New England Journal of Medicine*.– 1988.– № 319.– P. 593-598.
8. Dinarello CA. Interleukin-1 and interleukin-1 antagonism// *Blood*.– 1991.– 77.– P. 1627-1652.
9. Ribatti D, Tamma R. Hematopoietic growth factors and tumor angiogenesis. *Cancer Letters* (2018), doi: <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2018.10.008>.
10. Yu-Chung Yang, Ciarletta AB, Temple PA, Chung M, Kovacic S, Witek-Giannotti JS, Leary AC, Kriz R, Donahue RE, Wong GG, and Clark SC. 1986. *Cell*. 47:3-10.
11. Crawford J, Ozer H, Stoller R et al. Reduction by granulocyte colony-stimulating factor of fever and neutropenia-induced by chemotherapy in patients with small-cell lung cancer// *New England Journal of Medicine*.–

- 1991.– № 325.– P. 164-170.
12. Welte K, Bonilla MA, Gillio AP et al. Recombinant human G-CSF: effects on hematopoiesis in normal and cyclophosphamide-treated primates// *Journal of Experimental Medicine*.–1987.–165.– P. 941-948.
 13. Xu S, Höglund M, Håkansson L, Venge P. Granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) induces the production of cytokines *in vivo*. *Br J Haematol*. 2000 Mar;108(4):848-53.
 14. Huebner K, Isobe M, Croce CM, Golde DW, Kaufman SE, and Gasson JC. 1985. *Science (Wash. DC)*. 230:1282-1285.
 15. Oster W, Lindemann A, Mertelsmann R, Herrmann F. Production of macrophage-, granulocyte-, granulocyte-macrophage- and multi-colonystimulating factor by peripheral blood cells. *Eur J Immunol*. 1989 19:543–8. doi: 10.1002/eji.1830190320
 16. Koeffler HP, Gasson J, Ranyard J, Souza L, Shepard M, Munker R. Recombinant human TNF alpha stimulates production of granulocyte colony-stimulating factor. *Blood* 1987. 70:55–9.
 17. Zsebo KM, Yuschenkoff VN, Schiffer S, Chang D, McCall E, Dinarello CA, et al. Vascular endothelial cells and granulopoiesis: interleukin-1 stimulates release of G-CSF and GM-CSF. *Blood*. 1988 71:99–103.
 18. Rennick D, Yang G, Gemmell L, Lee F. Control of hemopoiesis by a bone marrow stromal cell clone: lipopolysaccharide-and interleukin-1-inducible production of colony-stimulating factors. *Blood*. 1987 69:682–91.
 19. Demetri GD, Griffin JD. Granulocyte colony-stimulating factor and its receptor. *Blood* (1991) 78:2791–808.
 20. Liu F, Wu HY, Wesselschmidt R, Kornaga T, Link DC. Impaired production and increased apoptosis of neutrophils in granulocyte colony-stimulating factor receptor-deficient mice. *Immunity* (1996) 5:491–501. doi: 10.1016/S1074-7613(00)80504-X
 21. Welte K, Zeidler C, Pietsch T et al. Correction of neutropenia in children with glycogenosis Ib by treatment with rhG-CSF. *Blood*. 2003.

22. Spiekermann K, Roesler J, Emmendoerffer A, Elsner J, Welte K. Functional features of neutrophils induced by G-CSF and GM-CSF treatment: differential effects and clinical implications. *Leukemia* (1997) 11:466–78. doi: 10.1038/sj.leu.2400607
23. Fixe, P, Praloran V. M-CSF: haematopoietic growth factor or inflammatory cytokine? *Cytokine*. 1998. 10(1), 32–37. doi:10.1006/cyto.1997.0249
24. Stanley ER, Berg KJ, Einstein DB, Lee PSW, Yeung YG (1994) The biology and action of colony stimulating factor-1. *Stem Cells* 12:15–25.
25. Franklin Bunn H. Erythropoietin. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2013.
26. Е.Б. Владимирская. Нормальное кроветворение и его регуляция. *Клин. Онкогематол*. 2015; 8(2):109–119
27. Ningning He, Lu Zhang, Jian Cui, Zongjin Li. Bone marrow vascular niche: home for hematopoietic stem cells. *Bone Marrow Res*. 2014.
28. Pietras EM, Warr MR, Passegue E. *Cell cycle regulation in hematopoietic stem cells*. 2011.
29. Dexter TM, Allen TD, Lajtha LG. *Cell Physiol*. 1977. V. 91. No 3.
30. Friedenstein AJ, Chailakhyan RK, Latsinik NV, Panasyuk AF, Keiliss-Borok IV. *Transplantation*. 1974. V. 17. No 4.
31. De Angeli S, Di Liddo R, Buoro S, Toniolo L, Conconi MT, Belloni AS, Parnigotto PP, Nussdorfer GG. *Med*. 2004.
32. Nakao N, Nakayama T, Yahata T, Muguruma Y, Saito S, Miyata Y, Yamamoto K, Naoe T. 2010. V. 177. No 2.
33. Анисимов СВ. *Цитология*. 2012.
34. Mishima S, Nagai A, Abdullah S, Matsuda C, Taketani T, Kumakura S, Shibata H, Ishikura H, Kim SU, Masuda J. *Haematol*. 2010.
35. Буравкова ЛБ, Жамбалова АП, Кабаева НВ, Романов ЮА. *Стволовые клетки и регенеративная медицина*. 2011.
36. Haynesworth SE, Baber MA, Caplan AI. *Cell. Physiol*. 1996.
37. Petit I, Szyper-Kravitz M, Nagler A, Lahav M, Peled A, Habler L, Ponomaryov T, Taichman RS, Arenzana-Seisdedos F, Fujii N, et al. *Nat*.

- Immunol.* 2002.
38. Kim JW, Kim SY, Park SY, Kim YM, Kim JM, Lee MH, Ryu HM. *Ann. Hematol.* 2004.
 39. Шахпазян НК, Астрелина ТА, Яковлева МВ. *Клеточная трансплантология и тканевая инженерия.* 2012.
 40. Маслова ЕВ, Андреева ЕР, Андрианова ИВ, Бобылева ПИ, Романов ЮА и др. *Клеточные технологии в биологии и медицине.* 2013.
 41. McNiece I, Harrington J, Turney J, Kellner J, Shpall EJ. *Cytotherapy.* 2004.
 42. Andreeva ER, Andrianova IV, Sotnezova EV, Buravkov SV, Bobyleva PI и др. *PLoS One.* 2015.
 43. Shima H, Takubo K, Iwasaki H, Yoshihara H, Gomei Y, Hosokawa K, Arai F, Takahashi T, Suda T. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2009.
 44. Roy S, Tripathy M, Mathur N, Jain A, Mukhopadhyay A. *Eur. J. Haematol.* 2012.
 45. Tursky ML, Collier FM, Ward AC, Kirkland MA. *Cytotherapy.* 2012.
 46. Ploemacher RE, van der Sluijs JP, Voerman JS, Brons NH. *Blood.* 1989.
 47. Jing D, Wobus M, Poitz DM, Bornhäuser M, Ehninger G, Ordemann R. *Haematologica.* 2012. V. 97. No 3. P. 331–339.
 48. Сотнезова ЕВ, Андреева ЕР, Григорьев АИ, Буравкова ЛБ. Экспансия гемопоэтических стволовых и прогениторных клеток пуповинной крови *ex vivo.* *Acta Naturae.* 2016. №3 (30).
 49. Закон України “Про захист тварин від жорстокого поводження” від 21.02.2006 р., No 3447-IV. Відом. Верховної Ради Укр. 2006;27:230.
 50. Общие этические принципы работы с экспериментальными животными при проведении медицинских и биологических исследований. Національний конгрес з біоетики (Київ 17-20 верес. 2001 р.). Журн. АМН Укр. 2001;7(4):814-6.
 51. Малоштан ЛМ, Рядних ОК, Жегунова ГП та ін. Фізіологія з основами анатомії людини: Підручн. 2003.
 52. Lutsik OD. *Gistologiya lyudini.* 2013.

53. Білаш СМ, Борута НВ, Шепітько ВІ, Єрошенко ГА, Лисаченко ОД. Сучасні погляди на структурну організацію червоного кісткового мозку, особливості перебігу захворювань його та медико-біологічне значення препаратів з плацентарної тканини. 2017.