

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ «КИЄВО-МОГИЛЯНСЬКА АКАДЕМІЯ»

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

ПАХАРЕНКО МАРГАРИТА ВІКТОРІВНА

УДК 576.535+616.411+612.119+57.086.833.4

ДИСЕРТАЦІЯ

**«ГЕТЕРОГЕННІСТЬ ГЕМОПОЕТИЧНИХ КЛІТИН-ПОПЕРЕДНИКІВ У
КУЛЬТУРІ КЛІТИН *IN VITRO* ТА *IN VIVO* У НОРМІ ТА ПРИ
МІЄЛОДИСПЛАСТИЧНОМУ СИНДРОМІ»**

Спеціальність 091 – Біологія

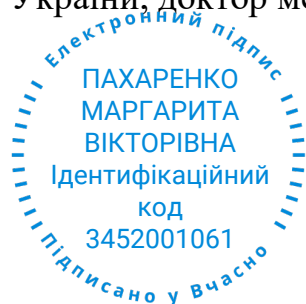
Галузь знань 09 – Біологія

Подається на здобуття наукового ступеня доктора філософії

Дисертація містить результати власних досліджень. Використані ідеї, результати і тексти інших авторів мають посилання на відповідне джерело.

 М. В. Пахаренко

Науковий керівник: **Білько Надія Михайлівна**, заслужений працівник освіти України, доктор медичних наук, професор



КИЇВ – 2023

АНОТАЦІЯ

Пахаренко М. В. Гетерогенність гемопоетичних клітин-попередників у культурі клітин *in vitro* та *in vivo* у нормі та при мієлодиспластичному синдромі.
– Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора філософії в галузі знань 09 «Біологія» за спеціальністю 091 «Біологія». Національний університет «Києво-Могилянська Академія», Київ, 2023.

Експериментальні дані останніх років свідчать про те, що злоякісні стовбурові клітини можуть існувати як самостійні популяції відносно клітин, які знаходяться у стані спокою, і зовсім не реагують на звичайні клітинно-токсичні агенти. Відомо, що більшість стовбурових клітин у дорослому організмі перебувають у стані G_0 , що дозволяє клітинам довготривало перебувати у гемопоетичних нішах та у разі потреби переходити до проліферації. Завдяки знаходженню поза клітинним циклом стовбурові клітини більш стійкі до ушкоджень ДНК. Ця особливість «сплячих» стовбурових клітин дає змогу зберегти «золотий запас» від всіляких стресових подій і тим самим сприяти лікуванню. Разом з тим існує популяція гемопоетичних клітин-попередників, на рівні яких відбувається реалізація процесів проліферації і диференціювання, оскільки вони є чутливими до дії цитокінів, які викидаються у випадку нестачі клітин крові на периферії. Роль гемопоетичних клітин-попередників недооцінена, і вона виявилася вагомішою, ніж вважалося раніше. Незважаючи на те, що завдяки використанню мишиних моделей з'являється все більше доказів про існування стовбурових клітин, що ініціюють лейкемію, менш відомо про зміни на рівні компартменту стовбурових клітин у пацієнтів з мієлодиспластичним синдромом (МДС). Хоча припускається, що МДС є «захворюванням стовбурових клітин», вагомі докази цього твердження досі відсутні, крім того, лишається невідомим рівень пошкодження гемопоетичних

клітин-попередників у пацієнтів із МДС, що складають цілу групу попередників, які відрізняються за відстанню їх від стовбурової клітини. Крім того, незважаючи на описані хромосомні аномалії, мутації і епігенетичні зміни при МДС, що спостерігаються в попередниках, етапи розвитку, на яких відбуваються патогенні події, ще не визначені. Для вирішення цих питань необхідні нові методичні підходи для виявлення різних типів клітин-попередників завдяки фенотипуванню і/чи культивуванню ранніх гемопоетичних клітин.

Доцільність визначення морфологічних і функціональних показників гемопоетичних клітин-попередників з кісткового мозку мишей, щурів і людини обумовлена необхідністю поглиблення знань про особливості їх функціонування, вирішення питання про гетерогенність клітин-попередників у різних ссавців і людини, як загальне виявлення біологічної природи і потенцій у культурі клітин *in vitro* і *in vivo* в нормі і порушеннях гемопоезу. Тож метою дисертаційної роботи було визначення гетерогенності гемопоетичних клітин-попередників в культурі *in vitro* і *in vivo* для з'ясування їхньої ролі у формуванні патологічного процесу при МДС-ІВ.

Щоб відповісти на ці питання, ми провели дослідження популяції прогеніторних клітин у пацієнтів з підтипом МДС-ІВ. Ми вивчали культури гемопоетичних стовбурових клітин в умовах *in vitro* і *in vivo*. Вперше було виявлено гетерогенну групу типів колоній (КУО-ГЕММ, КУО-Г, КУО-ГМ і КУО-ММ), ранні представники яких (КУО-ГЕММ і КУО-Г) були притаманні саме МДС-ІВ, а пізні (КУО-ГМ і КУО-ММ) – нормальному гемопоезу. Було встановлено оптимальні терміни культивування гемопоетичних клітин-попередників для людини (12-14 діб), миші (10 діб) та щура (8 діб). Було проаналізовано відповідь прогеніторних клітин на дію підвищених доз цитокінів (G-CSF, GM-CSF, IL-3) а також їх комбінації у культурі, та виявлено, що найкращий ефект викликає саме комбінація вказаних факторів, значно підвищуючи ефективність колонієутворення. Дослідженням культуральних особливостей клітин-попередників при МДС-ІВ було продемонстровано

знижену у порівнянні з нормою здатність до колонієутворення останніх, де кількість клітин у клоні не перевищувала 50, а у нормі – 500. Крім того, якісний склад колоній характеризувався наявністю хаотично розміщених примхливих форм клітин.

Вперше було продемонстровано, що наявність стромальної підложки зі здорових кісткомозкових клітин не впливає на дефектність гемопоетичних клітин-попередників при МДС-ІВ. У свою чергу, фідерний шар з кісткомозкових клітин осіб з МДС здатний до підтримки гемопоетичних клітин від здорових осіб. Тож, дефекти кровотворної функції слід шукати у гемопоетичних клітинах-попередниках з урахуванням їх гетерогенності. У майбутньому вирішення поставлених питань сприятиме у підборі тактики лікування злоякісних захворювань крові, серед яких МДС має особливе місце, як захворювання, що з високою імовірністю може переростати у гостру мієлоїдну лейкемію. Результати роботи можна рекомендувати для експериментальних досліджень МДС-ІВ. Отримані у культурі дані про МДС-ІВ можуть у комбінації з клінічними, цитогенетичним, лабораторними та імунофенотиповими даними слугувати додатковою ознакою при постановці діагнозу МДС у ініціальній стадії.

Ключові слова: гетерогенність, мієлодиспластичний синдром, метод культивування *in vitro* та *in vivo*, кінетика розвитку патологічного процесу у культурі, клітинні механізми, морфологія клітин, фактори росту, міграція клітин-попередників, клітини системи крові, гемопоез, проліферація, стовбурові клітини, кістковий мозок, мезенхіма, цитокіни.

ABSTRACT

Pakharenko M. V. Heterogeneity of hematopoietic progenitor cells in cell culture in vitro and in vivo in norm and in myelodysplastic syndrome. – Qualifying scientific work as a manuscript.

Thesis for the degree of Doctor of Philosophy in the field of knowledge 09 "Biology" in the speciality 091 "Biology". National University of "Kyiv-Mohyla Academy", Kyiv, 2023.

Experimental data from recent years suggest that malignant stem cells can exist as independent populations relative to cells that are at rest and do not respond at all to conventional cellular toxic agents. It is known that most stem cells in an adult organism are in the G0 state, which allows cells to stay in hematopoietic niches for a long time and, if necessary, proceed to proliferation. Due to being outside the cell cycle, stem cells are more resistant to DNA damage. This feature of "dormant" stem cells makes it possible to preserve the "gold reserve" from all sorts of stressful events and thereby promote treatment. At the same time, there is a population of hematopoietic progenitor cells, at the level of which the processes of proliferation and differentiation occur, since they are sensitive to the action of cytokines, which are ejected in the event of a shortage of blood cells in the periphery. The role of hematopoietic progenitor cells is underestimated, and it turned out to be more significant than previously thought. Although more evidence of leukemia-initiating stem cells is emerging through the use of mouse models, less is known about changes at the level of stem cell compartment in patients with myelodysplastic syndrome (MDS). Although it is assumed that MDS is a "stem cell disease", there is still no strong evidence of this statement, in addition, the level of damage to hematopoietic progenitor cells in patients with MDS, which constitute a whole group of progenitors that differ in their distance from the stem cell, remains unknown. In addition, despite the described chromosomal abnormalities, mutations and epigenetic changes in MDS observed in progenitors, the stages of development at which pathogenic events occur have not yet been determined. To solve these issues, new methodological approaches are needed to identify different types of progenitor cells and solve questions that can be answered through phenotyping and/or culturing early hematopoietic cells.

The expediency of determining the morphological and functional parameters of hematopoietic progenitor cells from the bone marrow of mice, rats and humans is due to the need to deepen knowledge about the peculiarities of their functioning, to address the issue of heterogeneity of progenitor cells in different mammals and humans, as a general identification of the biological nature and potentials in cell culture *in vitro* and *in vivo* in normal and disorders of hematopoiesis. Therefore, the aim of the dissertation was to determine the heterogeneity of hematopoietic progenitor cells *in vitro* and *in vivo* to clarify their role in the formation of the pathological process in MDS-IB.

To answer these questions, we studied the population of progenitor cells in patients with MDS-IB subtype. We studied hematopoietic stem cell cultures *in vitro* and *in vivo*. For the first time, a heterogeneous group of colony types (CFU-GEMM, CFU-G, CFU-GM and CFU-MM) was identified, the early representatives of which were characteristic of MDS-IB, and the later ones – of normal hematopoiesis. The optimal terms of cultivation of hematopoietic progenitor cells for humans (12-14 days), mice (10 days) and rats (8 days) were established. The response of progenitor cells to high doses of cytokines (G-CSF, GM-CSF, IL-3) and their combination in culture was analyzed, and it was found that the combination of these factors has the best effect, significantly increasing the efficiency of colony formation. The study of the cultural characteristics of progenitor cells in MDS-IB demonstrated a reduced ability to colony formation of the latter compared to the norm, where the number of cells in a clone did not exceed 50, and in the norm – 500. In addition, the qualitative composition of the colonies was characterized by the presence of chaotically arranged capricious cell forms.

For the first time, it was demonstrated that the presence of a stromal substrate of healthy bone marrow cells does not affect the defectiveness of hematopoietic progenitor cells in MDS-IB. In turn, the feeder layer of bone marrow cells from individuals with MDS is capable of supporting hematopoietic cells from healthy individuals. Therefore, defects in hematopoietic function should be sought in hematopoietic progenitor cells, taking into account their heterogeneity. In the future,

the resolution of these issues will help in the selection of treatment tactics for malignant blood diseases, among which MDS has a special place as a disease that is highly likely to develop into acute myeloid leukemia. The results of this work can be recommended for experimental studies of MDS-IB. The data obtained in culture on MDS-IB can, in combination with clinical, cytogenetic, laboratory and immunophenotypic data, serve as an additional feature in the diagnosis of MDS in the initial stage.

Key words: heterogeneity, myelodysplastic syndrome, method of cultivation *in vitro* and *in vivo*, kinetics of pathological process development in culture, cell mechanisms, cell morphology, growth factors, migration of progenitor cells, blood system cells, hematopoiesis, proliferation, stem cells, bone marrow, mesenchyme, cytokines.

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА

Праці, в яких опубліковано основні наукові результати дисертації

1. **Пахаренко МВ**, Білько ДІ, Третяк НМ, Стародуб ГС, Лагоднюк ІЮ, Білько НМ. Функціональна активність кровотворних клітин-попередників при мієлодиспластичному синдромі в умовах *in vitro*. Наукові записки НаУКМА. Біологія і екологія. 2020;3:48-52. DOI:10.18523/2617-4529.2020.3.48-52 (*Наукове фахове видання України, категорія Б*) (Здобувач особисто проводила експериментальні дослідження, брала участь у написанні тексту статті та висновків)

2. Білько ДІ, **Пахаренко МВ**, Білько НМ. Здатність до утворення колоній клітин-попередників кісткового мозку в культурі *ex vivo* хворих на мієлодиспластичний синдром. Наукові записки НаУКМА. Біологія і екологія. 2021;4:21-25. DOI:10.18523/2617-4529.2021.4.21-25 (*Наукове фахове видання України, категорія Б*) (Здобувач особисто проводила експериментальні дослідження, брала участь у написанні тексту статті та висновків)

3. Стародуб ГС, Кубарова ВО, Горяїнова НВ, Третяк НМ, Гордієнко АІ, Басова ОВ, Білько НМ, **Пахаренко МВ**. Визначення ризику трансформації мієлодиспластичного синдрому в гостру мієлоїдну лейкемію за показником функціональної активності клітин кісткового мозку. Гематологія і переливання крові: Міжвідомчий збірник. 2021;41:259-269. DOI:10.33741/0435-1991.41.22 *(Наукове фахове видання України, категорія Б) (Здобувач особисто проводила дослідження культуральних особливостей гемопоетичних клітин-попередників осіб з МДС, брала участь у написанні тексту статті та висновків)*

4. Білько ДІ, **Пахаренко МВ**. Особливості функціонування гемопоетичних клітин-попередників кісткового мозку хворих на мієлодиспластичний синдром у культурі *in vitro* і в гелевих дифузійних камерах *in vivo*. Наукові записки НаУКМА. Біологія і екологія. 2022;5:33-38. DOI:10.18523/2617-4529.2022.5.33-38 *(Наукове фахове видання України, категорія Б) (Здобувач особисто проводила експериментальні дослідження, брала участь у написанні тексту статті та висновків)*

5. Білько ДІ, Чайковський ЮБ, Руссу ІЗ, **Пахаренко МВ**, Лагоднюк ІЮ, Білько НМ. Морфофункціональні характеристики гемопоетичних клітин-попередників кісткового мозку у гуманізованій культуральній системі *in vivo*. Фізіол. журн. 2022;68(2):14-22. DOI:10.15407/fz68.02.014 *(Стаття індексується у базі Scopus, Q4) (Здобувач особисто проводила частину експериментальних досліджень, брала участь у написанні тексту статті)*

Наукові праці, які засвідчують апробацію матеріалів дисертації

1. **Пахаренко М. В.**, Стародуб Г. С. Гетерогенність гемопоетичних клітин-попередників осіб, хворих на мієлодиспластичний синдром, у культурі *in vitro* / Тези конференції. Науково-практична конференція молодих вчених «Фундаментальна медицина: інтегральні підходи до терапії хворих з

онкопатологією», 4–5 лютого 2019 року, м. Київ, Україна, Онкологія. Том 21, № 1; с. 70.

2. **Пахаренко М. В.**, Стародуб Г. С., Лагоднюк І. Ю. Функціональна активність гемопоетичних клітин-попередників при мієлодиспластичному синдромі у культурі клітин *in vitro*. Збірник. II науково-практична internet-конференція з міжнародною участю «Механізми розвитку патологічних процесів і хвороб та їхня фармакологічна корекція», 21 листопада 2019 року, м. Харків, Україна, С. 281.

3. Білько Д.І., Руссу І. З., **Пахаренко М. В.**, Білько Н. М. Морфологічні та функціональні особливості гемопоетичних клітин-попередників в умовах культивування у мікрооточенні, сформованому мезенхімальними стромальними стовбуровими клітинами щурів, опромінених у сублетальній дозі. Тези доповідей / уклад. В. В. Михайловський. XXVI Щорічна наукова конференція Інституту ядерних досліджень НАН України, 8-12 квітня 2019 року, Київ, Україна, С. 141.

4. **Пахаренко М.**, Лагоднюк І., Стародуб Г., Третяк Н., Білько Н. Морфологічна характеристика гемопоетичних клітин-попередників хворих на мієлодиспластичний синдром у культурі клітин *in vitro*. Молодь і поступ біології: збірник тез доповідей XVI Міжнародної наукової конференції студентів і аспірантів, присвяченої 75 річниці створення біологічного факультету Львівського національного університету та 90 річниці від дня народження проф. М.П. Деркача (м. Львів, 27-29 квітня 2020р.). – Львів: Галицька Видавнича спілка, 2020. – С. 183-184.

5. **Pakharenko M**, Starodub H, Lahodniuk I, Tretiak N, Bilko N. Morphofunctional characteristics of hematopoietic progenitor cells in myelodysplastic syndrome in culture *in vitro*. Medicina. ABSTRACTS accepted for the International Scientific Conference on Medicine organized within the frame of the 78th International Scientific Conference of the University of Latvia. 12 March 2020. Riga, Latvia. Vol.56, Supp.1. – p.5.

6. Bilko N, Sniezhkova Ye, Bilko D, **Pakharenko M**, Russu I. The influence of orally administered nanostructural highly activated charcoal on functional activity of hematopoietic progenitor cells in the culture of diffusion chambers *in vivo*. Medicina. ABSTRACTS accepted for the International Scientific Conference on Medicine organized within the frame of the 78th International Scientific Conference of the University of Latvia. 12 March 2020. Riga, Latvia. Vol.56, Supp.1. – p.17.

7. Bilko N, **Pakharenko M**, Lahodniuk I, Bilko D, Horiainova N, Starodub H, Tretiak N. Features Of Functioning Of Hematopoietic Bone Marrow Progenitor Cells In Mds, Which Is Transformed Into Acute Myeloblastic Leukemia. 25th Congress of the European Hematology Association (Virtual Edition 2020) : Abstract Book / European Hematology Association. - [S. l. : Wolters Kluwer Health], June 11-14 2020. - Vol. 4, Issue S1 - P. 900.

8. **Pakharenko M**, Bilko D. Evaluation of hematopoietic progenitor cells potential in patients with myeloproliferative diseases *in vitro*. Medicina. ABSTRACTS accepted for the International Scientific Conference on Medicine organized within the frame of the 79th International Scientific Conference of the University of Latvia. 10 February 2021. Riga, Latvia. Vol.57, Supp.1. – p.13.

9. **Пахаренко М.** Морфофункціональні особливості гемопоетичних клітин-попередників хворих на мієлодиспластичний синдром та гостру мієлоїдну лейкемію у культурі клітин *in vitro*. Молодь і поступ біології: збірник тез доповідей XVII Міжнародної наукової конференції студентів і аспірантів (м. Львів, 19-21 квітня 2021р.). – Львів: ТОВ «Ромус-поліграф», 2021. – С. 172.

10. **Pakharenko M**, Bilko D, Lahodniuk I. Morphofunctional characteristics of hematopoietic progenitor cells of human bone marrow in a humanized *in vivo* model // Medicina. Abstracts of the International Scientific Conference on Medicine organized within the frame of the 80th International Scientific Conference of the University of Latvia. 11 February 2022. Riga, Latvia. Vol.58, Supp.1. – p.186.

11. Бутенко Є. С., **Пахаренко М. В.** Альтернативні джерела стовбурових клітин з кісток різної локалізації. Збірник матеріалів конференції. IV науково-

практична конференція студентів та молодих вчених з міжнародною участю «Від експериментальної та клінічної патофізіології до досягнень сучасної медицини і фармації» 19 травня 2022 р., Харків, Україна. С. 101-102.

12. **Pakharenko M**, Lahodniuk I, Starodub H. Hematopoietic progenitor cells in normal and dysplastic hematopoiesis. Programme/Abstracts. XXIII. Wilsede Meeting on Modern Trends in Human Leukemia and Cancer, June 24-27, 2023, Wilsede, Germany. P.74.

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ.....	15
ВСТУП.....	16
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....	22
1.1. Гемопоез ссавців у нормі та роль стовбурових клітин у цьому процесі.....	22
1.2. Регуляція кровотворення гемопоетичним мікрооточенням.....	26
1.3. Мієлодиспластичний синдром – загальна характеристика та особливості.....	35
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ.....	45
2.1. Отримання кісткового мозку досліджуваних ссавців.....	45
2.1.1. Виділення клітин кісткового мозку миші та щура.....	45
2.1.2. Отримання суспензії кісткомозкових клітин ссавців. Оцінка життєздатності та підрахунок кількості кровотворних клітин.....	46
2.1.3. Культивування клітин кісткового мозку ссавців <i>in vitro</i>	47
2.1.4. Оцінка колонієутворення кровотворними клітинами ссавців.....	47
2.1.5. Підготовка препаратів гемопоетичних клітин ссавців і їх морфологічна оцінка.....	48
2.1.5.1. Підготовка препаратів культивованих клітин (pick-up).....	48
2.1.5.2. Підготовка цитоцентрифужних препаратів клітин кісткового мозку.....	48
2.1.5.3. Підготовка препаратів клітин периферійної крові лабораторних тварин.....	48
2.1.5.4. Забарвлення препаратів лабораторних тварин за Паппенгеймом	48
2.2. Виділення і культивування клітин кісткового мозку людини в нормі і порушенні гемопоезу.....	49
2.2.1. Забір і визначення показників кісткового мозку та периферійної крові пацієнтів із МДС.....	50
2.2.2. Культивування клітин <i>in vitro</i> у напіврідкому агарі.....	51
2.2.3. Культивування клітин <i>in vitro</i> у метилцелюлозі.....	51
2.2.4. Аналіз результатів культивування у напіврідкому середовищі <i>in vitro</i>	52
2.2.5. Цитохімічне визначення мієлопероксидазної активності в препаратах, культивованих у напіврідкому середовищі <i>in vitro</i>	52
2.2.6. Культивування клітин у суспензійній культурі <i>in vitro</i>	53
2.2.7. Аналіз результатів культивування у суспензійній культурі <i>in vitro</i>	53

2.3. Культивування клітин <i>in vivo</i> у дифузійних камерах з напіврідким агаром.....	54
2.3.1. Підготовка тварин-реципієнтів до оперування.....	54
2.3.2. Культивування гемопоетичних клітин-попередників у дифузійних камерах <i>in vivo</i>	54
2.3.3. Дослідження морфологічних особливостей клітин кісткового мозку після культивування <i>in vivo</i>	55
2.4. Культивування гемопоетичних клітин на стромальному фідері.....	56
2.4.1. Отримання фідерного шару з клітин кісткового мозку.....	56
2.4.2. Культивування гемопоетичних клітин у дифузійних камерах у присутності стромального фідерного шару <i>in vitro</i>	57
2.5. Статистична обробка результатів дослідження.....	58
РОЗДІЛ 3. ОСОБЛИВОСТІ КОЛОНІЄУТВОРЕННЯ ГЕМОПОЕТИЧНИХ КЛІТИН-ПОПЕРЕДНИКІВ МИШІ, ЩУРА І ЛЮДИНИ У ГЕЛЕВИХ ДИФУЗІЙНИХ КАМЕРАХ <i>IN VIVO</i>	59
3.1. Кінетика формування клітинних агрегатів із кісткового мозку, вилученого у людини і ссавців, у культурі гелевих дифузійних камер <i>in vivo</i>	59
3.2. Гетерогенність гемопоетичних клітин-попередників, отриманих з кісткового мозку людини і ссавців у культурі гелевих дифузійних камер.....	66
РОЗДІЛ 4. ВИВЧЕННЯ ОСОБЛИВОСТЕЙ ГЕМОПОЕЗУ У ПАЦІЄНТІВ З МДС-ІВ В КУЛЬТУРІ <i>IN VITRO</i>	69
4.1. Процедура отримання біологічного матеріалу.....	69
4.2. Аналіз кількісних і якісних показників периферійної крові хворих на МДС-ІВ.....	70
4.3. Оцінка морфологічного складу препаратів кісткового мозку обстежених осіб.....	71
4.4. Особливості функціонування гемопоетичних клітин-попередників в культурі <i>in vitro</i>	72
РОЗДІЛ 5. ВИЗНАЧЕННЯ ГЕТЕРОГЕННОСТІ ВМІСТУ КОЛОНІЙ ГЕМОПОЕТИЧНИХ КЛІТИН-ПОПЕРЕДНИКІВ В КУЛЬТУРІ З МЕТИЛЦЕЛЮЛОЗОЮ <i>IN VITRO</i> ПРИ МДС-ІВ.....	78
5.1. Аналіз різних типів колоній, які утворювались у культурі мононуклеарів з кісткового мозку хворих на МДС-ІВ <i>in vitro</i>	78
5.2. Порівняльний аналіз колонієутворення гемопоетичних клітин-попередників, отриманих з кісткового мозку хворих на МДС-ІВ і контрольної групи осіб при культивуванні в умовах <i>in vitro</i>	81

5.3. Порівняльний аналіз різних типів колонієутворення у контрольної групи осіб <i>in vitro</i> і <i>in vivo</i>	86
5.4. Порівняльний аналіз різних типів колонієутворення у групи осіб з МДС-ІВ <i>in vitro</i> і <i>in vivo</i>	87
РОЗДІЛ 6. ДОСЛІДЖЕННЯ ВЗАЄМОДІЇ ГЕМОПОЕТИЧНИХ І СТРОМАЛЬНИХ КЛІТИН-ПОПЕРЕДНИКІВ ПРИ МДС-ІВ У ДОВГОТРИВАЛІЙ КУЛЬТУРІ <i>IN VITRO</i>	89
6.1. Визначення ефективності використання стромальної підложки для підтримки гемопоезу у гелевих дифузійних камерах, занурених у культуру <i>in vitro</i>	89
6.2. Вивчення впливу строми, сформованої з адгерентних клітин кісткового мозку хворих на МДС-ІВ і у нормі на колонієутворюючу здатність гемопоетичних клітин-попередників в культурі дифузійних камер <i>in vitro</i>	94
РОЗДІЛ 7. ВПЛИВ РЕКОМБІНАНТНИХ ЦИТОКІНІВ НА КОЛОНІЄУТВОРЮЮЧУ ЗДАТНІСТЬ ГЕМОПОЕТИЧНИХ КЛІТИН-ПОПЕРЕДНИКІВ ПРИ МДС <i>IN VITRO</i>	96
7.1. Кінетика формування клітинних агрегатів із кісткового мозку контрольної групи осіб у живильному середовищі із різними факторами росту.....	96
7.2. Вплив різних факторів росту і їх комбінації на КУО-ГМ при МДС-ІВ в культурі <i>in vitro</i>	97
РОЗДІЛ 8. АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ.....	99
ВИСНОВКИ.....	107
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	109
ДОДАТОК 1. СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА.....	125
ДОДАТОК 2. Витяг з протоколу засідання комітету з етики наукових досліджень НаУКМА.....	129

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

- ГКП – гемопоетичні клітини-попередники;
ГСК – гемопоетична стовбурава клітина;
КМ – кістковий мозок;
КУО – колонієутворююча одиниця;
КУО-Г – колонієутворююча одиниця гранулоцитарна;
КУО-ГЕММ – колонієутворююча одиниця гранулоцитарно-еритроїдно-мегакаріоцитарна;
КУО-ГМ – колонієутворююча одиниця гранулоцитарно-макрофагальна;
КУО-М – колонієутворююча одиниця макрофагальна;
МДС – мієлодиспластичний синдром;
МДС-ІВ – мієлодиспластичний синдром із підвищеним умістом бластів;
СК – стовбурава клітина.

ВСТУП

Обґрунтування вибору теми дослідження. Експериментальні дані останніх років свідчать про те, що злоякісні стовбурові клітини можуть існувати як самостійні популяції відносно клітин, які знаходяться у стані спокою, і зовсім не реагують на звичайні клітинно-токсичні агенти. Відомо, що більшість стовбурових клітин у дорослому організмі перебувають у стані G_0 , що дозволяє клітинам довготривало перебувати у гемопоетичних нішах та у разі потреби переходити до проліферації. Завдяки знаходженню поза клітинним циклом стовбурові клітини більш стійкі до ушкоджень ДНК [142]. Ця особливість «сплячих» стовбурових клітин дає змогу зберегти «золотий запас» від всіляких стресових подій і тим самим сприяти лікуванню. Разом з тим існує популяція гемопоетичних клітин-попередників, на рівні яких відбувається реалізація процесів проліферації і диференціювання, оскільки вони є чутливими до дії цитокінів, які викидаються у випадку нестачі клітин крові на периферії. Роль гемопоетичних клітин-попередників була недооцінена у реалізації патологічного процесу при порушеннях гемопоезу, на тепер вона виявилася вагомішою, ніж вважалося раніше. Незважаючи на те, що завдяки використанню мишиних моделей з'являється все більше доказів про існування стовбурових клітин, що ініціюють лейкемію, менш відомо про зміни на рівні компартменту стовбурових клітин у пацієнтів з мієлодиспластичним синдромом (МДС). На долю МДС з надлишком бластів (МДС-ІВ) припадає 40 % випадків МДС [124]. Причина виникнення МДС залишається до кінця невизначеною, але можна з впевненістю сказати, що це клональне захворювання зі змінами, які сталися завдяки мутаціям, що призвели до цитогенетичних порушень і охоплюють відділ стовбурової клітини. Проте єдиної точки зору щодо ролі гемопоетичних клітин-попередників, найближчих нащадків стовбурової клітини і прогностичної цінності клональних культуральних методів досліджень при мієлодиспластичному синдромі (МДС) немає [41]. Припускають, що сигнальні

шляхи, що регулюють проліферацію, диференціювання та чутливість до апоптозу ГСК та клітин-попередників КМ в процесі еволюції захворювання задіяні і при МДС [70].

Незважаючи на припущення, що МДС є «захворюванням стовбурових клітин», вагомі докази цього твердження досі відсутні, крім того, невідомий рівень пошкодження гемопоетичних клітин-попередників у пацієнтів із МДС, що складають цілу групу попередників, які відрізняються за відстанню їх від стовбурової клітини і відповіддю на дію цитокінів. Більше того, незважаючи на описані хромосомні аномалії, мутації і епігенетичні зміни при МДС, що спостерігаються в попередниках, етапи розвитку, на яких відбуваються патогенні події, ще не визначені. Дискусійним залишається питання про місце строми у формуванні патологічного процесу при МДС.

Для вирішення цих питань необхідні нові методичні підходи виявлення різних типів клітин-попередників, в тому числі завдяки фенотипуванню і/чи культивуванню ранніх гемопоетичних клітин.

Доцільність визначення морфологічних і функціональних показників гемопоетичних клітин-попередників з кісткового мозку мишей, щурів і людини в нормі і порушенні гемопоезу, в умовах впливу мікрооточення зумовлена необхідністю поглиблення знань про особливості їх функціонування, вирішення питання про гетерогенність клітин-попередників у різних ссавців і людини, як загальне виявлення біологічної природи і потенцій у культурі клітин *in vitro* і *in vivo* в нормі і у разі порушень гемопоезу.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Робота була виконана у рамках державних тем кафедри лабораторної діагностики біологічних систем Національного університету «Києво-Могилянська академія»: «Роль компонентів мікрооточення у моделюванні гемопоетичної ніші *in vitro*» (№ держреєстрації: 0116U004704, 02.2016-12.2017 рр.) та «Оцінка морфологічних та функціональних особливостей клітин-попередників при злоякісному процесі» (№ держреєстрації: 0119U103427, 09.2019-09.2024 рр.).

Мета і завдання дослідження. *Об'єкт:* дослідження особливостей культуральних і цитологічних характеристик гемопоетичних клітин-попередників при МДС-ІВ і у нормі в культурі *in vitro in vivo*. *Предмет:* властивості гемопоетичних клітин-попередників хворих на МДС-ІВ, культивованих *in vitro* і *in vivo*.

Метою дисертаційної роботи було визначення гетерогенності гемопоетичних клітин-попередників в культурі *in vitro* і *in vivo* для з'ясування їхньої ролі у формуванні патологічного процесу при МДС-ІВ.

Для реалізації мети були поставлені наступні *завдання*:

1. Вивчити кількісні і якісні показники кісткового мозку хворих на МДС-ІВ і порівняти їх з контролем.
2. Визначити різні типи колоній гемопоетичних клітин-попередників миші, щура і людини в культурі клітин *in vitro* і *in vivo*.
3. Зробити морфологічну оцінку вмісту культивованих колоній.
4. Зробити аналіз залежності кількості мононукларів з кісткового мозку пацієнтів з МДС з кількістю колоній, культивованих *in vitro*.
5. Визначити вплив цитокінів (G-CSF, GM-CSF і IL-3) на ефективність колонієутворення гемопоетичних клітин-попередників при МДС-ІВ і у контрольної групи осіб в культурі *in vitro*.
6. Отримати стромальні підложки з кістковомозкових клітин пацієнтів з МДС-ІВ і контрольної групи осіб.
7. Дослідити вплив на проліферативну активність гемопоетичних клітин-попередників стромальних підложок, отриманих від пацієнтів з МДС-ІВ і контрольної групи осіб.
8. Визначити роль гетерогенності гемопоетичних клітин-попередників на перебіг МДС.

Методи дослідження. У дисертаційній роботі було використано методи культивування стовбурових клітин-попередників у нормі та при МДС-ІВ у культурах *in vitro* та *in vivo*; методи забарвлення клітин за Паппенгеймом;

цитохімічний метод забарвлення клітин на виявлення активності мієлопероксидази за Loele; метод культивування мезенхімальних стромальних клітин; метод культивування у гелевих дифузійних камерах на стромальних підложках; метод центрифугування; метод інвертованої та світлової мікроскопії; статистичні методи обробки отриманих результатів.

Наукова новизна отриманих результатів. Вперше, на підставі культуральних досліджень, отримані дані про гетерогенність гемопоетичних клітин-попередників у культурі. Виявлена наявність 4 типів колоній: КУО-ГЕММ, КУО-Г, КУО-ГМ і КУО-ММ у людини, миші і щура, яка розглядається, як загальнобіологічне явище. Проте показано, що при МДС-ІВ переважають ранні попередники КУО-ГЕММ та КУО-Г, а у нормі – пізні КУО-ММ, що пояснює залучення в патологічний процес при МДС ранніх форм попередників. Визначені оптимальні терміни колонієутворення в культурі, які відповідають для кісткового мозку мишей – 10 добам, для щура – 8 добам і для людини 12-14 добам культивування. Вперше продемонстровано на моделі з гелевими дифузійними камерами, що наявність нормальної підложки не впливає на дефектну кровотворну функцію кісткового мозку пацієнтів з МДС-ІВ в культурі, і навпаки, наявність стромальної підложки, отриманої з клітин пацієнтів з МДС-ІВ не пригнічують гемопоез в культурі нормальних гемопоетичних клітин. Визначена оптимальна концентрація цитокінів для миші, щура і людини. Вперше показано вплив подвійної концентрації цитокінів G-CSF, GM-CSF і IL-3 і їх комплексу на підвищення ефективності колонієутворення в культурі при МДС.

Практичне значення отриманих результатів. Результати дисертаційної роботи суттєво розширюють уявлення про рівень пошкодження відділу стовбурових клітин при МДС-ІВ і вказують про залучення більш примітивних рівнів клітин-попередників у патологічний процес, частково пояснюючи той факт, що вони нечутливі до дії більшості терапевтичних препаратів. Беручи до уваги, що при МДС ГКП демонструють дефектну пригнічену реакцію на цитокіни, проте, все ж таки здатні на відповідь при збільшенні дози препаратів,

і особливо, при їх комбінації. Таким чином можна рекомендувати такий підхід при вивченні цієї патології в експерименті, а при складанні лікувальних протоколів враховувати дані, отримані поза організмом, в культурі клітин. Наявність в культурі МДС дефектних клітин-попередників, які дають початок колоніям примхливої форми з обмеженою кількістю клітин і порушеннями у диференціюванні свідчить про те, що результати культуральних досліджень поруч з клінічними, лабораторними, цитогенетичними і імунофенотиповими даними можуть слугувати додатковою діагностичною ознакою при виявленні захворювання МДС на ініціальній стадії розвитку.

Особистий внесок здобувача. Дисертація, яку представляє автор, є закінченою науковою працею, в якій висвітлені власні результати. Особистий внесок автора полягає у проведенні інформаційного пошуку, підборі і обробці даних літератури, проведенні експериментальних досліджень, аналізі результатів, формулюванні висновків та їх статистичній обробці, написанні і оформленні дисертації. У наукових працях, що опубліковані у співавторстві, відбито результати спільного планування, проведення експериментів та обговорення результатів. Автору належить у спільних роботах 80% творчого доробку. Разом із науковим керівником, проф. Н. М. Білько інтерпретовано результати і сформульовано висновки.

Апробація матеріалів дисертації. Результати наукової роботи здобувачки було обговорено на всеукраїнських та міжнародних науково-практичних конференціях, а саме: Науково-практичній конференції молодих вчених «Фундаментальна медицина: інтегральні підходи до терапії хворих з онкопатологією» (4–5 лютого 2019 р., м. Київ, Україна); II науково-практичній internet-конференції з міжнародною участю «Механізми розвитку патологічних процесів і хвороб та їхня фармакологічна корекція» (21 листопада 2019 р., м. Харків, Україна); XXVI Щорічній науковій конференції Інституту ядерних досліджень НАН України (8-12 квітня 2019 р., м. Київ, Україна); XVI міжнародній науковій конференції студентів і аспірантів присвяченій 75 річниці

створення біологічного факультету та 90 річниці від дня народження М. Деркача «Молодь і поступ біології» (27 – 29 квітня 2020 р., м. Львів, Україна); International Scientific Conference on Medicine organized within the frame of the 78th International Scientific Conference of the University of Latvia (12 March 2020, Riga, Latvia); 25th Congress of the European Hematology Association (Virtual Edition 2020) (June 11-14, 2020., Frankfurt, Germany); International Scientific Conference on Medicine organized within the frame of the 79th International Scientific Conference of the University of Latvia (10 February 2021, Riga, Latvia); XVII міжнародній науковій конференції студентів і аспірантів «Молодь і поступ біології» (19-21 квітня 2021 р., м. Львів, Україна); International Scientific Conference on Medicine organized within the frame of the 80th International Scientific Conference of the University of Latvia (11 February 2022, Riga, Latvia); IV науково-практичній конференції студентів та молодих вчених з міжнародною участю «Від експериментальної та клінічної патофізіології до досягнень сучасної медицини і фармації» (19 травня 2022 р., м. Харків, Україна); XXIII Wilsede Meeting. Modern Trends in Human Leukemia and Cancer (June 24-27, 2023, Wilsede, Germany).

Публікації: Результати дисертаційного дослідження було опубліковано у 18 наукових працях, зокрема 1 – у фаховому виданні, що індексується у міжнародній наукометричній базі Scopus, 4 – у наукових фахових виданнях України, 12 – тези доповідей на конференціях.

Структура та обсяг дисертації: Дисертаційна робота складається зі вступу, 8 розділів, висновків, списку використаних джерел та 2 додатків. Робота містить 17 рисунків та 10 таблиць. Загальний обсяг роботи – 131 сторінка. Список використаних джерел (викладений на 16 сторінках) містить 142 пункти.

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Гемопоез ссавців у нормі та роль стовбурових клітин у цьому процесі

Гемопоез ссавців – це складна ієрархічна система безперервного оновлення кровотворних клітин, що ґрунтується на збалансованості процесів їхнього утворення і руйнування. Кровотворення відбувається у кістковому мозку, що розташований у стромі трубчастих та деяких плоских кісток і є тканинним поєднанням ретикулярних та стромальних клітин, у якому знаходяться гемопоетичні клітини, а також мережа капілярів [10]. Таким чином, у кістковому мозку існує високоорганізоване гемопоетичне мікрооточення, що формує «ніші», у яких знаходяться стовбурові клітини – мультипотентні клітини, здатні до самовідтворення і диференціювання у зрілі клітини крові або імунної системи [16, 142].

Під час пренатального розвитку ссавців локалізація осередків кровотворення поступово змінюється. Умовно цей процес можна розділити на мезобластичний етап (у жовтковому мішку), печінковий і медулярний, проте вони значною мірою перекриваються [98, 113].

Гемопоез ссавців починається у стінках жовткового мішка, де з'являються перші кровотворні островці. Частина гемопоетичних стовбурових клітин, які вважають клітинами 1-ї генерації, виходить у кровоносне русло та потрапляє у печінку, де починається печінковий етап гемопоезу [60]. Тут утворюються стовбурові клітини 2-ї генерації, що потрапляють у тимус, селезінку та кістковий мозок, і таким чином починається медулярний етап гемопоезу [114].

У постнатальному періоді кровотворення центральним органом системи гемопоезу стає кістковий мозок; у ньому знаходяться стовбурові клітини 3-ї генерації [102]. Проте тимус, селезінка та лімфовузли також залишаються задіяними у цьому процесі, оскільки у них відбувається дозрівання Т- і В-

лімфоцитів. Невелика частина кровотворних клітин-попередників також циркулює у периферійній крові.

У кістковому мозку в результаті поділу і диференціювання проліферативного пулу гемопоетичних стовбурових клітин та клітин-попередників утворюються усі клітини крові – гранулоцити, еритроцити, мегакаріоцити, лімфоцити, моноцити [62]. Дані деяких досліджень свідчать про те, що перш ніж перейти до мієлоїдного і лімфоїдного напрямку диференціювання, гемопоетичні стовбурові клітини здатні дати початок мієлоеритроїдним та мієлолімфоїдним клітинам-попередникам [15, 61].

Кістковий мозок щосекунди продукує значну кількість кровотворних клітин більш ніж 10 різних типів протягом всього життя людини [114]. За стабільних умов щогодини утворюється близько 10 млн. червоних клітин крові та близько 1 млн. білих клітин крові, і у той же час суворо контролюється кількість зрілих клітин усіх паростків гемопоезу, що циркулюють у периферійній крові [110].

Дослідження кількості гемопоетичних стовбурових клітин у кістковому мозку, проведене методом лімітуючих розведень, свідчить, що цей показник знаходиться в межах від $1 \times 10\ 000$ до $1 \times 100\ 000$ клітин [50].

Кістковий мозок містить не лише гемопоетичні клітини, а й мезенхімальні стромальні клітини, що формують гемопоетичне мікрооточення, забезпечують підтримуючу функцію і продукують ростові фактори, які впливають на поділ та дозрівання кровотворних клітин [27]. Крім того, у створенні гемопоетичної ніші та регуляції функціонування стовбурових клітин активну участь беруть васкулярні ендотеліальні клітини [121].

Дослідження структури кістковомозкових ніш дозволило виявити деякі відмінності у розташуванні стовбурових клітин та клітин-попередників, а саме: перші схильні перебувати у мікрооточенні, збагаченому синусоїдами та мегакаріоцитами, а останні знаходяться ближче до поверхні кістки, де міститься більше капілярів [73, 112].

Гемопоетичні стовбурові клітини володіють високою здатністю до самовідновлення [16]. Більшість стовбурових клітин у дорослому організмі перебувають у стані G_0 , що дозволяє клітинам довготривало перебувати у гемопоетичних нішах та у разі потреби переходити до проліферації. Завдяки знаходженню поза клітинним циклом стовбурові клітини більш стійкі до ушкоджень ДНК [142]. У відповідь на системну потребу або певне ушкодження ці стовбурові клітини здатні переходити до асиметричного поділу, що дозволяє отримати більш диференційовані клітини [20].

Порівняно невелика частина гемопоетичних стовбурових клітин (вважається, що близько 5 %) постійно перебуває у мітотичному циклі, тобто готова до поділу та диференціювання. Дочірні клітини, які утворилися, можуть або слугувати самовідновленню (підтримка компартменту стовбурових клітин), або диференціюватися та переходити на стадію клітин-попередників. Крім того, гемопоетичні стовбурові клітини можуть напряду переходити до подальшого диференціювання, без клітинного поділу [53].

Для збалансованої регенерації органів і тканин та гомеостазу загалом стовбурові клітини повинні проходити чітко визначену послідовність етапів, на кожному з яких здійснюється вибір подальшого шляху – виживання клітини чи клітинна загибель, поділ клітини чи стан спокою, диференціювання чи самовідновлення, міграція чи її відсутність. Ці процеси мають бути суворо контрольованими, інакше може відбутися виснаження пулу стовбурових гемопоетичних клітин і розлад кровотворення, або ж надмірна проліферація і неконтрольована експансія клітин [84].

Стовбурові кровотворні клітини морфологічно доволі гомогенні. Вони характеризуються експресією певних поверхневих маркерів, зокрема, CD34 та CD133, Sca-1, c-Kit, а також lin^- , проте кількість та варіабельність маркерів дуже залежить від стадії диференціювання кровотворних клітин [27]. Вважається, що першим на мембрані стовбурових клітин з'являється маркер CD34, а потім антиген гістосумісності II класу (HLA-DR) [72].

За підрахунками деяких дослідників, маркер CD34 експресується у 0,2–3 % ядровмісних клітин кісткового мозку, кордової крові та мобілізованої периферійної крові [72]. Більш примітивні клітини, отримані при дослідженні субпопуляцій Lin[–] CD34⁺, експресують поверхневий антиген CD59, рецептор васкулярного ендотеліального ростового фактора-2 (VEGFR2), а також незначні рівні c-Kit (CD117), Thy-1 (CD90) та поверхневого антигену CD38 [72].

CD133 є важливим поверхневим антигеном гемопоетичних стовбурових клітин людини – з його допомогою можна з великою ймовірністю відібрати саме CD34-позитивні клітини, адже зазвичай серед CD133-позитивних клітин буде більше 90 % клітин із маркером CD34 [52].

Стовбурові клітини відрізняються не тільки за поверхневими маркерами, що формують їх фенотип, а й за тим, у якій стадії клітинного циклу знаходяться, а також різною відповіддю на ті чи інші регуляторні сигнали, що надходять від гемопоетичного мікрооточення [30]. Тому на сьогодні методи виявлення гемопоетичних стовбурових клітин зазвичай базуються на дослідженні їхніх функціональних властивостей, оскільки фенотипові характеристики цих клітин доволі нестабільні. Навіть високоочищені популяції гемопоетичних стовбурових клітин доволі гетерогенні щодо здатності до диференціювання та кінетики репопуляції, що підтверджує значимість клональних методів досліджень [16].

Поки що залишається відкритим питання, як формуються субпопуляції у пулі стовбурових клітин – шляхом генетичного програмування під час їхнього розвитку або ж внаслідок впливу зовнішніх регуляторних факторів та відповідних кровотворних ніш [30].

Гемопоетичні стовбурові клітини можна умовно розділити на два типи: клітини із довготривалою репопулюючою здатністю (LT-HSC), що здатні забезпечувати самовідновлення і мають потенціал до диференціювання протягом всього життя, а також клітини із короткотривалою репопулюючою здатністю (ST-HSC), які походять від LT-HSC та володіють більш обмеженим потенціалом до самовідновлення, хоча зберігають мультипотентність [90].

Особливу зацікавленість викликають стовбурові клітини, що володіють довготривалою репопулюючою здатністю (LT-HSC), тому значну увагу приділяють розробці підходів, які дозволяють їх виявити [32, 34].

Клітини системи крові можна розподілити на п'ять класів – мультипотентні стовбурові клітини, поліпотентні та біпотентні, уніпотентні клітини-попередники, а також клас морфологічно розпізнаваних клітин (бласти, дозріваючі і зрілі) [138]. Мультипотентні стовбурові клітини вступають у диференціювання стохастично та потребують наявності гемопоетичного мікрооточення, що сприяє їх підтримці. Поліпотентні і біпотентні клітини володіють нижчим потенціалом до поділу та диференціювання. Їх функціонування регулюється факторами росту і колонієстимулюючими факторами. Уніпотентні клітини-попередники здатні диференціюватися лише в одному напрямку, наприклад, мегакаріоцитарному [134].

Таким чином, система гемопоезу, центральним органом якої у дорослому організмі є кістковий мозок, здійснює постійне оновлення пулу клітин крові за рахунок наявності мультипотентних стовбурових клітин та клітин-попередників. На відміну від стовбурових клітин, гемопоетичні клітини-попередники є більш комітованими і не мають здатності до тривалого постійного самовідтворення. Процес кровотворення регулюється ростовими факторами, що синтезуються гемопоетичним мікрооточенням.

1.2. Регуляція кровотворення гемопоетичним мікрооточенням

Проліферація і диференціювання гемопоетичних клітин у кістковому мозку регулюється кровотворним мікрооточенням, що складається із мезенхімальних стромальних клітин, а також адипоцитів, остеобластів, ендотеліальних і ретикулярних клітин та макрофагів [119, 51]. Клітини, які формують гемопоетичні ніші, продукують значну кількість юстакринних і

паракринних сигналів – зокрема, це ростові фактори, хемокіни, цитокіни, морфогени та молекули адгезії [59].

Мультипотентні мезенхімальні стромальні клітини є критично важливими у регуляції стовбурової клітинної ніші та у підтримці гемопоетичних клітин [11]. Завдяки цим властивостям їх активно використовують як новітній терапевтичний інструмент у лікуванні захворювань системи кровотворення [54]. Зокрема, котрансплантація мезенхімальних стовбурових клітин разом із гемопоетичними підвищує їх здатність до приживлення [88]. На сьогодні відомо, що склад стромальних клітин кісткового мозку не менш різноманітний, ніж його гемопоетичний компартмент, проте ієрархічні відносини між різними видами стромальних клітин і вплив кожного з них на кровотворення поки що досліджені недостатньо [22].

Одними із ключових модулаторів функціонування кровотворних стовбурових клітин та їх нащадків є клітини-похідні остеобластів. Ці клітини створюють спеціалізовані лімфоїдні ніші, підтримують дозрівання В-клітин, а також необхідні для утворення Т-лімфоцитів [139, 75]. Результати ряду експериментів підтверджують те, що активація остеобластів призводить до експансії пулу гемопоетичних стовбурових клітин та підвищує їх довготривалу репопулюючу здатність [23, 123].

Однак серед клітин, які формують гемопоетичне мікрооточення у кістковому мозку, є також ті, що володіють інгібіторним впливом щодо кровотворних клітин – це адипоцити [95]. Оскільки вони є негативними регуляторами процесу кровотворення, можна припустити, що фактори, які інгібують адипогенез у кістковому мозку, можуть сприяти відновленню гемопоезу, зокрема, після трансплантації [104].

Варто зазначити, що гемопоетичні стовбурові клітини та клітини-попередники не є пасивними мішенями екзокринних сигналів, адже вони активно впливають на функціонування ніші та підтримують власну мультипотентність і здатність до самовідновлення [59].

Належне функціонування гемопоетичних клітин визначається як знаходженням у відповідній ніші, так і дією регуляторних факторів, більшість із яких синтезується у кістковому мозку [77]. Деякі з них утворюються у нирках та печінці (наприклад, еритропоетин і тромбопоетин); також вони можуть вироблятися клітинами імунної системи.

Частина із цих молекул є розчинними і можуть впливати на гемопоетичні клітини без прямого контакту із стромою, проте деякі є мембранозв'язаними і діють лише при безпосередній взаємодії між клітинами. Зокрема, відомо, що при втраті такого контакту із стромою стовбура клітина починає диференціюватися, оскільки перестають діяти фактори, які забезпечували її перебування у недиференційованому стані [24].

Ростові фактори впливають на гемопоетичні стовбурові клітини та клітини-попередники через мембранні рецептори, що зумовлює їхню проліферацію і диференціювання. На різних стадіях цього процесу гемопоетичні клітини володіють чутливістю до різних цитокінів, оскільки у процесі дозрівання змінюється набір відповідних мембранних рецепторів на їхній поверхні [126].

Для кожного паростка кровотворення характерні свої ростові фактори, проте є цитокіни із доволі широким спектром дії, що здатні впливати на більшість гемопоетичних клітин на різних стадіях їх дозрівання. Одна і та сама клітина може синтезувати різні види цитокінів, а один і той же цитокін може синтезуватися різними клітинами.

Зазвичай фактори, що діють на ранніх етапах гемопоезу та впливають безпосередньо на стовбурові клітини, виокремлюють у групу ранньодіючих. У той же час фактори, що взаємодіють із більш диференційованими клітинами, називають пізньодіючими.

Серед чинників, які діють на кровотворення, присутні інтерлейкіни, колонієстимулюючі фактори (КСФ), еритропоетин і тромбопоетин, а також фактор некрозу пухлин (TNF), фактор стовбурових клітин (SCF, ліганд Kit), ліганд Flt-3. Більшість із них належить до родини цитокінів, проте ліганд Flt-3,

SCF, та макрофагальний КСФ належать до лігандів рецепторних тирозинкіназ. Крім того, на функціонування гемопоетичних клітин впливають сигнальні шляхи Wnt і Notch [113, 119].

Слід зазначити, що усім цим факторам притаманний складний характер дії, адже один цитокін може володіти декількома різними ефектами, а декілька різних цитокінів – однаковими ефектами. Умовно їх можна розподілити на ті, що мають широкий спектр дії, та ті, що специфічні лише для певної групи клітин [111].

SCF, відомий також як ліганд Kit, steel-фактор, або ж фактор росту тучних клітин, продукується стромальними клітинами кісткового мозку. Він діє як на стовбурові клітини, прискорюючи їх входження у клітинний цикл, так і на клітини-попередники. Загалом SCF діє як ко-стимулятор інших цитокінів, оскільки їхня дія значно посилюється при поєднанні з цим фактором [67, 112].

Ліганд Flt-3 також володіє тирозинкіназною активністю. Його рецептор Flt-3 (CD135) експресується більшою мірою на міелоїдних клітинах-попередниках, проте його виявляють і на лімфоїдних клітинах. Самотужки ліганд Flt-3 не здатен підтримувати колонієутворення гемопоетичних клітин, та він стає ефективним при поєднанні з Г-КСФ, а також інтерлейкіном-3 та SCF [89].

TNF (або ще кахексин) є цитокіном, що існує у трансмембранній та розчинній формі. Його мембранна форма присутня в основному на моноцитах/макрофагах. Основна роль TNF – це регуляція функціонування імунних клітин. Крім того, він стимулює фагоцитоз та є хемоатрактантом для нейтрофільних гранулоцитів. TNF продукується макрофагами значною мірою у відповідь на дію інтерлейкіну-1 [127].

Інтерлейкін-1 – це надродина з 11 цитокінів, що беруть участь у регуляції кровотворення, імунній відповіді та реакціях запалення. Ці цитокіни продукуються моноцитами, макрофагами, В-лімфоцитами, дендритними клітинами, а також фібробластами та епітеліальними клітинами. Інтерлейкін-1

активує Т-лімфоцити, зумовлює дозрівання В-лімфоцитів, активує NK-клітини; крім того, він є кофактором інтерлейкіну-3 та інтерлейкіну-6 [21]. Він також впливає на стромальні клітини кровотворного мікрооточення.

Дуже суттєвим фактором впливу на функціонування гемопоетичних клітин є інтерлейкін-3. Його ще називають мульти-КСФ, адже він індукує проліферацію і диференціювання як ранніх плюрипотентних стовбурових клітин, так і більш диференційованих клітин-попередників. Інтерлейкін-3 продукується активованими Т-хелперами, тучними клітинами, еозинофілами, NK-клітинами. Також він сприяє росту тучних клітин і вивільненню гістаміну [126].

Фактором, що активно впливає на диференціювання гемопоетичних стовбурових клітин, є інтерлейкін-6. Його продукують макрофаги, Т-хелпери, В-лімфоцити та клітини ендотелію. Інтерлейкін-6 також сприяє диференціюванню В-клітин у плазматичні клітини, секреції антитіл плазматичними клітинами, а також бере участь у реакціях запалення [63].

Стромальні клітини кісткового мозку синтезують інтерлейкін-7, що впливає на проліферацію і диференціювання лімфоїдних клітин-попередників [133, 66].

Серед інтерлейкінів чимало тих, які регулюють функціонування саме клітин лімфоїдного ряду. Зокрема, інтерлейкін-10, який вважається протизапальним цитокіном, продукується моноцитами, макрофагами, Т- і В-клітинами та тучними клітинами, сприяє активації В-клітин, стимуляції Т-хелперів, а також продукції цитокінів макрофагами [135]. Інтерлейкін-8 діє на лімфоцити, а також на нейтрофільні і базофільні гранулоцити. Його продукують макрофаги, лімфоцити, епітеліальні й ендотеліальні клітини [91].

Важливим компонентом цитокінового сигналювання в імунній системі є інтерлейкін-2, оскільки він регулює активність лейкоцитів та лімфоцитів. Зв'язуючись із відповідними рецепторами на їх поверхні, інтерлейкін-2 активує В-лімфоцити та NK-клітини, а також є фактором росту Т-лімфоцитів [109, 66].

Він зумовлює диференціювання Т-клітин у ефекторні Т-лімфоцити і Т-клітини пам'яті [14].

Інтерлейкін-4 продукується Т-хелперами, тучними клітинами і макрофагами. Він діє на активовані В-клітини, Т-клітини, моноцити та клітини ендотелію [46]. Крім того, макрофаги синтезують інтерлейкін-15, що теж впливає на Т-клітини і активовані В-клітини та індукує продукцію NK-клітин [79].

Т-лімфоцити синтезують інтерлейкін-9 та інтерлейкін-14, що діють на В-клітини. Інтерлейкін-9 також впливає на Т-лімфоцити і тучні клітини [42]. У регуляції диференціювання В-клітин важливу роль відіграють також інтерлейкін-5 та інтерлейкін-13, які продукуються Т-хелперами і тучними клітинами. Інтерлейкін-13 діє на моноцити та здатний пригнічувати продукцію макрофагами прозапальних цитокінів [46], а інтерлейкін-5 сприяє продукції еозинофільних гранулоцитів [122].

Інтерлейкін-12 впливає на диференціювання активованих Т-лімфоцитів у цитотоксичні Т-клітини. Його синтезують Т- і В-клітини, макрофаги та дендритні клітини [131].

Важливими регуляторними чинниками у процесі гемопоезу є колонієстимулюючі фактори – макрофагальний (М-КСФ), гранулоцитарний (Г-КСФ) [74], гранулоцитарно-макрофагальний (ГМ-КСФ). Г-КСФ та М-КСФ є відносно лінієспецифічними, тоді як ГМ-КСФ і мульти-КСФ діють на рівні примітивних гемопоетичних клітин і зумовлюють їхню експансію та дозрівання [19]. Вони продукуються в основному строною кісткового мозку. Ці фактори стимулюють проліферацію гемопоетичних клітин-попередників та сприяють їх диференціюванню [67].

З описаних вище факторів до ранньодіючих можна віднести інтерлейкін-1, інтерлейкін-3, інтерлейкін-6, SCF і TNF. Крім того, слід зазначити, що інтерлейкін-1 і TNF здатні індукувати синтез Г-КСФ і ГМ-КСФ.

Еритропоетин здатний стимулювати проліферацію і диференціювання комітованих клітин-попередників еритропоезу. Він впливає на еритроїдні бурстутворюючі одиниці (БУО-Е), активізуючи їх поділ і диференціювання, а також проеритробласти і базофільні еритробласти [33]. Еритропоетин необхідний для належної проліферації і диференціювання КУО-Е.

Мегакаріоцитопоез також відбувається за участю еритропоетину, адже він сприяє диференціюванню клітини-попередника мегакаріоцитів [58]. Відомо, що рецептори до еритропоетину присутні не тільки на еритроїдних і мегакаріоцитарних клітинах-попередниках, а й на гемопоетичних стовбурових клітинах, стромальних та ендотеліальних клітинах.

Тромбопоетин, який ще називають *mpl*-ліганд, є регулятором не тільки мегакаріоцитопоезу. Він здатний діяти на гемопоетичні клітини різних стадій розвитку. Тромбопоетин продукується стромальними клітинами кісткового мозку, а також клітинами нирок і печінки. Тромбопоетин відіграє певну роль у еритропоезі, зумовлюючи проліферацію і диференціювання еритроїдних клітин [103].

Серед сигнальних шляхів, що беруть участь у регуляції функціонування гемопоетичних стовбурових клітин, найбільш вивченими є *Wnt* і *Notch* [113, 117].

Відомо, що гемопоетичні стовбурові клітини експресують *Notch1*. Крім того, такі сигнальні інтермедіати *Notch*-шляху, як *Notch1*, *Notch3* а також їх ліганди *Jagged1* і *Dll1*, експресуються остеобластами, що свідчить про *Notch*-опосередкований обмін сигналами у межах кістковомозкової ніші [23, 99]. Проте роль *Notch1* та інших рецепторів цього шляху в регуляції стовбурової клітинної ніші залишаються не до кінця з'ясованими. Однак точно відомо те, що існує безпосередній зв'язок між *Notch*- і *Wnt*-сигналюванням, що, швидше за все, відіграє свою роль на ранніх етапах кровотворення [113].

Сигнальний шлях *Wnt* є радше групою з кількох високо-консервативних сигнальних шляхів, що передають паракринні і аутокринні сигнали між

клітинами та забезпечують їх диференціювання. Виокремлюють один т. зв. канонічний Wnt-шлях та два неканонічні. У процесах самовідновлення гемопоетичних стовбурових клітин беруть участь усі вищезазначені Wnt-шляхи [83]. Проте відомо, що неканонічний ліганд Wnt5a здатний інгібувати канонічний Wnt-шлях, хоч так само сприяє самовідновленню стовбурових клітин [97]. У той же час Ctnnb1, що може вважатися первинною мішенню Wnt-сигналювання, сприяє самовідновленню гемопоетичних клітин, однак, швидше за все, інгібує їх диференціювання [70]. Відомо також, що Ctnnb1 та інші інтермедіати Wnt-шляху часто надмірно експресуються на гемопоетичних клітинах при лейкемії [70].

Усе сказане вище стосується внутрішньої дії Wnt-сигналів безпосередньо на стовбурові клітини. Проте існують дані, які підтверджують можливість їх зовнішнього впливу – через стромальні клітини. Наприклад, зростання експресії Ctnnb1 у цих клітинах підвищує самопідтримку і приживлення гемопоетичних стовбурових клітин [96].

До чинників, що впливають на кровотворення у кістковому мозку, належать також гормони і паракринні фактори, зокрема, паратироїдний гормон, естроген і простагландин E2 [94]. Гемопоетичні стовбурові клітини та клітини-попередники не володіють рецепторами до паратироїдного гормону, тож він діє на них опосередковано – через остеобласти і остеокласти [23].

У той же час естроген впливає на гемопоетичні клітини напряму, оскільки стовбурові клітини володіють рецепторами до цього гормону, проте він здійснює свій вплив і опосередковано, через клітини гемопоетичної ніші [94].

Простагландин E2 здатний діяти напряму на гемопоетичні стовбурові клітини, оскільки вони експресують відповідні рецептори [56]. Це сприяє самовідновленню кровотворних стовбурових клітин та їх хоумінгу, а також інгібує апоптоз.

Загалом можна стверджувати, що нормальне функціонування пулу гемопоетичних клітин у кістковому мозку забезпечується спільною дією

клітинних елементів мікрооточення, регуляторних факторів, у тому числі деяких гормонів, а також сигналів, що опосередковуються нейронами.

Дуже важливим є аналіз взаємодії між мезенхімальними та кровотворними клітинами у кістковому мозку при дослідженні патологічних станів, що виникають у системі гемопоезу [139]. Наприклад, було з'ясовано, що лейкемію можуть зумовити мутації у тих клітинах-складових кісткомозкової ніші, що не є гемопоетичними – а саме, у остеобластах [71].

Результати нещодавніх досліджень підтверджують, що механізми розвитку, а також успішність терапії злоякісних захворювань гемопоетичної системи, таких як мієлодиспластичні синдроми, гостра мієлоїдна лейкемія, мієлопроліферативні неоплазми, залежать не тільки від особливостей самих злоякісних клітин, а й від дії кісткомозкового мікрооточення [73, 65].

Дослідження мезенхімальних стромальних клітин у осіб із МДС дозволило виявити порушення у їх функціонуванні, що можуть призводити до розвитку цього захворювання. Так, було проаналізовано Wnt-шлях сигналювання у кісткомозковій ніші та виявлено зміни у регуляції канонічного і неканонічного Wnt-шляхів, а також дефектне диференціювання клітин у остеогенному та адипогенному напрямках. У той же час застосування терапевтичних агентів, що здатні активувати канонічний Wnt-сигналінг, підвищило проліферацію кісткомозкових клітин [70].

Отже, ідентифікація елементів мікрооточення та механізмів регуляції компартменту гемопоетичних клітин дозволить краще зрозуміти тканинний гомеостаз і регенерацію системи кровотворення [29]. Вивчення клітинних та молекулярних компонентів гемопоетичної ніші створює можливості для розробки новітніх терапевтичних стратегій при захворюваннях системи кровотворення, зокрема, при анеміях, дефектах коагуляції та неопластичних захворюваннях [54].

1.3. Мієлодиспластичний синдром – загальна характеристика та особливості

Мієлодиспластичний синдром – це клональне неопластичне захворювання кровотворної системи, яке характеризуються неефективним гемопоезом, дисплазією кісткового мозку та цитопенією у периферійній крові, іноді фатальною, а також високим ризиком трансформації у гостру лейкемію [17]. Так, ризик трансформації МДС у гостру мієлоїдну лейкемію становить 20 % протягом 5 років [136].

У більшості випадків МДС виникає через мутації у мультипотентних стовбурових клітинах кісткового мозку, внаслідок чого порушуються процеси диференціювання клітин та зростає рівень апоптозу. При цьому відбувається клональна експансія аномальних клітин.

Загалом мієлодиспластичні синдроми – це гетерогенна група доволі рідкісних захворювань, що виникають в основному в осіб літнього віку (близько половини пацієнтів старші за 70 років). Частота виникнення МДС в середньому становить 4 випадки на 100 000 осіб на рік [93].

Зазвичай на ранніх стадіях захворювання будь-які симптоми відсутні, а згодом можуть розвинути такі ознаки, як анемія, кровотечі, часті інфекції, спленомегалія та гепатомегалія, втрата ваги. Анемія зумовлює втомлюваність і слабкість, а тромбоцитопенія може спричинити геморагічний діатез. У близько 20 % осіб, хворих на МДС, можуть бути практично відсутні будь-які симптоми хвороби. Причинами смертності при МДС у більшості випадків стають інфекційні захворювання і геморагії [93].

МДС може бути первинним, тобто зумовленим певними успадкованими порушеннями у геномі (близько 90 % усіх випадків захворювання), або ж вторинним, набутим (близько 10 % випадків) [55].

Первинний МДС є наслідком незворотного прогресуючого клонального порушення у гемопоетичних стовбурових клітинах, нащадки яких

диференціюються і дозрівають, проте отримані з них клітини крові функціонально і структурно неповноцінні [36]. Кістковий мозок при МДС може бути гіперклітинним або гіпоклітинним; у той же час у периферійній крові спостерігається різке падіння кількості еритроцитів, лейкоцитів та тромбоцитів [36]. Це зумовлено аномальною проліферацією клітин і блокадою їх диференціювання [81]. Як правило, найбільш типовим видом цитопенії при МДС є анемія; найрідше зустрічаються випадки захворювання із тромбоцитопенією [140].

Зазвичай МДС розвивається із невеликої популяції гемопоетичних стовбурових клітин, що містять певні мутації геному та характеризуються порушеннями у його епігенетичній регуляції. Ці клітини здатні персистувати в організмі людини і внаслідок неопластичної проліферації роблять свій внесок у прогресію цього захворювання [118]. Так, було з'ясовано, що гемопоетичні стовбурові клітини із клональним порушенням можуть продовжувати персистувати в організмі хворого на МДС навіть за наявності повної морфологічної ремісії після терапії агентами, що регулюють метилювання ДНК (азацитидин і воріностат) [132].

Стовбурові клітини при первинному МДС володіють рядом поверхневих маркерів, зокрема, таких як CD99, CD123, IL1RAP [118]. У випадку МДС високого ризику гемопоетичні стовбурові клітини можуть також мати ознаки, що притаманні фенотипово примітивним клітинам – Lin⁻, CD34⁺, CD38, CD90⁺ [132], а також CD49f⁺ та CD45RA⁻ [115].

Вторинний МДС виникає внаслідок дії певного мутагену, наприклад, при терапії ряду захворювань (хвороби Ходжкіна, неходжкінської лімфоми, множинної мієломи) або у результаті дії певного токсичного агента, зокрема, бензену чи толуолу. Доведеним також є вплив на появу МДС таких сполук, як алкілюючі хіміотерапевтичні агенти, а також інгібітори ДНК-топоізомерази II [55]. Крім зазначених вище чинників, до факторів ризику також належать вплив іонізуючої радіації, наприклад, при радіотерапії, а також дія важких металів –

ртуті і свинцю [93]. Також появі МДС може сприяти терапія автоімунних розладів.

Іноді окремо виділяють саме ті випадки захворювання на МДС, де доведеним є їх виникнення внаслідок терапії (t-МДС, therapy-related) [26]. Дослідники стверджують, що частка таких захворювань може становити 20 % від загальної кількості.

Для діагностики МДС зазвичай застосовують кількісний і якісний аналіз клітин периферійної крові, біоптатів і аспіратів кісткового мозку, цитогенетичні дослідження гемопоетичних клітин, виявлення одонуклеотидних поліморфізмів у цих клітинах, тести на наявність соматичних мутацій, проточну цитометрію та імунофенотипування, FISH і клоногенні дослідження (колонієутворення) [31, 41]. Ефективним є також застосування молекулярних маркерів, що дозволяють виявити генетичні зміни, які спричиняють ту чи іншу форму цього захворювання. Крім того, завдяки дослідженню геному визначені прогностичні маркери, на основі яких можна робити припущення про подальший перебіг МДС і підбирати оптимальні терапевтичні підходи [31].

Діагностування МДС може бути утрудненим через значну кількість інших факторів, що здатні зумовити цитопенію. Іноді МДС розвивається паралельно із іншим захворюванням, наприклад, MDS/MPN (MDS/MPN overlap syndromes, тобто поєднання МДС та мієлопроліферативних неоплазм), що дуже ускладнює діагностику [107, 47, 35]. Точний діагноз повинен базуватися на поєднанні клінічних даних та морфологічних досліджень гемопоетичних клітин, а також імунофенотипування і генетичного тестування [48].

Загалом, «золотим стандартом» у діагностуванні МДС є цитоморфологія периферійної крові та кісткового мозку, цитогенетика із диференційним забарвленням хромосом (G-бендинг), гістоморфологія і аналіз соматичних мутацій [93].

Схеми класифікації МДС базуються на таких критеріях, як морфологічні особливості гемопоетичних клітин і їх вміст, рівень дисплазії, наявність кільцевих сидеробластів [85], фіброз і гіпоклітинність кісткового мозку [48].

За ФАБ-класифікацією 1982 р. було виокремлено 5 форм МДС: рефрактерна анемія; рефрактерна анемія з надлишком бластів; рефрактерна анемія з надлишком бластів у трансформації; рефрактерна анемія з кільцевими сидеробластами; хронічна мієломоноцитарна лейкемія [55].

Наприкінці 1990-х рр. експерти ВООЗ розробили класифікацію МДС, яка включала, поряд із морфологічними ознаками патологічних клітин, дані цитогенетичного, молекулярно-генетичного та імуноцитологічного аналізу. У 1999 р. було опубліковано удосконалену класифікацію пухлин гемопоетичної і лімфоїдної тканин, внаслідок чого з'явилися нові категорії МДС. Таким чином, виокремили 8 форм МДС: рефрактерна анемія; рефрактерна анемія з кільцевими сидеробластами; рефрактерна цитопенія з мультилінійною дисплазією; рефрактерна цитопенія з мультилінійною дисплазією та кільцевими сидеробластами; рефрактерна анемія з надлишком бластів; МДС некласифікований; МДС, асоційований з ізольованою делецією *del(5q)* [45, 129].

У 2008 р. ВООЗ розробила нову схему класифікації пухлин гемопоетичної та лімфоїдної тканин, у якій більшою мірою враховувалися дані генетичних досліджень, проте також бралася до уваги морфологія гемопоетичних клітин периферійної крові і кісткового мозку [124, 137, 25]. Так, за класифікацією 2008 р. виокремлювали 7 форм МДС: рефрактерні цитопенії (зокрема, рефрактерна анемія, рефрактерна нейтропенія, рефрактерна тромбоцитопенія), рефрактерна анемія з кільцевими сидеробластами, рефрактерна цитопенія з мультилінійною дисплазією, рефрактерна анемія з надлишком бластів, МДС некласифікований, МДС, асоційований з *del(5q)*, рефрактерна анемія дитячого віку [40, 130].

Згодом було ідентифіковано ряд унікальних біомаркерів, пов'язаних із певними мієлоїдними неоплазмами та гострими лейкеміями, в основному завдяки аналізу експресії генів і сиквенсу нового покоління [44]. Внаслідок цього

з'явилася змога значно покращити діагностичні критерії при МДС, а також оцінити прогностичну значимість тих категорій захворювань, які були включені у загальну класифікацію [13].

У 2016 р. було розроблено та опубліковано 4-ту класифікацію ВООЗ мієлодиспластичних неоплазм, що представляє перегляд попередньої класифікації, радше ніж нову класифікацію, і включає нові клінічні, прогностичні, морфологічні, імунофенотипові та генетичні дані [18]. У цій класифікації як найбільш важливі критерії ідентифікації різних форм МДС використовують не тип цитопенії, а ступінь вираженості дисплазії та відсотковий вміст бластних клітин у крові та кістковому мозку.

Згідно з цією класифікацією, виділяють 7 форм МДС: МДС із однолінійною дисплазією (МДС-ОЛД); МДС із кільцевими сидеробластами (МДС-КС, в межах цієї підгрупи існують варіанти МДС-КС із однолінійною дисплазією та МДС-КС із мультилінійною дисплазією); МДС із мультилінійною дисплазією (МДС-МЛД); МДС із надлишком бластів (МДС-НБ); МДС некласифікований (МДС-Н); МДС із ізольованою хромосомою *del(5q)* (так званий 5q синдром); рефрактерна цитопенія дитячого віку [13, 49]. У сучасній класифікації ВООЗ рефрактерна цитопенія дитячого віку залишається як попередня нозологічна форма.

Дедалі більшого значення у класифікації типів МДС набувають генетичні особливості клітин, зокрема, наявність цитогенетичного маркера *del(5q)*, мутація *SF3B1* та мутація *TP53* [78].

У 2022 р. були опубліковані класифікація ICC (International Consensus Classification) і 5-та класифікація ВООЗ (WHO-класифікація, WHO5). Згідно з цією класифікацією, усі форми МДС тепер вважаються мієлодиспластичними неоплазмами, що характеризуються цитопенією і морфологічною дисплазією [39, 141]. Їх розподіляють на ті, що мають конкретні генетичні аномалії, та ті, що мають певні характеристики морфологічного характеру [69].

До групи МДС із генетичними аномаліями належать 3 форми захворювання: МДС із низьким вмістом бластів та ізольованою делецією 5q (МДС-5q); МДС із низьким вмістом бластів і мутацією *SF3B1* (МДС- *SF3B1*); МДС із біалельною інактивацією *TP53* (МДС- bi*TP53*) [13].

До групи МДС, які визначаються за морфологічними ознаками, належать 4 форми захворювання: МДС із низьким вмістом бластів (МДС-LB); МДС гіпопластичний (МДС-h); МДС із підвищеним умістом бластів (МДС-IB); МДС із фіброзом (МДС-f) [69, 64].

Такі зміни у класифікації є наслідком того, що більшого значення надають саме генетично зумовленим типам захворювання, тоді як менше наголошують на тих ознаках групування, які використовували раніше для виокремлення груп ризику (вміст бластів, наявність кільцевих сидеробластів, кількість паростків кровотворення із дисплазією) [69]. У той же час для визначення ризиків надають перевагу більш комплексним схемам, таким як IPSS-R (Міжнародна прогностична система оцінки для МДС, Revised International Prognostic Scoring System for MDS) [43, 78].

Визначення типу МДС на основі генетичних та молекулярних особливостей захворювання має критичне значення для вибору терапевтичної стратегії і прогнозування перебігу хвороби [48].

У подальшому, швидше за все, класифікація МДС відбуватиметься саме на основі типів генетичних порушень у клітинах, проте їхні морфологічні характеристики також слід брати до уваги, оскільки вони відображають фенотиповий прояв наявних генетичних аномалій [48].

Вважається, що переважна більшість випадків захворювання на МДС зумовлена певними порушеннями у геномі – це можуть бути цитогенетичні аномалії, мутації генів та аномальна експресія генів [57].

Згідно з даними деяких досліджень, характерні генетичні аномалії виявляються у 90 % осіб із МДС [31, 80]. На сьогодні виявлено близько 50 генів, мутації у яких можуть бути пов'язані із МДС. За деякими оцінками, клональні

цитогенетичні аномалії присутні у 50-60 % осіб із МДС. Найчастіше серед них трапляються делеції хромосом 5q та 7q, моносомія 7, трисомія 8, а також складні каріотипи [57].

Генетичні мутації, які були виявлені у осіб із МДС, зазвичай стосуються тих генів, що забезпечують сплайсинг РНК, наприклад, гени *SF3B1*, *SRSF2*, *U2AF1*, *ZRSR2*, *LUC7L2*, *DDX41* [28, 68]. Найчастіше це мутація гену *SF3B1*, тож на основі цього виокремлюють таку форму захворювання, як МДС із низьким вмістом бластів та мутацією *SF3B1* (МДС-*SF3B1*) [86, 87]. Крім того, трапляються випадки МДС із мутацією гена *TP53*; цю форму захворювання називають МДС із біалельною інактивацією *TP53* (МДС-*biTP53*). Мутацію *TP53* зазвичай пов'язують із агресивністю перебігу захворювання; вона часто виявляється паралельно з делецією хромосоми 5q [57, 80, 106].

Наявність певних соматичних мутацій у геномі підвищує ризик появи МДС – йдеться про мутації у таких генах, як *DNMT3A*, *TET2* і *ASXL1* [37].

Новітні геномні технології, такі як однонуклеотидний поліморфізм та секвенування нового покоління, дозволили виявити ще один ряд мутацій, які також залучені до патогенезу МДС [100]. Ідеться про гетерозиготні делеції, що зумовлюють гаплонедостатність експресії генів (наприклад, гени *CSNK1A1*, *DDX41* на хромосомі 5 та гени *CUX1*, *LUC7L2*, *EZH2* на хромосомі 7) [57].

Дані ряду доклінічних досліджень свідчать про те, що МДС високого ризику та споріднена з ним гостра мієлоїдна лейкемія характеризуються одними й тими ж генетичними аномаліями. Гостра мієлоїдна лейкемія, що має риси, близькі до МДС, відрізняється від *de novo* лейкемії саме наявністю таких хромосомних аномалій, як делеції 5q, 7/7q, 20q, що типові і для МДС [140, 105].

Слід зазначити, що окрім генетичних порушень, у гемопоетичних клітинах хворих на МДС виявляються епігенетичні зміни, зокрема, порушення у профілях метилювання ДНК [132]. Генетичні мутації, які зумовлюють ці порушення епігенетичних процесів, найчастіше стосуються генів модифікації гістонів

(наприклад, *ASXL1* та *EZH2*), а також генів метилювання ДНК (TET2, DNMT3A, IDH1/IDH2) [57, 80].

Гетерогенна природа МДС вимагає комплексних і персоналізованих терапевтичних підходів. Лікувальні алгоритми при МДС залежать від коректної діагностики та точних прогностичних стратегій [31]. Прогноз перебігу захворювання здійснюється на основі міжнародної прогностичної системи IPSS-M (Molecular International Prognostic Scoring System), що бере до уваги усі ризики, зокрема, наявність соматичних мутацій [93].

За наявності МДС низького ризику терапія зазвичай спрямована на подолання цитопенії та запобігання ускладненням, таким як кровотечі і складні інфекції. Крім того, важливим є усунення наслідків частих трансфузій, а саме, застосування препаратів для хелатування заліза. При МДС високого ризику головною метою лікування є модифікувати перебіг захворювання, обмежити його прогресію та покращити показники виживаності пацієнтів [108].

До терапевтичних підходів при МДС належить, у першу чергу, аlogenна трансплантація гемопоетичних стовбурових клітин, що може сприяти повному одужанню, проте не завжди можлива для пацієнтів літнього віку. Поширеним також є застосування ростових факторів, наприклад, еритропоєтину і гранулоцитарного колонієстимулюючого фактора [55].

Доволі ефективними є гіпометилюючі агенти (азацитидин), імуномодулюючі препарати та підтримуюча терапія – трансфузія еритроцитів разом з препаратами для хелатування заліза, а також застосування тромбоцитарної маси [120, 93].

Ефективність гіпометилюючих агентів (5-азацитидин і децитабін) при лікуванні МДС пояснюється тим, що саме метилювання ДНК є критичним у регуляції експресії генів, а втрата контролю за цим процесом може призвести до неконтрольованої проліферації клітин кісткового мозку [38].

Ці підходи не можуть забезпечити повне одужання пацієнтів із МДС, проте вони підвищують якість їхнього життя, запобігаючи цитопенії та подальшій прогресії захворювання.

Серед цитопеній, які присутні при МДС, більш поширеною є анемія, і її доволі успішно лікують агентами, що стимулюють еритропоез. Проте тромбоцитопенія і нейтропенія, що трапляються рідше, і досі потребують розробки більш ефективних препаратів для терапії [108].

Інгібітори ДНК-метилтрансферази забезпечують належний профіль метилювання ДНК у гемопоетичних клітинах і сповільнюють прогресію МДС до гострої мієлоїдної лейкемії [128, 38].

Оскільки клітини при МДС доволі швидко проліферують і можуть мати високу теломеразну активність, ефективним виявився препарат іметелстат, що є інгібітором теломерази [116].

Деякі препарати застосовуються лише для пацієнтів із МДС, спричиненим конкретними мутаціями та цитогенетичними аномаліями – зокрема, леналідомід є ефективним для осіб із делецією 5q, а луспатерцепт – при мутації *SF3B1* [93].

Краще розуміння МДС високого ризику і механізмів прогресії захворювання дозволило розробити нові терапевтичні підходи, зокрема, застосування препарату венетоклакс разом із гіпометилюючими агентами, а також триплетну терапію та засоби, що ефективні при конкретних мутаціях, включно з *FLT3* і *IDH1/2* [140, 125].

МДС має складну патофізіологію, що зумовлює наявність численних мішеней потенційних терапевтичних втручань. В останні роки було досягнуто значного прогресу у розробці моделей для доклінічного вивчення МДС, що дозволило детальніше дослідити патогенез цього захворювання, а також виявити молекули-мішені у клітинах-попередниках для його подальшої таргетної терапії [118].

Загалом, вивчення гемопоетичних стовбурових клітин та клітин-попередників при МДС дозволяє виявити ті сигнальні шляхи, які можуть стати

цільми для розробки нових ефективних терапевтичних стратегій щодо цього захворювання [118].

РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1. Отримання кісткового мозку досліджуваних ссавців

2.1.1. 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, статевозрілих 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. (Додаток 2).

Евтаназію мишей проводили методом цервікальної дислокації спинного мозку у шийному відділі. Щурів виводили з експерименту у парах ефіру. Поміщали тушки тварин в ємність із 3 % розчином перексиду водню на кілька хвилин для знезараження шкіри та хвоста. Тушки висушували за допомогою стерильної марлі та поміщали в іншу ємність із 70 % розчином етилового спирту на кілька хвилин для знезараження шкіри, хутра та хвоста. Далі робили розріз на шкірі в нижній третині живота по середній лінії, продовжуючи розріз по середній лінії стегна вниз до стопи.

Для 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 стегнові кістки переносили у першу із трьох чашок Петрі діаметром 60 мм (перша та друга нестерильні, третя – стерильна). Відокремлювали м'язи від кісток та відрізали суглоб, не пошкодивши епіфізи кістки. Після цього кістку промивали кілька разів у фізіологічному розчині у двох чашках з додаванням антибіотиків пеніциліну та стрептоміцину. У другій 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.

2.1.2. Отримання суспензії кісткомозкових клітин ссавців. Оцінка життєздатності та підрахунок кількості кровотворних клітин. Для отримання суспензії моноклеарів кісткового мозку у стерильний пеніциліновий флакон за допомогою шприца на 1 мл вносили живильне середовище типу DMEM, із 9 % FBS, 1 % L-глутаміну (2мМ) та антибіотики: пеніцилін та стрептоміцин. Стерильними ножицями, 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 кісткомозковий канал. Після цього над пеніциліновим флаконом починали повільно промивати кісткомозковий 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 за температури танучого льоду (0 °C).

2.1.3. Культивування клітин кісткового мозку ссавців *in vitro*. Перед культивуванням проводили розрахунки кількості клітин для постановки експерименту у 24-лунковому планшеті. В одну лунку, об'ємом 500 мкл, вміщується суспензія наступного складу: живильне середовище DMEM, із 9 % FBS, 1 % L-глутаміну (2мМ) та з антибіотиками пеніциліном і стрептоміцином; ростовий фактор (GM-CSF) у концентрації 20 нг/мл; агар у концентрації 0,33 %; початкова суспензія з клітин. Для достовірності отриманих результатів дослідження проводили у 3 повторах, тобто використовували 3 лунки. У пусті лунки по периметру вносили по 500 мкл фізіологічно розчину для створення вологості. Культивування клітин кісткового мозку відбувалось у термостаті протягом 8 діб для щура, 10 діб для миші за умов присутності 5 % вуглекислого газу, абсолютній вологості, 37 °C.

2.1.4. Оцінка колонієутворення кровотворними клітинами ссавців. Аналіз результатів культивування кровотворних клітин проводили за допомогою інвертованого мікроскопа. Підраховували 3 види колоній – компактні, компактні з “вінчиком” (змішані) та дифузні. За колонію приймали агрегати, що містили більше 40 клітин. Клітинні агрегати, які складаються з 20 – 40 клітин, вважали

великими кластерами, а від 3 до 20 клітин – малими кластерами.

2.1.5. Підготовка препаратів гемопоетичних клітин ссавців і їх морфологічна оцінка.

2.1.5.1. Підготовка препаратів культивованих клітин (pick-up). Цей метод дозволив нам більш детально дослідити вміст однієї колонії, використовуючи світловий мікроскоп. Спочатку під інвертованим мікроскопом обирали колонію (більше 40 клітин). Потім її переносили на заздалегідь підготовлене предметне скельце та розподіляли по всій площі. Забарвлювали за Паппенгеймом та досліджували під світловим мікроскопом.

2.1.5.2. Підготовка цитоцентрифужних препаратів клітин кісткового мозку. Метод підготовки цитоцентрифужних препаратів дозволив нам провести якісний аналіз досліджуваних клітин. Для цього, нами було використано 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 під світловим мікроскопом.

2.1.5.3. Підготовка препаратів клітин периферійної крові лабораторних тварин. Нами було проведено забір периферичної 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 70 % етилового спирту. Мазки висушували на повітрі та маркували. Наступним етапом було забарвлення отриманих препаратів за Паппенгеймом та дослідження під світловим мікроскопом.

2.1.5.4. Забарвлення препаратів лабораторних тварин за Паппенгеймом. Для забарвлення мазків периферичної крові, pick-up та

цитоцентрифужних препаратів нами був використаний метод за Паппенгеймом. За допомогою забарвлення препарату найбільш чітко виявляється детальна структура як ядра, так і цитоплазми.

Забарвлення отриманих препаратів проводили під витяжною шафою (Labcaire Systems, Великобританія) із використанням гематологічних барвників. Попередньо зафіксовані препарати периферичної крові та кісткового мозку забарвлювали за методом Паппенгейма барвником-фіксатором Май-Грюнвальда (Макрохім, Україна) та барвником Романовського-Гімза (Sigma, США). Останній складається з лужної (Азур II) і кислої (еозин) частин. Азур II забарвлює структури клітин в яскраво-синій колір, а еозин – в рожево-червоний. Лужні частини клітин зв'язуються і забарвлюються кислими барвниками, а кислі – лужними.

2.2. Виділення і культивування клітин кісткового мозку людини в нормі і порушенні гемопоезу

Донорами кісткового мозку виступали умовно здорові особи, що проходили планове лікування в ДУ «Інститут травматології та ортопедії НАМН України». 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 (Додаток 2). Пацієнти надавали письмову згоду для проведення наукових досліджень з їх біологічним матеріалом. Досліджуваним матеріалом людини виступав кістковий мозок з фрагментів ребер гематологічно здорових осіб, котрі перенесли торакальну операцію. Крім того, використовували кістковий мозок, отриманий при діагностичній стернальній пункції, якщо після оцінки препаратів виявлялася відсутність онкогематологічного захворювання.

Із зразків кісткового мозку готували суспензію кістково-мозкових клітин.

Здійснювали розділення суспензії 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 750 g. Результатом центрифугування було розділення гемопоетичних клітин. Після цього вилучали мононуклеари та тричі відмивали центрифугуванням у 10 мл PBS протягом 10 хв. при 650 g. Після цього клітини змішували із живильним середовищем та проводили культивування за умов *in vitro*.

2.2.1. Забір і визначення показників кісткового мозку та периферійної крові пацієнтів із МДС. Об'єктом дослідження був кістковий мозок і периферична кров хворих з мієлодиспластичним синдромом (МДС-ІВ), що перебували на стаціонарному лікуванні гематологічного відділення ДУ «Інститут гематології і трансфузіології». До досліджуваної групи входили пацієнти, яким діагноз було встановлено вперше. Всі пацієнти перед початком дослідження підписували добровільну інформовану згоду.

За час виконання роботи було проведено дослідження біологічного матеріалу у культурі клітин *in vitro* та *in vivo* від 20 пацієнтів.

Забір кісткового мозку здійснював лікар шляхом стернальної пункції за допомогою голки Касирського та стерильного шприца. 2 мл КМ відбирали у пробірку, що містила середовище для культивування DMEM (Sigma, США) та гепарин (Sigma, США); (у співвідношенні 9:1, відповідно), із дотриманням асептичних умов. Матеріал транспортували за температури 0°C.

З метою отримання фракції мононуклеарів суспензію клітин спочатку розводили розчином PBS (Sigma, США) у співвідношенні 1:3 для зменшення його щільності, а потім центрифугували протягом 30 хвилин при 750 g у градієнті щільності. Для цього використовувався Nystopaque (Gibco, США) зі щільністю 1,077 г/мл. Особливість методики полягає в тому, що еритроїдна маса і багатоядерні клітини при центрифугуванні осідають на дно пробірки, а мононуклеари кісткового мозку формують біле кільце на межі фаз сироватка-

Hystopaque (Білько Н.М., 2006, Гольдберг Е.Д., 1992). Кільце відбирали за допомогою автоматичної піпетки і отримані міелокаріоцити тричі відмивали в розчині PBS (Sigma, США).

Підрахунок кількості клітин у суспензії проводили меланжерним методом у камері Горяєва із використанням мікроскопа (Zeiss, Німеччина) при збільшенні $\times 400$. Визначення значення живих та мертвих клітин виконували із застосуванням розчину трипанового синього (Sigma, США).

2.2.2. Культивування клітин *in vitro* у напіврідкому агарі.

Культивування клітин *in vitro* у напіврідкому агарі проводили у 24-лунковому планшеті (Nunc, Німеччина). Суспензію для культивування готували на основі середовища DMEM (Sigma, США), яке містило 20 % фетальної телячої сироватки (Sigma, США), L-глутамін (Sigma, США) та антибіотики (пеніцилін (Київмедпрепарат, Україна) та стрептоміцин (Київмедпрепарат, Україна) по 100 Од/мл). Крім того, до культурального середовища додавали ГМ-КСФ (Sigma, США), який попередньо розводили стерильним фізіологічним розчином так, щоб його кінцева концентрація становила 40 нг/мл.

Для отримання напіврідкого середовища використовували бактоагар (Difco, США) із вихідною концентрацією 3,3 %, з метою отримання кінцевої концентрації після розведення 0,033%. Суспензію клітин кісткового мозку додавали таким чином, щоб кінцева їх концентрація відповідала заданій (1×10^5 мононуклеарів). Планшет розміщали в CO₂-інкубатор (LEEC, Велика Британія) за умов вологості 100 %, 5 % концентрації CO₂ та температури 37 °C.

2.2.3. Культивування клітин *in vitro* у метилцелюлозі.

Культивування клітин *in vitro* в метилцелюлозі проводили у 24-лунковому планшеті (Nunc, Німеччина). Готували суспензію клітин із використанням середовища DMEM (Sigma, США) із додаванням 10 % фетальної телячої сироватки (Sigma, США), 2 мМоль L-глутаміну (Sigma, США) та антибіотиків: пеніциліну (Київмедпрепарат, Україна) та стрептоміцину (Київмедпрепарат, Україна) по 100 Од/мл.

Для отримання напіврідкого середовища клітинну суспензію змішували з комерційним розчином метилцелюлози (Sigma, США). Культура клітин передбачала таку їх концентрацію, що в одній лунці культурального планшета знаходилося 100 тис. культивованих клітин. Після стандартизації суспензію вносили в лунки планшета (Nunc, Німеччина).

Культивування проводили у CO₂-інкубаторі (LEEC, Велика Британія) за умов 100 % вологості, концентрації CO₂ 5 % та температури 37 °C.

2.2.4. Аналіз результатів культивування у напіврідкому середовищі *in vitro*. Обрахунок результатів здійснювали на 12-14-ту добу культивування із використанням інвертованого мікроскопа (Zeiss, Німеччина) зі збільшенням $\times 100$. За колонію приймали агрегати, до складу яких входило більше 40 клітин. Клітинні агрегати, що містили від 2 до 40 клітин, вважали кластерами.

Ефективність колонієутворення (ЕКУ) та кількість колонієутворюючих одиниць (КУО) вираховували як кількість колоній на 1×10^5 культивованих мієлокаріоцитів. Під поняттям кількість кластероутворюючих одиниць (КЛУО) розуміли число кластерів на 1×10^5 мієлокаріоцитів.

Для морфологічної оцінки клітин, які складають клон, колонії індивідуально виділяли із шару бактоагару за допомогою автоматичної піпетки та ресуспендували у середовищі DMEM (Sigma, США). Препарати виготовляли за допомогою цитоцентрифугування (Shandon, Німеччина) протягом 1 хв. при 360 g, підсушували на повітрі та забарвлювали за методом Паппенгейма. Диференційний підрахунок та дослідження морфологічних особливостей клітин проводили за допомогою мікроскопа (Leika, Японія) за імерсійного збільшення $\times 630$.

2.2.5. Цитохімічне визначення мієлопероксидазної активності в препаратах, культивованих у напіврідкому середовищі *in vitro*. Виявлення активності мієлопероксидази проводили за методом Loele (1936) [82]. Цитоцентрифужні препарати гемопоетичних клітин фіксували у парах 10%-вого

нейтрального формаліну протягом 3 хв. Далі на зразки наносили інкубаційну суміш, що містила:

- бензидин – 20 мг;
- 40%-вий етиловий спирт – 10 мл;
- 3%-вий розчин перекису водню – 0,02 мл.

Інкубували зразки за кімнатної температури протягом 6 хвилин. Після цього промивали препарати водою та підсушували. Наступним етапом було забарвлення зразків за Романовським-Гімза протягом 30 секунд, промивання у воді та підсушування. Далі висушені препарати мікроскопіювали під світловим мікроскопом з імерсійною олією при збільшенні у 630 разів. Активність мієлопероксидази виявлялася у вигляді жовтувато-коричневих гранул у цитоплазмі гемопоетичних клітин [5].

2.2.6. Культивування клітин у суспензійній культурі *in vitro*.

Культивування клітин у суспензійній культурі *in vitro* проводили у 24-лунковому планшеті (Nunc, Німеччина). Суспензію для культивування готували на основі середовища DMEM (Gibco, США) із 10 % фетальної телячої сироватки (Sigma, США) без додавання ростових факторів. Суспензію клітин кісткового мозку додавали таким чином, щоб кінцева їх концентрація відповідала заданій (1×10^5 мононуклеарів). Планшет вміщували у CO₂-інкубатор (LEEC, Велика Британія) за умов 100 % вологості, 5 % концентрації CO₂ та температури 37 °C.

2.2.7. Аналіз результатів культивування у суспензійній культурі *in vitro*. Обрахунок результатів здійснювали у визначений термін після початку культивування. Для цього культуральну суспензію відбирали до центрифужної пробірки і центрифугували протягом 7 хвилин при 500 g та зливали супернатант. До пробірок із осадом додавали по 1 мл середовища DMEM (Gibco, США), ресуспендували осад, виготовляли препарати за допомогою цитоцентрифуги, забарвлювали за Паппенгеймом та здійснювали диференційний підрахунок гемопоетичних клітин за допомогою мікроскопа (Leika, Японія) за імерсійного збільшення $\times 630$.

2.3. Культивування клітин *in vivo* у дифузійних камерах з напіврідким агаром

З метою виявлення впливу факторів мікрооточення на функціональну активність клітин кісткового мозку при МДС здійснювали їх дослідження в культурі клітин *in vivo*.

Гемопоеичні клітини культивували в порожнині дифузійної камери за методом Д.І. Білько [4]. Дифузійна камера, використана в роботі, виготовлена з пористого інертного гідрогелю і містить блок діаметром 1 см, внутрішню порожнину об'ємом 0,2 мл і висоту 0,5 см. Такі камери отримали назву «амфікультуральні капсули» 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.

2.3.1. Підготовка тварин-реципієнтів до оперування. За добу до імплантації гелевих камер, тварин-реципієнтів обробляли циклофосфаном (Arterium, Україна) у дозі 200 мг/кг маси тварин для пригнічення їх імунологічної активності. Всі маніпуляції із тваринами проводили відповідно до вимог біоетики та міжнародних принципів Європейської конвенції про захист тварин і національного законодавства з гуманного поводження із тваринами, що використовуються для експериментальних та інших наукових цілей (Commission of European Communities).

2.3.2. Культивування гемопоеичних клітин-попередників у дифузійних камерах *in vivo*. Наркотизовану тварину закріплювали на операційному столі та за допомогою скальпеля робили надріз шкіри вздовж черева по умовній центральній лінії. Обережно, щоб не пошкодити внутрішніх органів, по білій лінії живота, робили розріз очеревини та вносили дифузійні

камери в черевну порожнину. Після цього тварину зашивали, підхоплюючи голкою одночасно шкіру та очеревину.

На 12-14-ту добу культивування тварин забивали методом цервікальної дислокації спинного мозку у шийному відділі, вилучали камери, очищали їх від сполучної тканини та під інвертованим мікроскопом (Zeiss, Німеччина) підраховували загальну кількість колоній (агрегати, що складаються більш, ніж із 40 клітин) та кластерів (до 40 клітин), що утворилися в процесі культивування.

2.3.3. Дослідження морфологічних особливостей клітин кісткового мозку після культивування *in vivo*. Препарати клітинних агрегатів готували за допомогою цитоцентрифуги (Shandon, Великобританія). Для цього за допомогою автоматичної піпетки під інвертованим мікроскопом (Zeiss, Німеччина) вилучали окремі клітинні агрегати і переносили в кювету цитоцентрифуги, додаючи 35 мкл середовища DMEM для вимивання клітин із кювети. З метою кращого розпростування клітинних агрегатів на предметному склі для можливості кращого розпізнавання морфологічних особливостей окремих клітин, препарати центрифугували при 150 g. Після цього предметні скельця висушували під витяжною шафою.

Для контрастного забарвлення клітин на препаратах використовували метод Паппенгейма. Для цього на препарати спочатку наносили 96% етиловий спирт на 5 хвилин для фіксації клітин на предметному склі. Далі на скельця наносили барвник Май-Грюнвальда на 45 с, потім, не змиваючи барвника, на скельця вносили таку ж кількість води і забарвлювали препарати ще 45 с. По закінченні часу забарвлення скельця акуратно промивали дистильованою водою і на 35 с занурювали в розчин Романовського-Гімза. Після забарвлення препарати висушували під витяжною шафою і вивчали під інвертованим мікроскопом (Leika, Німеччина).

Підрахунок клітин проводили наступним чином: рахували по лінії Міандра 100 клітин в полі зору мікроскопа і серед цих 100-а клітин диференціювали бластні клітини, промієлоцити, мієлоцити, метамієлоцити, паличкоядерні і

сегментоядерні клітини, а також макрофаги. Визначали індекс дозрівання клітин кісткового мозку в культурах *in vitro* і *in vivo* за формулою:

$$I = N/D \text{ (Гриньова І.І., 2009), де}$$

I - індекс дозрівання клітин кісткового мозку,

N - сума недиференційованих (бласти, промієлоцити, мієлоцити і метамієлоцити),

D - сума більш зрілих клітин кісткового мозку (паличкоядерні і сегментоядерні нейтрофіли, а також макрофаги). Інші клітини моноцитарно-макрофагальної ланки кровотворення після культивування в напіврідкому агарі, за винятком макрофагів, важко морфологічно відрізнити від ранніх клітин гранулоцитарної ланки кровотворення. Крім того, з часом, якщо неправильно визначати час культивування, в клітинних агрегатах переважають макрофаги.

2.4. Культивування гемопоетичних клітин на стромальному фідері

2.4.1. Отримання фідерного шару з клітин кісткового мозку. Клітинну суспензію, отриману в результаті стерильної пункції пацієнтів без злоякісних захворювань системи крові звільняли від еритроцитів. Для цього до суспензії додавали 0,1% метилцелюлози і залишали на 30 хв при кімнатній температурі. Таким чином досягалося розділення суміші клітин на фракції. Еритроцити завдяки гравітації спускалися у нижній шар.

Суспензію клітин 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. Потім середовище міняли кожні 72 години шляхом зміни половини супернатанту свіжим середовищем до моменту формування первинного моношару на 7-й-10-й день культивування.

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, 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 відповідний день клітини розморожували на водяній бані (+40° C) за 7-10 днів до проведення основного експерименту. Потім 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 мкг/мл 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. Час від моменту отримання матеріалу до завершення приготування клітинної суспензії не перевищував 4-х годин. Всі маніпуляції з клітинами проводили за кімнатної температури.

2.4.2. Культивування гемопоетичних клітин у дифузійних камерах у присутності стромального фідерного шару *in vitro*. Досліджувані суспензії гемопоетичних 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 заздалегідь 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.

2.5. Статистична обробка результатів дослідження

Для обробки результатів використовували програму MS Excel. Для всіх вибірок оцінювалась відповідність емпіричних розподілів нормальному розподілу за критеріями Колмогорова та Пірсона. Для кількісних показників первинна статистична обробка включала розрахунок середнього арифметичного ($\bar{x}$), похибки середньоарифметичного значення (S_x), середньоквадратичного відхилення (δ) [6].

РОЗДІЛ 3. ОСОБЛИВОСТІ КОЛОНІЄУТВОРЕННЯ ГЕМОПОЕТИЧНИХ КЛІТИН-ПОПЕРЕДНИКІВ МИШІ, ЩУРА І ЛЮДИНИ У ГЕЛЕВИХ ДИФУЗІЙНИХ КАМЕРАХ *IN VIVO*

3.1. Кінетика формування клітинних агрегатів із кісткового мозку, вилученого у людини і ссавців, у культурі гелевих дифузійних камер *in vivo*

Доцільність визначення морфологічних і функціональних показників гемопоетичних клітин-попередників з кісткового мозку мишей, щурів і людини обумовлена необхідністю поглиблення знань про особливості їхнього функціонування, вирішення питання про гетерогенність клітин-попередників у різних ссавців і людини, як загальне виявлення біологічної природи і потенцій у культурі клітин *in vivo* [27, 28, 9].

Кістковий мозок миші, щура і людини отримували у стерильних умовах так, як описано у розділі 2. Культивування проводили в гелевих дифузійних камерах, занурених у організм лінійних мишей, оброблених за добу цитостатиком ендоксаном (Baxter Oncology GmbH, Німеччина).

Аналіз отриманих даних показав, що кількість клітинних агрегатів, утворених під час культивування у напіврідкому агарі, лінійно зростала із збільшенням концентрації ядровмісних клітин (ЯВК), що занурювали у гелеву дифузійну камеру перед культивуванням, як мишей і щурів, так і людини (рис. 3.1.) [3]. У випадку застосування найнижчої концентрації моноклеарів кісткового мозку ($0,5 \times 10^5$ клітин на камеру), клітинні агрегати не утворювались взагалі. Відсутність колоній та кластерів після культивування у напіврідкому агарі протягом двох тижнів може бути пов'язана, імовірно, з відсутністю міжклітинних взаємодій, що є важливими для виживання клітин в умовах культивування *ex vivo*.

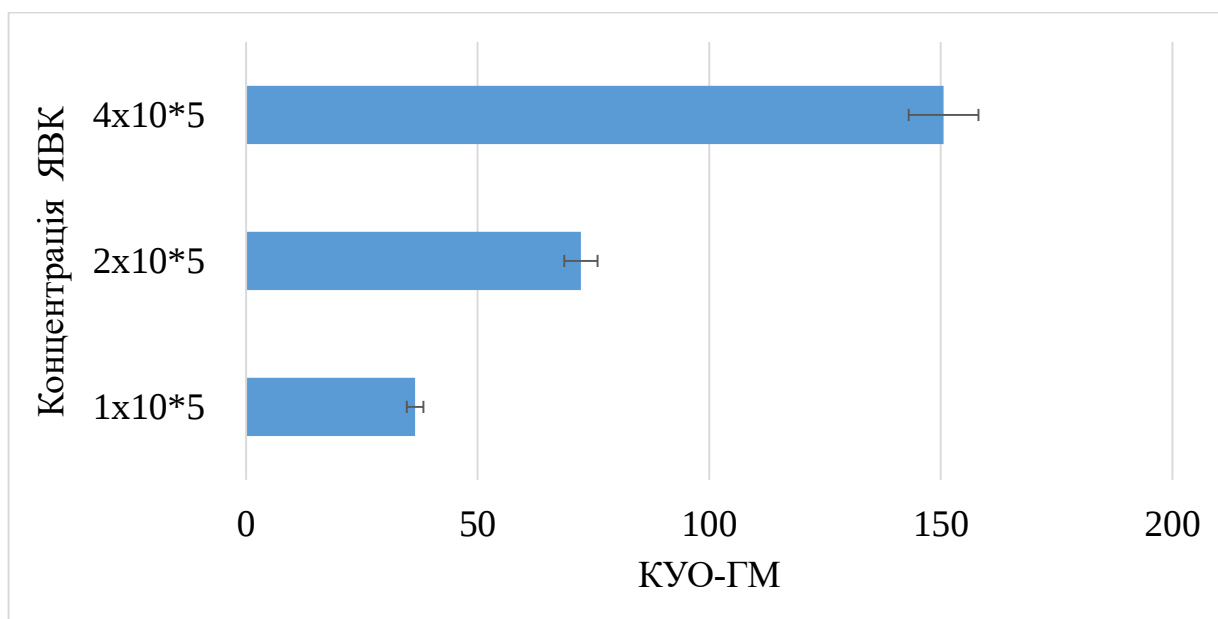


Рис. 3.1. Кількість КУО-ГМ, утворених в умовах культивування суспензії клітин кісткового мозку пацієнтів без злоякісних гематологічних захворювань в залежності від концентрації ЯБК, експлантованих у культуру.

У випадку ж, коли концентрація ЯБК кісткового мозку у ссавців і пацієнтів без злоякісних гематологічних захворювань, занурених у дифузійну камеру, була вищою за $4,0 \times 10^5$ клітин на камеру, візуалізація окремих клітинних агрегатів значно ускладнювалася надмірною щільністю, демонструючи зливний ріст. Саме тому, для проведення досліджень використовувалась кінцева концентрація $1,0 \times 10^5$ клітин на камеру, як для ссавців, так і для людини.

У подальшому вивчали кінетику утворення колоній і кластерів клітинами кісткового мозку у ссавців і осіб без злоякісних гематологічних захворювань при культивуванні у напіврідкому середовищі *in vivo* на 3-ю, 7-у, 9-у, 12-у, 14-у та 16-у добу культивування для визначення оптимального терміну тривалості експерименту. Підрахунок утворених клітинних агрегатів у зазначені терміни культивування проводили під інвертованим мікроскопом Nikon із використанням збільшення $\times 200$.

У культурах кісткового мозку людини перші агрегати, що склались із 3–9 клітин виявляли на 3-ю добу культивування. Такі скупчення клітин вважаються

кластерами. Спостереження за ними впродовж культивування надалі показало, що вони збільшувались у розмірах із продовженням терміну культивування. Перші колонії з'являлися на 5-7-у добу культивування. Надалі відбувалось збільшення кількості колоній, максимальна їх кількість спостерігалась на 12-14-у добу. У всіх наступних дослідженнях розрізняли два основні типи клітинних агрегатів: колонії (колонієутворюючі одиниці, КУО), кількість клітин в яких становила 40 і більше та кластери (кластероутворюючі одиниці, КлУО), які містили від 3 до 39 клітин. По характеру розташування клітин визначали три типи колоній, що виявлялись у культурі: компактні колонії, компактні із вінчиком і дифузні колонії. Виявилось, що колонії є об'ємними, ростуть у агарі як у горизонтальній, так і у вертикальній площині (рис 3.2.).

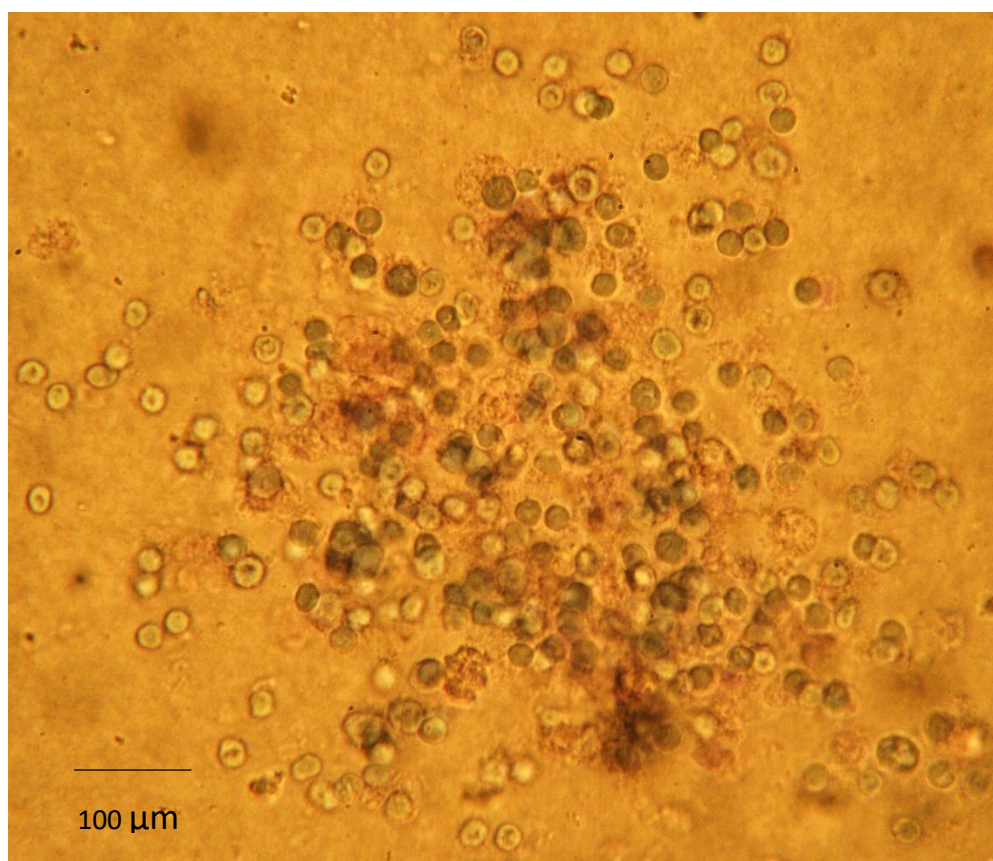


Рис. 3.2. Компактна колонія з вінчиком, утворена після культивування суспензії клітин-попередників кісткового мозку, вилученого з грудини, у напіврідкому агарі протягом 12 діб. Інвертований мікроскоп.

Кількість кластерів з першого дня появи колоній, зменшувалася. Пояснення цьому спостереженню можна шукати у тому, що частина клітинних агрегатів, прийнятих за кластери, у результаті проліферації формує колонії, а нові кластери на цей час вже не утворюються. Розмір колоній збільшувався до 12-ї доби, кількість клітин у них коливалася від 40 до 500.

З часом (на 16-у добу) кількість компактних колоній зменшувалась, а дифузних колоній ставало більше. В результаті колонії втрачали свої кордони і зливалися. Саме тому обрахунок результатів при проведенні подальших досліджень проводили на 12-14-й день після початку культивування, а не пізніше.

На наступному етапі досліджень вивчали кінетику формування клітинних агрегатів кістковомозковими клітинами мишей і щурів. Результати свідчили про те, що є достовірна різниця у мишей і щурів, як у поведінці культивованих клітин впродовж спостереження, так і у колонієутворюючій здатності кістковомозкових клітин. Якщо ефективність колонієутворення кісткового мозку осіб без онкогематологічної патології складала $36,8 \pm 2,3$, кластерів – $72,3 \pm 8,4$, для миші кількість колоній становила $30,8 \pm 2,0$, кластерів – $62,0 \pm 2,1$, а щурів – $24,5 \pm 2,5$, а кластерів $80,0 \pm 7,6$. Після оцінки кількості колоній і кластерів, отриманих з кожного джерела біологічного матеріалу, визначали проліферативний потенціал, який представляє співвідношення колоній до кластерів (табл.3.1.). Для людини цей показник становив 2, для миші також 2, а для щура 3,3. Здатність до ефективного кластероутворення у групі щурів, може бути пов'язаною з біологічної особливістю функціонування кровотворної системи у щурів.

Таблиця 3.1

Ефективність колонієутворення гемопоетичних клітин-попередників кісткового мозку у ссавців і пацієнтів без онкогематологічних відхилень

Місце забору кістковомозкових клітин (КМ)	Кількість обстежених	Колонієутворююча активність КУО-ГМ	Кластероутворююча активність КлУО-ГМ	Поліферативний потенціал (ПП)
Стернальний пунктат людини	10	36,8± 2,3	72,3 ±8,4	2,0
КМ з стегнової кістки миші СВА	10	30,8 ± 2,0	62,0±2,1	2,0
КМ з стегнової кістки щура Wistar	8	24,5 ± 2,5	80,0±7,6	3,3
Всього	28			

*-Різниця між показниками статистично достовірна

Аналіз цитологічних препаратів показав, що вони мали особливості у формі і клітинному складі. Так, якщо клітини у колоніях кісткового мозку людини і миші мали округлу форму, то у щурів вони були витягнутої форми (еліпсоподібної). Колонії в перших двох випадках були шароподібними, об'ємними, у третьому – примхливої форми. У всіх трьох випадках вони складалися з мієлоїдних клітин різного ступеня зрілості. У центрі колоній розміщувалися проліферуючі клітини (бластні, промієлоцити, мієлоцити, метамієлоцити), по периферії – клітини, що втратили здатність проліферувати, а

саме паличкоядерні і сегментоядерні лейкоцити (рис. 3.3.). Індекс дозрівання мієлоцитів, що визначався під час аналізу клітинного складу агрегатів, утворених в результаті культивування, визначали як співвідношення між числом незрілих форм мієлокаріоцитів (бласти, промієлоцити, мієлоцити, метамієлоцити) та кількістю більш диференційованих клітин (паличкоядерні та сегментоядерні гранулоцити). За морфологією гранулоцити відрізнялися у обстежених груп. Так, у мишей і щурів, починаючи з мієлоцита, ядро приймало форму кільця і далі в процесі диференціювання воно тільки ставало тонше і грубіше, в той час як у людини у мієлоцита, метамієлоцита і паличкоядерного лейкоцита ядро мало форму місяця, стаючи тоншим у процесі дозрівання. У сегментоядерного лейкоцита формувалося ядро з фрагментів з перетинками, в той час як у миші і щура ядро виглядало як тонке кільце, яке ніколи не переривалося.

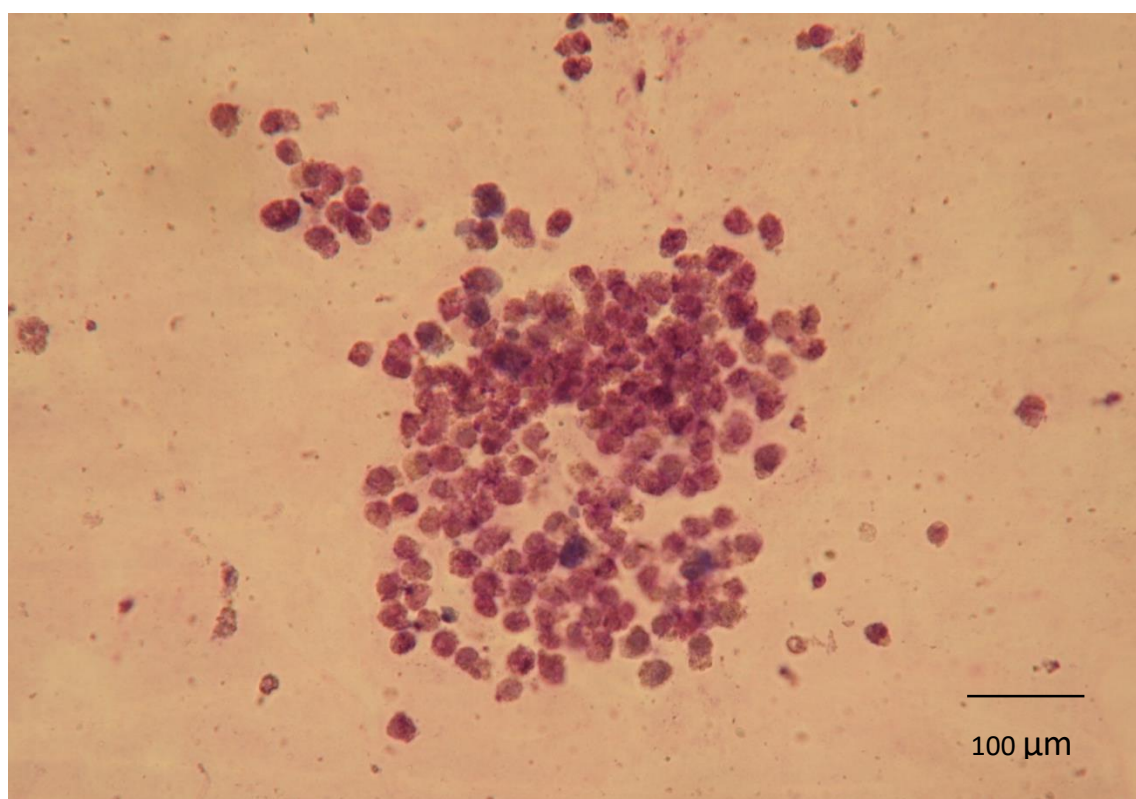


Рис. 3.3. Компактна колонія, утворена в результаті культивування суспензії ЯВК кісткового мозку пацієнта без онкогематологічної патології на 12-й день у

гелевих дифузійних камерах з напіврідким агаром. Забарвлення за Паппенгеймом.

Кількість макрофагів у клітинних агрегатах, отриманих в культурі клітин кісткового мозку людини, миші і щура не мала статистично достовірної різниці ($p > 0,05$). Проте, їх кількість збільшувалася по мірі подовження терміну культивування. Збільшення кількості макрофагів у культурі на пізніх термінах культивування свідчить про трансформацію частини моноцитів у макрофаги.

Для оптимального терміну культивування, зазвичай, характерним є переважний ріст компактних і змішаних колоній. Макрофаги в них знаходяться у незначній кількості. Для перезрілої культури, навпаки, спостерігали переважний ріст дифузних колоній, які склалися, у більшості, з макрофагальних клітин. Ці спостереження були покладені у основу вибору оптимального терміну культивування клітин-попередників людини, миші і щура. Оптимальним терміном зняття результатів експериментів в культурі з напіврідким агаром *in vivo* для кісткового мозку людини визначений 12-14-й день, для миші – 10-й день, а для щура – 8-й. Кістковий мозок був культивованим у однакових умовах дифузійних камер. Така різниця у виборі оптимального терміну культивування, очевидно, пов'язана з біологічною природою об'єктів дослідження. Аналіз морфологічних особливостей клітин, які формували колонії не виявив достовірної відмінності у якісному складі клітин, що формували клітинні агрегати.

Таким чином, визначений найбільш придатний термін зняття результатів експериментів – 12-14-а доба культивування для кісткового мозку людини, 10-й день – для миші і 8-й день – для щура. Кількість клітин, що була вибрана, як оптимальна для проведення подальших досліджень у всіх трьох випадках, становила 5×10^5 клітин в 1мл, або 1×10^5 клітин на одну камеру. Про це свідчить проліферативний потенціал колонієутворення (табл.3.1). Отримані дані поглиблюють уявлення про функціонування і кінетику росту стовбурових клітин

і їхніх найближчих нащадків в організмі ссавців і людини і мають практичний вихід для подальших досліджень кровотворення в нормі і при злоякісних захворюваннях.

3.2. Гетерогенність гемопоетичних клітин-попередників, отриманих з кісткового мозку людини і ссавців у культурі гелевих дифузійних камер

В культурі з напіврідким агаром *in vivo* нами отримано кілька типів колоній, які різняться як за своєю формою, так і за клітинним складом. Нами проведено аналіз типів колоній, що утворювались при культивуванні гемопоетичних клітин: КУО-ГЕММ (колонієутворюючі одиниці гранулоцитарно-еритроїдно-мегакаріоцитарні), КУО-Г (колонієутворюючі одиниці гранулоцитарні), КУО-М (колонієутворюючі одиниці макрофагальні) і КУО-ГМ (колонієутворюючі одиниці гранулоцитарно-макрофагальні). За даними наших досліджень відносний вміст гранулоцитарно-макрофагальних попередників серед усіх комітованих гемопоетичних попередників переважає у всіх трьох об'єктах спостереження (людини, миші, щура) (табл.3.2).

Було виявлено, що кількість змішаних колоній (КУО-ГЕММ) з кісткового мозку людини дорівнювала $2,0 \pm 0,9$ на 10^5 експлантованих клітин, в той час як для гранулоцитарних колоній (КУО-Г) цей показник був у 9 разів більшим і дорівнював $18,3 \pm 3,5$ на 1×10^5 експлантованих клітин. Встановлено, що кількість моноцитарно-макрофагальних колоній (КУО-ММ) перевищувала кількість змішаних колоній у 6 разів і дорівнювала $13,5 \pm 3,3$, в той час як у порівнянні з гранулоцитарними колоніями цей показник був значно меншим.

Таблиця 3.2

Здатність до колонієутворення клітин з кісткового мозку хворих без онкогематологічної патології і ссавців на 1×10^5 експлантованих клітин у культурі дифузійних камер *in vivo*

Джерело матеріалу	Типи колоній $\times 10^5$			
	КУО-ГЕММ	КУО-Г	КУО-М	КУО-ГМ
Людина (n=10)	$2,0 \pm 0,9^*$	$18,3 \pm 3,5^*$	$13,5 \pm 3,3^*$	$36,8 \pm 2,3^*$
Миша (n=10)	$1,5 \pm 0,8^*$	$10,4 \pm 2,8^*$	$18,5 \pm 2,8^*$	$30,8 \pm 2,0^*$
Щур (n=8)	$1,8 \pm 0,7^*$	$8,4 \pm 1,8^*$	$30,7 \pm 2,5^*$	$24,5 \pm 2,5^*$

Примітка: * – різниця між вказаними показниками статистично достовірна $p \leq 0,05$

Найбільша колонієутворююча здатність відмічалася для гранулоцитарно-макрофагальних колоній (КУО-ГМ) і дорівнювала $36,8 \pm 2,3$ на 10^5 експлантованих клітин.

У мишей і щурів характер росту в культурі відрізнявся. Так, в них виявлявся менший рівень КУО-Г, ніж у людини ($10,4 \pm 2,8$, $8,4 \pm 1,8$ і $18,3 \pm 3,5$, відповідно). Різниця статистично достовірна ($p \leq 0,05$). Рівень КУО-ГМ переважав у порівнянні з іншими типами колоній, як у людини, так і у ссавців. І все ж цей показник у людини виявився набагато більшим, ніж у ссавців (табл.3.2). Різниця статистично достовірна ($p \leq 0,05$). А от щодо моноцитарно-макрофагальних попередників (КУО-ММ), то їхня кількість у щурів виявилася більшою ($30,7 \pm 2,5$). Різниця статистично достовірна, як у порівнянні з мишою, так і з людиною $18,5 \pm 2,8$ і $13,6 \pm 2,5$, відповідно. Перевага макрофагальних колоній у мишей і, особливо, у щурів, так як і їх схильність до кластероутворення в культурі пов'язана з біологічними особливостями ссавців і повинна враховуватись при проведенні культуральних досліджень.

Таким чином, отримані дані, які вказують на особливості поведінки клітин миші, щура і людини в культурі гелевих дифузійних камер. І все ж таки головною задачею цього розділу було довести, що гетерогенність гемопоетичних клітин-попередників не є перевагою кісткового мозку людини, а має ширше розуміння, охоплюючи представників біологічного світу, на прикладі мишей і щурів.

РОЗДІЛ 4. ВИВЧЕННЯ ОСОБЛИВОСТЕЙ ГЕМОПОЕЗУ У ПАЦІЄНТІВ З МДС-ІВ В КУЛЬТУРІ *IN VITRO*

4.1. Процедура отримання біологічного матеріалу

У 2022 р. вийшла 5-та редакція Класифікації Всесвітньої організації охорони здоров'я гематолімфоїдних пухлин: Мієлоїдні і гістоцитарні дендритні неоплазми. Згідно з цією класифікацією, усі форми МДС є мієлодиспластичними неоплазмами, що характеризуються цитопенією і морфологічною дисплазією [39, 141]. Їх розподіляють на ті, що мають конкретні генетичні аномалії, та ті, що мають певні характеристики морфологічного характеру [69]. До групи МДС із генетичними аномаліями належать 3 форми захворювання: МДС із низьким вмістом бластів та ізольованою делецією 5q (МДС-5q); МДС із низьким вмістом бластів і мутацією SF3B1 (МДС- SF3B1); МДС із біалельною інактивацією TP53 (МДС- biTP53) [13]. До групи МДС, які визначаються за морфологічними ознаками, належать 4 форми захворювання: МДС із низьким вмістом бластів (МДС-LB); МДС гіпопластичний (МДС-h); МДС із підвищеним вмістом бластів (МДС-ІВ); МДС із фіброзом (МДС-f) [69, 64].

У наших дослідженнях згідно нової редакції класифікації були представлені пацієнти, які визначаються за морфологічними ознаками і належать до форми захворювання: МДС із підвищеним вмістом бластів (МДС-ІВ). Ця форма за минулої редакції мала назву МДС РАНБ-I та МДС РАНБ-II (рефрактерна анемія з надлишком бластів). Саме за такими назвами (МДС РАНБ-I та МДС РАНБ-II) результати дисертаційної роботи були опубліковані протягом минулих років [1, 2, 7, 8]. В дисертаційній роботі надалі вказується назва в новій редакції. Діагноз пацієнтам був поставлений співробітниками ДУ «Інститут гематології та трансфузіології НАМН України» з урахуванням показників периферичної крові, кісткового мозку, молекулярно-генетичних і фенотипових досліджень. Зразки кісткового мозку отримували лікарі-гематологи з

діагностичною метою і в об'ємі 1 мл в пробірці з живильним середовищем DMEM в суміші з гепарином (10%) передавали для проведення культуральних досліджень. Розглядався біологічний матеріал хворих з МДС-ІВ у ініціальний період захворювання до призначення лікування. Пацієнти давали інформовану письмову згоду на проведення досліджень. Робота проводилася на основі Договору про творче співробітництво між інститутом і Національним університетом «Києво-Могилянська академія».

4.2. Аналіз кількісних і якісних показників периферійної крові хворих на МДС-ІВ

У всіх 20-ти пацієнтів з МДС-ІВ у показниках периферичної крові визначали бластні клітини (4-5%), зниження кількості еритроцитів до 4×10^{12} ; у половини з них відмічали ретикулоцитопенію [8]. Задіяний був і гранулоцитарний паросток кровотворення. У 5 пацієнтів виявлялася панцитопенія. У 10 визначали лейкопенію з нейтропенією. Порушення морфології нейтрофільних елементів знаходили у всіх хворих. Так, фрагментація ядер виявлялася у 2% випадків, токсогенна зернистість – у 4%, вакуолізація ядра та цитоплазми – у 3,5%, а дегрануляція цитоплазми – у 5% хворих. Ці показники відрізняються від контролю. Різниця статистично достовірна ($p < 0,05$). Якісні зміни у морфології нейтрофільних елементів представлені у таблиці (табл.4.1).

Таблиця 4.1

Якісні зміни у нейтрофільних елементах у периферичній крові пацієнтів з МДС-ІВ

Показники	МДС	Група порівняння
Фрагментація ядер, %	$2,0 \pm 0,05^*$	$1,77 \pm 0,01$
Токсогенна зернистість, %	$4,0 \pm 0,08^*$	$1,65 \pm 0,02$
Вакуолізація ядра та цитоплазми, %	$3,5 \pm 0,05^*$	$2,0 \pm 0,03$
Дегрануляція цитоплазми, %	$5,0 \pm 0,09^*$	$1,54 \pm 0,02$

Примітка: * — статистично достовірна різниця, $p < 0,05$

4.3. Оцінка морфологічного складу препаратів кісткового мозку обстежених осіб

На предметних скельцях готували препарати кісткового мозку. Фіксацію і забарвлення препаратів проводили, як вказано у розділі 2. Аналіз препаратів у контролі (10 осіб без захворювань системи крові) і з вперше виявленим МДС-ІВ (20 осіб) робили під світловим мікроскопом (Leika) за збільшення $\times 900$.

Таблиця 4.2

Показники кісткового мозку хворих на МДС у порівнянні з контролем $M \pm m$

Назва клітинних елементів	Розподіл типів клітин при МДС-ІВ (20 зразків)	Розподіл типів клітин у контролі (10 зразків)
Бластні клітини	$4,8 \pm 0,7$	$1,1 \pm 0,4$
Метамієлоцити	$7,3 \pm 0,5$	$2,1 \pm 0,7$
Паличкоядерні нейтрофільні гранулоцити	$10,2 \pm 1,1$	$3,1 \pm 0,5$
Сегментоядерні нейтрофільні гранулоцити	$38,5 \pm 7,7$	$68,4 \pm 5,8$
Лімфоцити	$39,6 \pm 3,33$	$26,4 \pm 5,2$
Моноцити	$16,2 \pm 2,8$	$4,5 \pm 1,5$
ШОЕ мм/год	$43,7 \pm 7,8$	$3,8 \pm 1,3$

Так, в контролі кістковий мозок представляв сукупність дозріваючих і зрілих клітин з мінімальною кількістю бластів (табл. 4.2). Відсоткове співвідношення клітин кісткового мозку людини становило: бластні клітини – 1,5 %, 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 %.

У 15 пацієнтів з МДС-ІВ кістковий мозок виявився гіперпластичним, у решті випадків – гіпопластичним. У всіх пацієнтів спостерігали порушення гемопоезу, а саме, дисфункцію мієлоїдного паростку кровотворення. Визначали збільшення відсотку бластних клітин до 5% і зміни у морфології як ранніх проліферуючих клітин, так і функціонально зрілих. Фрагментація ядер спостерігалася у 3%, токсогенна зернистість – у 4-5%, вакуолізація ядра і цитоплазми – у 3-5% випадків, дегрануляція – у 3-7%.

4.4. Особливості функціонування гемопоетичних клітин-попередників в культурі *in vitro*

Із метою встановлення особливостей функціональної активності гемопоетичних стовбурових клітин та клітин-попередників кісткового мозку (КМ) пацієнтів з МДС-ІВ у порівнянні з контрольною групою осіб проводили підрахунок кількості клітинних агрегатів, утворених після 12 діб культивування у напіврідкому середовищі *in vitro*. Аналіз отриманих результатів показав, що колонії, які були сформовані кістковомозковими клітинами осіб без онкогематологічної патології містили від 50 до 200 клітин гранулоцитарного і моноцитарного ряду різного ступеня диференціювання.

За формою при МДС, так як і в нормі, розрізняли три типи колоній: компактні (рис. 4.1. а), змішані (рис. 4.1. б) і дифузні (рис. 4.1. в) [7]. Проте, в разі культивування кістковомозкових клітин у нормі, переважали компактні колонії округлої форми, які складали 60 % від решти типів колоній.

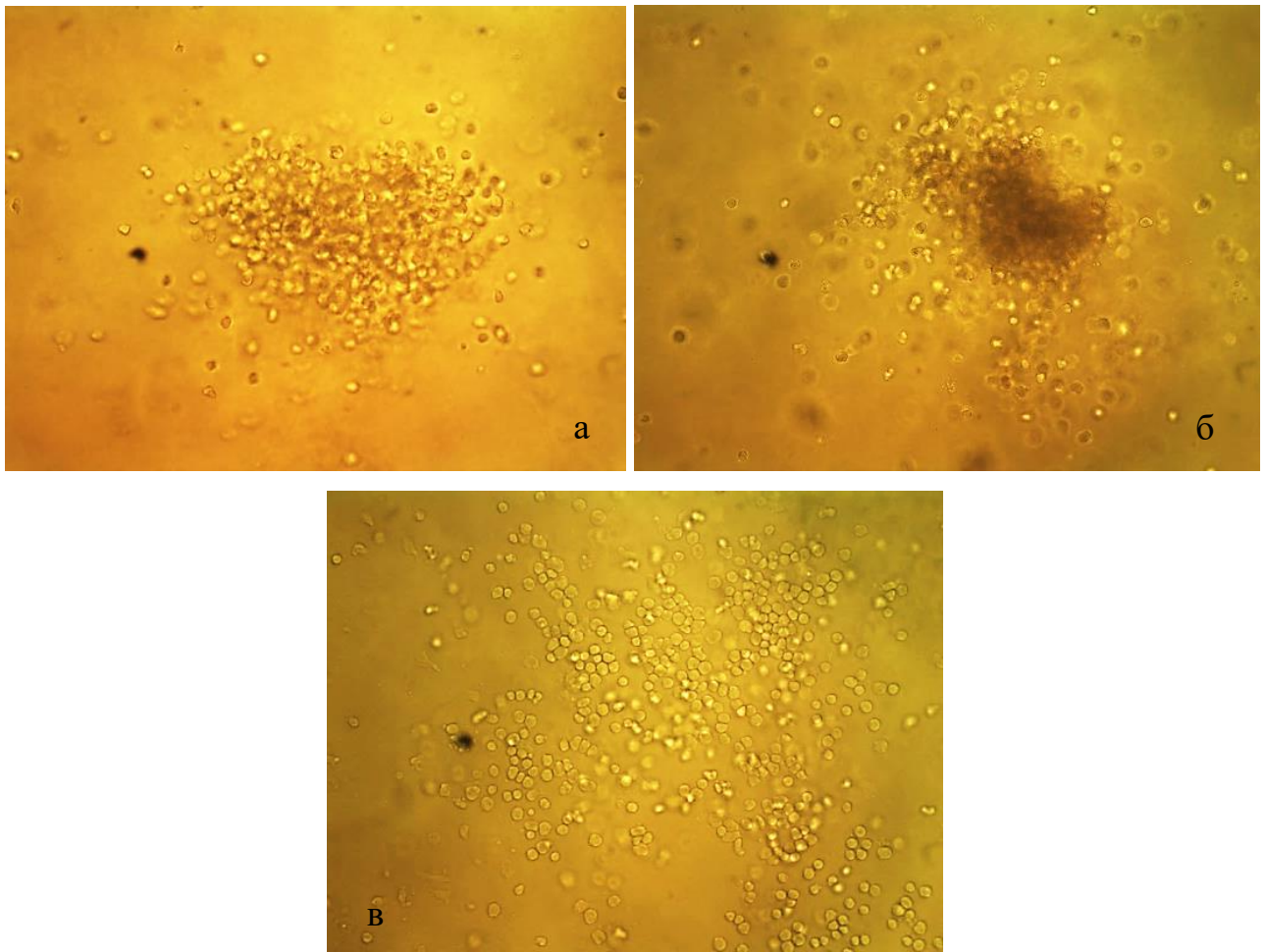


Рис.4.1. Колонії гемопоетичних клітин-попередників у культурі кісткового мозку здорових донорів *in vitro*: а – колонія компактного типу; б – компактна з вінчиком; в – дифузна колонія. 3б. х 200. Інвертований мікроскоп [2].

Примітивні клітини, які проліферують, формували центр колоній (бласти, промієлоцити), їх оточували проліферуючі клітини – мієлоцити і метамієлоцити, тоді як дозріваючі клітини (палочкоядерні і сегментоядерні лейкоцити) знаходились на периферії колоній (рис.4.2.).

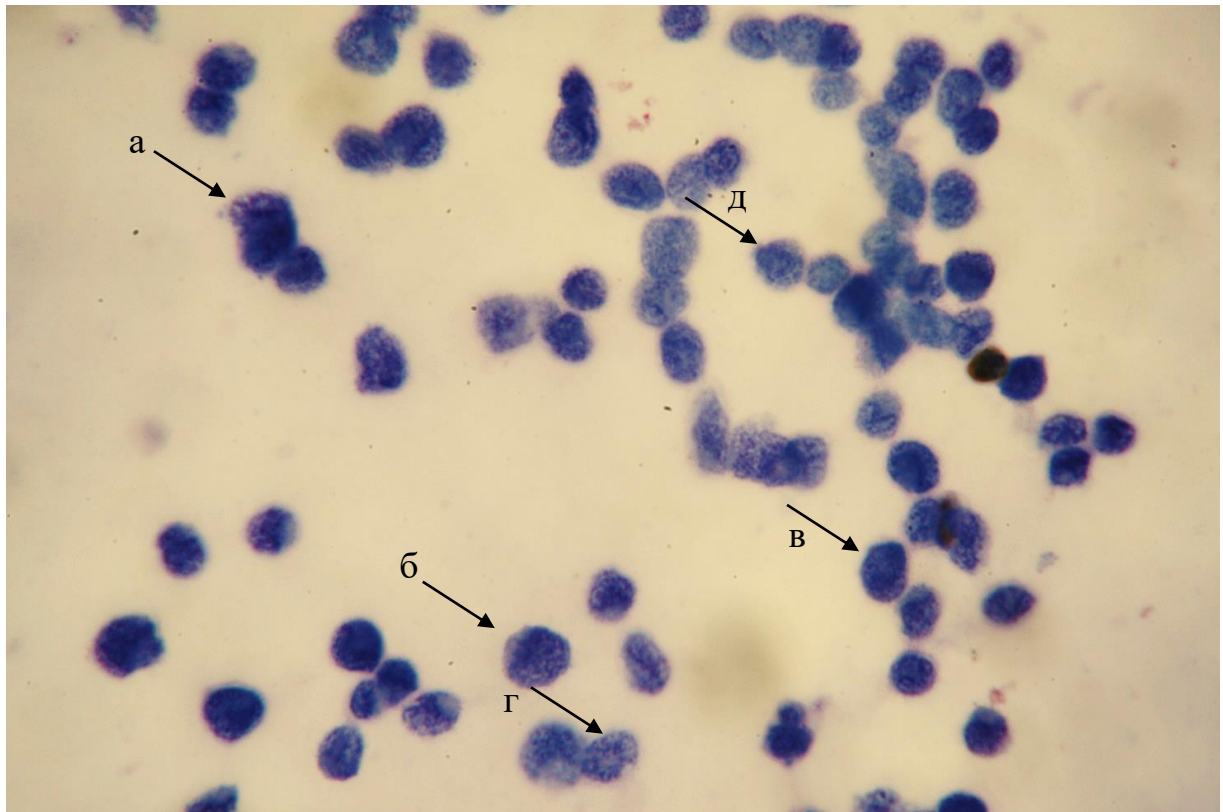


Рис.4.2. Фрагмент гранулоцитарно-моноцитарної колонії в нормі. Забарвлення за Паппенгеймом. А – бласт, б – мієлоцит, в – метамієлоцит, г – паличкоядерний лейкоцит, д – сегментоядерний лейкоцит. Збільшення x 630.

При МДС поряд з пригніченням колонієутворюючої активності визначали зменшення кількості клітин у клонах. Цей показник не перевищував 50 клітин, що свідчило про обмежену здатність клітин-попередників до проліферації [2]. Спостерігався порушений порядок знаходження клітин у клонах, коли більш примітивні і дозріваючі клітини розташовувались хаотично. Колонії мали примхливу форму. Серед них переважали дифузні колонії і дифузні з вінчиком (рис. 4.3.).

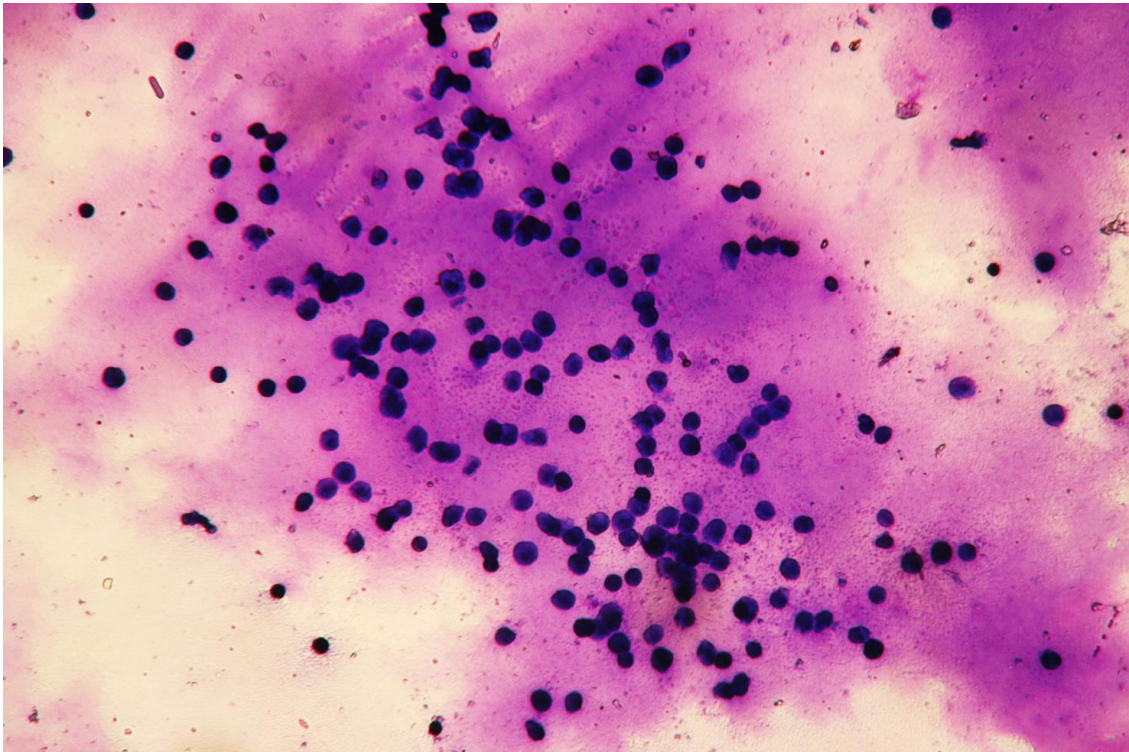


Рис.4.3. Дифузна колонія при МДС. Забарвлення за Паппенгеймом. 36.x 250.

Томас Олофсон та колеги (1976), продемонстрували залежність між кількістю колоній у напіврідкому агарі *in vitro* та числом лейкоцитів у периферичній крові. Такі результати вони отримали, культивуючи мононуклеарні клітини периферичної крові при хронічній фазі ХМЛ. Автори припустили, що це могло свідчити про те, що в периферичну кров пацієнтів потрапила велика кількість бластних клітин, котрі за морфологічними характеристиками були схожі на лейкоцити, але мали високу клоногенну активність [101]. Подібні результати наштовхнули нас на думку дослідити залежність між кількістю колоній та числом мононуклеарних клітин у 1 мл кісткового мозку у хворих на МДС-ІВ.

Кількість колонієутворюючих одиниць перераховували на 1 мл кісткового мозку пацієнта. У результаті досліджень виявили пряму кореляційну залежність ($r=0,9765$) між кількістю мононуклеарних клітин та числом колоній у 1 мл кісткового мозку (рис.4.4.).

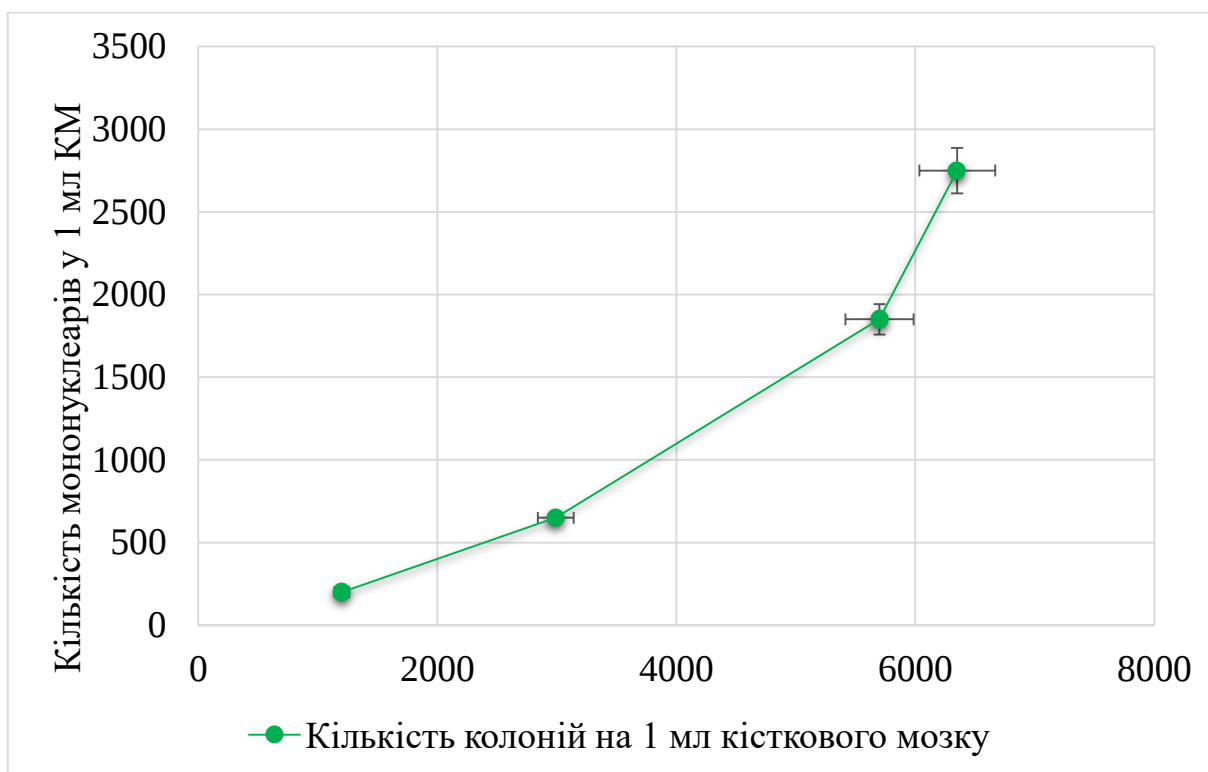


Рис. 4.4. Кореляційний аналіз зв'язку між кількістю клітинних агрегатів та кількістю мононуклеарів кісткового мозку у хворих на МДС-ІВ.

Таким чином, у роботі виявлено особливості колонієутворення *in vitro* в культурі з напіврідким агаром кісткового мозку пацієнтів при МДС-ІВ. Встановлено, що у хворих на момент діагностики захворювання відбувається пригнічення колонієутворюючої здатності клітин-попередників, зменшення кількості клітин у колоніях і поява примхливих форм клітинних агрегатів із змінами у диференціюванні в культурі. Визначені інформативні показники морфофункціональних характеристик стовбурових клітин та їх нащадків в культурі, такі як колонієутворююча здатність і клітинний вміст колоній. Крім того, отримані нами дані дозволяють зробити висновок, щодо ролі гемопоетичних клітин-попередників у формуванні патологічного процесу при МДС, про що свідчить здатність гемопоетичних стовбурових клітин та клітин-попередників кісткового мозку до утворення дефектних клонів у культурі *in vitro*.

В зв'язку з тим, що в культурі *in vitro* при МДС-ІВ формуються колонії з обмеженою кількістю клітин, порушеною проліферативною активністю і викривленим диференціюванням, можна вважати, що були виявлені зміни функціональної активності клітин-попередників при МДС-ІВ, і вони свідчать про глибину патологічного процесу, який захоплює рівень гемопоетичних клітин-попередників, найближчих нащадків стовбурових клітин [1].

РОЗДІЛ 5. ВИЗНАЧЕННЯ ГЕТЕРОГЕННОСТІ ВМІСТУ КОЛОНІЙ ГЕМОПОЕТИЧНИХ КЛІТИН-ПОПЕРЕДНИКІВ В КУЛЬТУРІ З МЕТИЛЦЕЛЮЛОЗОЮ *IN VITRO* ПРИ МДС-ІВ

5.1. Аналіз різних типів колоній, які утворювались у культурі мононуклеарів з кісткового мозку хворих на МДС-ІВ *in vitro*

Культуральні дослідження були проведені у метилцелюлозі (див. розд. 2), яка, на відміну від напіврідкого агару, сприяє формуванню в культурі клітинних агрегатів різного напрямку диференціювання, чим розширює діапазон можливостей для вивчення особливостей гемопоезу в нормі і при МДС-ІВ.

Результати культивування гемопоетичних клітин-попередників хворих на МДС у метилцелюлозі свідчили про наявність чотирьох типів колоній у культурі. Вони поділялися на гранулоцитарно-еритроїдно-мегакаріоцитарно-макрофагальні чи змішані, (КУО-ГЕММ), гранулоцитарні (КУО-Г), гранулоцитарно-макрофагальні (КУО-ГМ), моноцитарно-макрофагальні (КУО-ММ) (табл. 5.1).

Таблиця 5.1

Здатність до колонієутворення мононуклеарів з кісткового мозку хворих на МДС-ІВ *in vitro* (на 1×10^5 експлантованих клітин ($n = 20$))

Типи колоній $\times 10^5$			
КУО-ГЕММ	КУО-Г	КУО-ММ	КУО-ГМ
$3,1 \pm 0,2^*$	$18,0 \pm 1,2^*$	$13,6 \pm 2,5^*$	$28,5 \pm 2,2^*$

Примітка: * – різниця між вказаними показниками статистично достовірна $p \leq 0,05$

Було виявлено, що кількість змішаних колоній (КУО-ГЕММ) у хворих на МДС-ІВ дорівнювала $3,1 \pm 0,2$ на 10^5 експлантованих клітин. Кількість

моноцитарно-макрофагальних колоній (КУО-ММ) перевищувала кількість змішаних колоній в 4 рази, в той час як для гранулоцитарних колоній цей показник був більшим майже в 6 разів і дорівнював $18,0 \pm 1,2$ на 10^5 експлантованих клітин. Найбільша колонієутворююча здатність відмічалася для гранулоцитарно-макрофагальних колоній (КУО-ГМ) і дорівнювала $28,5 \pm 2,2$ на 10^5 експлантованих клітин.

Для підтвердження мієлоїдного походження вмісту отриманих клітинних агрегатів проводили оцінку мієлопероксидазної активності. Для аналізу вмісту колоній гемопоетичних клітин-попередників вилучали колонії за допомогою мікропіпетки і вивчали на предметному скельці під інвертованим мікроскопом з наступним цитохімічним забарвленням для виявлення мієлопероксидазної активності (див. розділ 2). Оцінка морфології гемопоетичних клітин у колоніях здійснювалася за допомогою світлової мікроскопії (Рис. 5.1.). Мієлоїдний паросток кровотворення характеризувався наявністю яскравої реакції на мієлопероксидазу, але для більш зрілих своїх представників, а саме паличкоядерних та сегментоядерних гранулоцитів, та мієлоїдних клітин зі стадії мієлобласта.

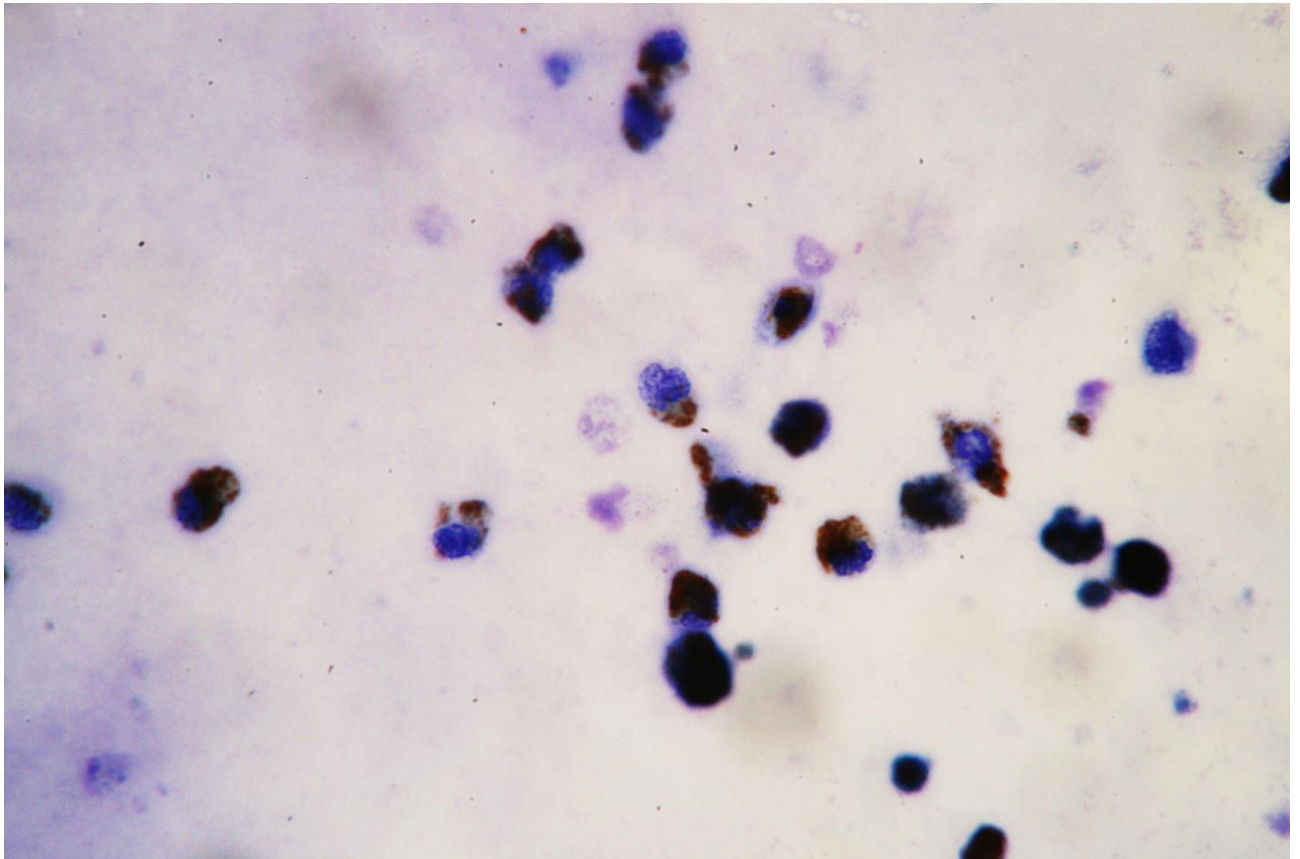


Рис.5.1. Мієлопероксидазна активність гемопоетичних клітин фрагменту гранулоцитарно-макрофагальної колонії при МДС-ІВ. Дозабарвлення за Паппенгеймом. 36.x 630.

У колоніях у центрі визначали поодинокі бластні клітини; поряд з ними знаходились мієлоцити, метамієлоцити. На відстані по периферії відмічали палочкоядерні і сегментоядерні клітини (рис.5.2.). Підраховували 100 клітин і розділяли їх за морфологією на 2 групи. Перша група це клітини, які проліферують. До них відносили бластні клітини, мієлоцити і метамієлоцити. Друга група складалася з клітин, які диференціюються, а саме, палочкоядерних і сегментоядерних клітин. Співвідношення клітин першої групи до другої визначали як індекс диференціювання.

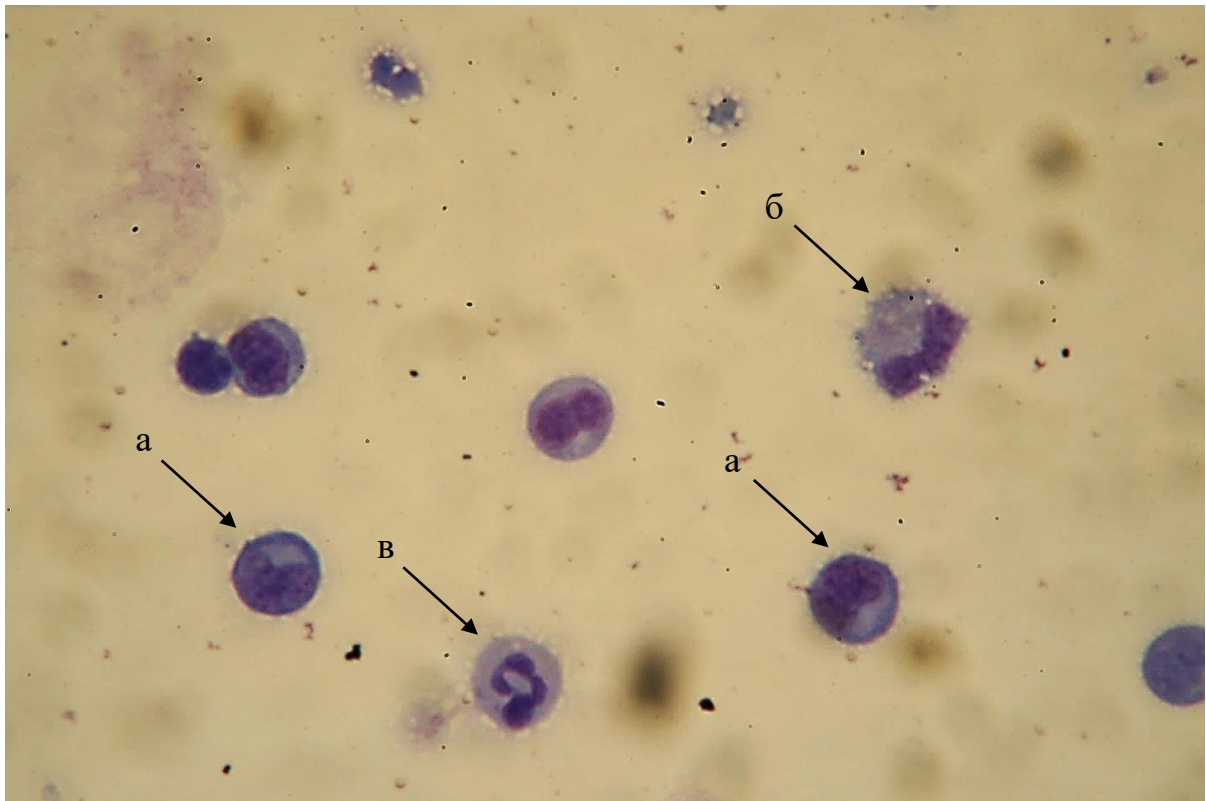


Рис.5.2. Фрагмент гранулоцитарно-макрофагальної колонії. А – мієлоцит, б – паличкоядерний гранулоцит, в – сегментоядерний гранулоцит. Забарвлення за Паппенгеймом. Збільшення $\times 630$.

5.2. Порівняльний аналіз колонієутворення гемопоетичних клітин-попередників, отриманих з кісткового мозку хворих на МДС-ІВ і контрольної групи осіб при культивуванні в умовах *in vitro*

Порівняння відносного вмісту різних типів колоній, що утворюються при культивуванні клітин з обох груп, показало, що гемопоетичні клітини-попередники мають різний потенціал до диференціювання *in vitro*, і при МДС-ІВ він є нижчим. Проте проліферативний потенціал при МДС переважав. Так, аналіз отриманих даних показав, що вміст змішаних колоній при МДС був дещо більшим, ніж у контрольній групі і дорівнював $3,1 \pm 0,2$, в той час як для пацієнтів без онкогематологічної патології він дорівнював $2,5 \pm 0,6$ (табл. 5.2).

Таблиця 5.2

Здатність до колонієутворення моноклеарів з кісткового мозку контрольної групи осіб (на 1×10^5 експлантованих клітин *in vitro* (n = 10)

Типи колоній $\times 10^5$			
КУО-ГЕММ	КУО-Г	КУО-ММ	КУО-ГМ
$2,5 \pm 0,6^*$	$10,4 \pm 1,2^*$	$15,3 \pm 2,0^*$	$46,5 \pm 3,4^*$

Примітка: * – різниця між вказаними показниками статистично достовірна $p \leq 0,05$

Порівняльний аналіз різних типів клітин-попередників у метилцелюлозі показав, що значення їх різнилися, підтверджуючи гетерогенний характер росту гемопоетичних колоній як при МДС-ІВ, так і у контролі (рис.5.3.).

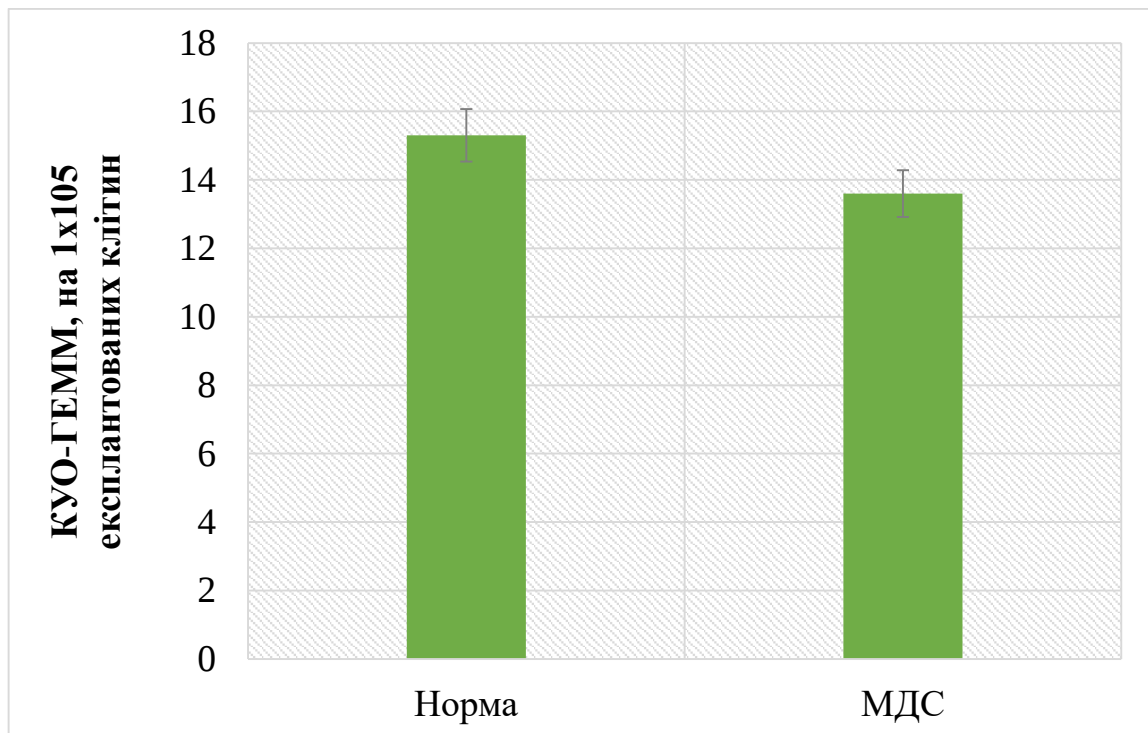


Рис. 5.3. Порівняння вмісту змішаних колоній (КУО-ГЕММ) при МДС-ІВ і контрольній групі в умовах культивування *in vitro*, ($p \leq 0,05$).

Відповідно, вміст гранулоцитарних колоній був майже вдвічі більшим при МДС у порівнянні з контролем і дорівнював 18,0, в той час у контролі він становив $10,4 \pm 1,2$ (рис 5.4).

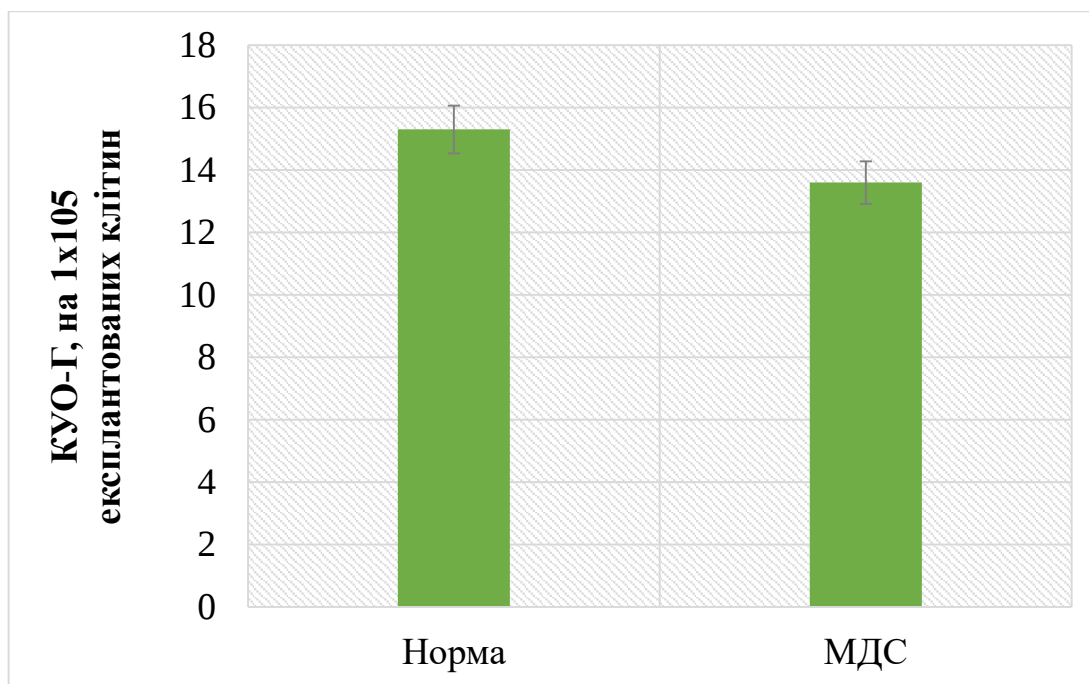


Рис. 5.4. Порівняння вмісту гранулоцитарних колоній (КУО-Г) при МДС-ІВ і у контрольній групі в умовах культивування *in vitro*, ($p \leq 0,05$).

Найбільша колонієутворююча здатність відмічалась для гранулоцитарно-макрофагальних колоній, як для МДС-ІВ, так і для контролю ($28,5 \pm 2,2$ і $46,5 \pm 3,4$, відповідно) (рис.5.5). Проте, перевага контрольних показників була переконлива; різниця між КУО-ГМ в обох випадках статистично достовірна ($p \leq 0,05$).

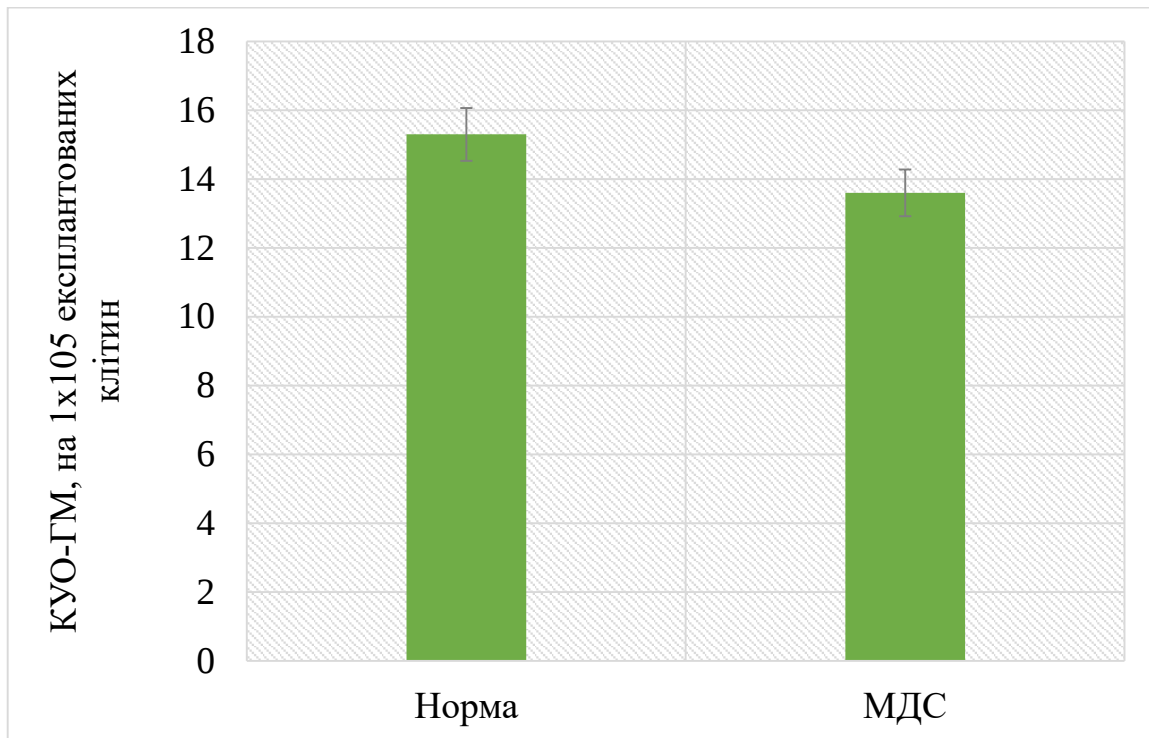


Рис.5.5. Порівняння вмісту гранулоцитарно-макрофагальних колоній (КЮО-ГМ) при МДС-ІВ і в контрольній групі в умовах культивування *in vitro*, ($p \leq 0,05$).

А от щодо моноцитарно-макрофагальних попередників (КЮО-ММ), кількість їх як при МДС, так і у контролі виявилася співставною і дорівнювала $13,6 \pm 2,5^*$ і $15,3 \pm 2,0$, відповідно (рис.5.6).

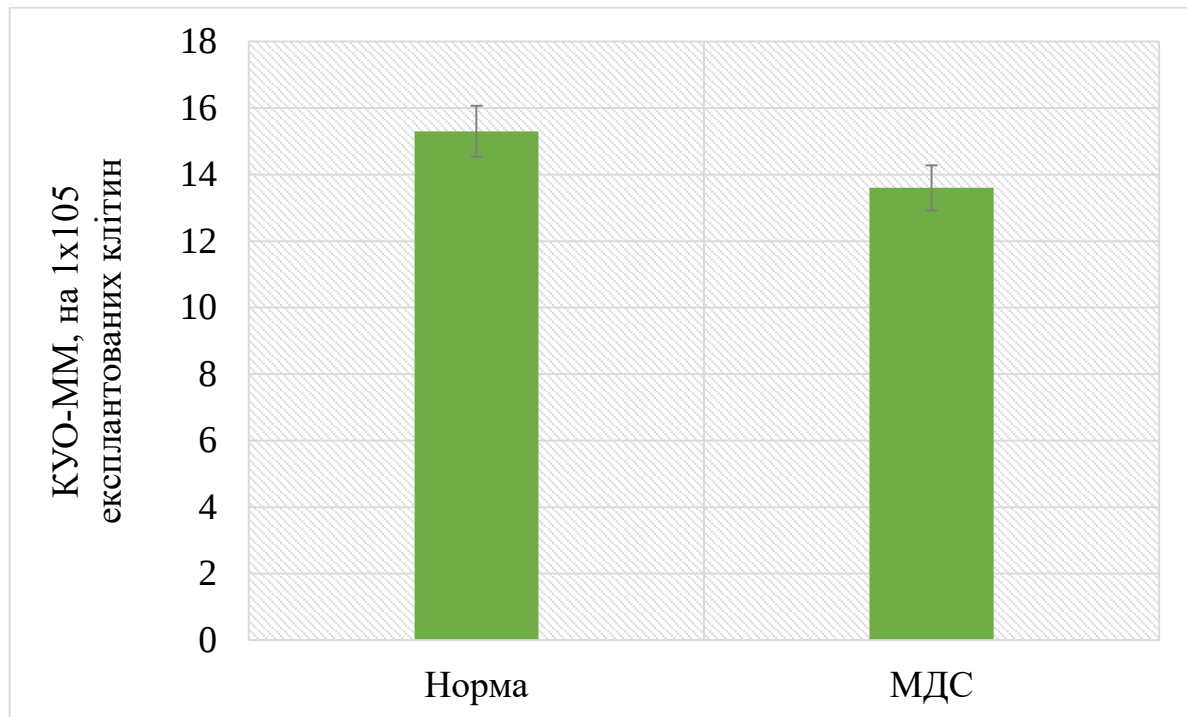


Рис.5.6. Порівняння вмісту моноцитарно-макрофагальних колоній (КУО-ММ) при МДС-ІВ і в контрольній групі в умовах культивування *in vitro*, ($p \leq 0,05$).

Таким чином можна зробити висновок, що популяція гемопоетичних клітин-попередників як при МДС, так і в контролі, гетерогенна.

При МДС-ІВ переважаючими є КУО-ГЕММ та КУО-Г, в той час як в контролі перевага надається більш зрілим попередникам, якими вважаються КУО-ГМ та КУО-ММ (рис.5.7.).

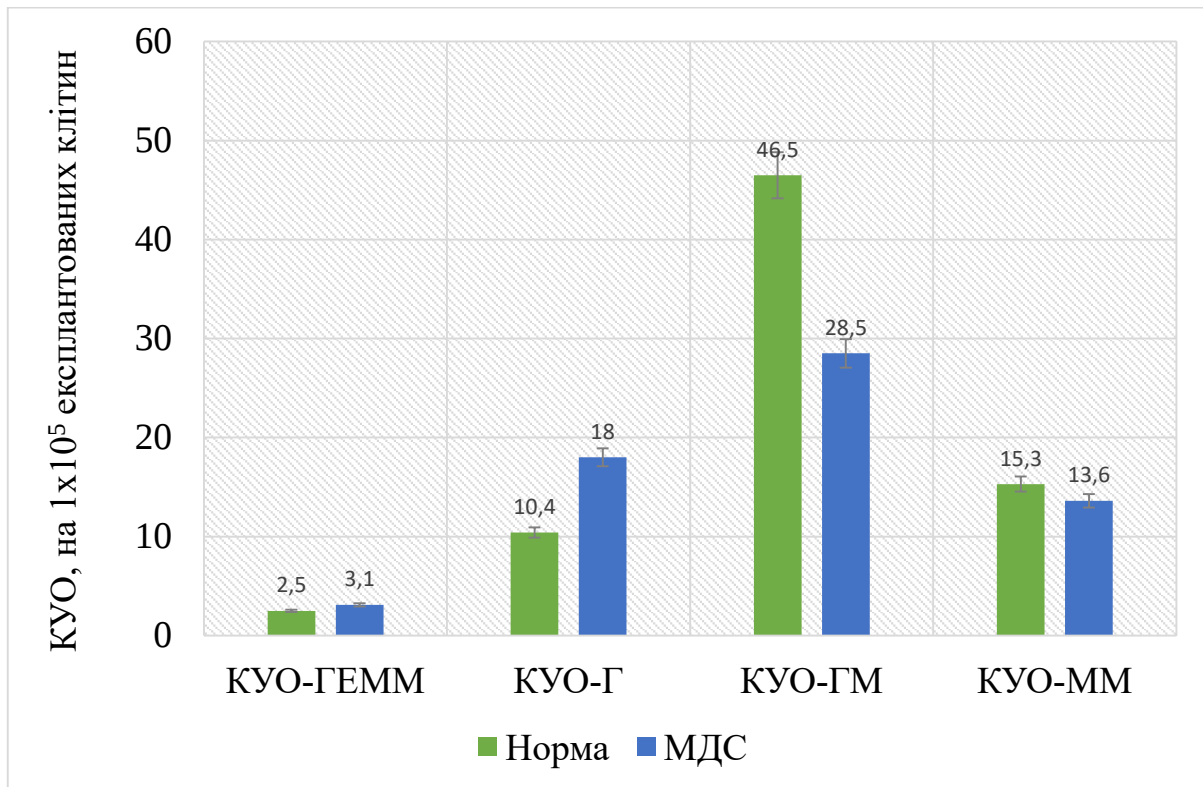


Рис.5.7. Порівняння вмісту колоній (КУО) при МДС-ІВ і в контрольній групі в умовах культивування *in vitro*, ($p \leq 0,05$).

5.3. Порівняльний аналіз різних типів колонієутворення у контрольної групи осіб *in vitro* і *in vivo*

Аналіз колонієутворення різних типів колоній у обох культуральних системах підтвердив думку про гетерогенність гемопоетичних клітин-попередників (табл.5.3).

Таблиця 5.3

Здатність до колонієутворення моноклеарів з кісткового мозку контрольної групи осіб у культуральних системах *in vitro* і *in vivo* (на 1×10^5 експлантованих клітин)

Культуральна система	Типи колоній $\times 10^5$			
	КУО-ГЕММ	КУО-Г	КУО-ММ	КУО-ГМ
<i>in vitro</i>	$2,5 \pm 0,6^*$	$10,4 \pm 1,2^*$	$15,3 \pm 2,0$	$46,5 \pm 3,4^*$
<i>in vivo</i>	$4,0 \pm 0,9^*$	$18,3 \pm 3,5^*$	$13,5 \pm 3,3$	$36,8 \pm 2,3^*$

Примітка: * – різниця між вказаними показниками статистично достовірна $p \leq 0,05$

Якщо в системі *in vivo* явно переважав клас гранулоцитарних попередників і змішаних, в системі *in vitro* – гранулоцитарно-макрофагальних. Різниця статистично достовірна ($p \leq 0,05$).

5.4. Порівняльний аналіз різних типів колонієутворення у групи осіб з МДС-ІВ *in vitro* і *in vivo*

Результати культуральних досліджень свідчать про те, що при МДС-ІВ як в культурі *in vitro*, так і в гелевих дифузійних камерах культивуються 4 типи колоній, різних за своїми морфофункціональними характеристиками. Оскільки біологічний матеріал був використаний в експериментах однаковий, то різниця у колонієутворенні різних типів колоній може бути пов'язана з тим, що наявність в культурі *in vitro* метилцелюлози є стимулюючим фактором для росту КУО-ГМ і КУО-ММ. А переважний ріст *in vivo* КУО-Г і КУО-ГЕММ може свідчити про те, що в системі *in vivo* створені умови для культивування більш ранніх попередників, ніж КУО-ГМ і КУО-ММ.

Цей феномен також можна пояснити тим, що в гетерогенній популяції гемопоетичних клітин-попередників існують короткоживучі (ST-HSC) і довгоживучі фракції стовбурових клітин (LT-HSCs). Друга вважається більш примітивною, у той час як перша містить попередники, які більш зрілі і швидко закінчують свій життєвий цикл. Дані інших авторів свідчать про те, що компартмент примітивних стовбурових клітин (LT-HSCs) має глибокі зміни в метилюванні ДНК і містить аномалії каріотипу.

РОЗДІЛ 6. ДОСЛІДЖЕННЯ ВЗАЄМОДІЇ ГЕМОПОЕТИЧНИХ І СТРОМАЛЬНИХ КЛІТИН-ПОПЕРЕДНИКІВ ПРИ МДС-ІВ У ДОВГОТРИВАЛІЙ КУЛЬТУРІ *IN VITRO*

6.1. Визначення ефективності використання стромальної підложки для підтримки гемопоезу у гелевих дифузійних камерах, занурених у культуру *in vitro*

Строма в культурі використовується як підложка для культивування гемопоетичних клітин. Вона являє собою матрикс для подальшої підтримки гемопоезу. Проте завжди у таких культурах є ризик контамінації стромальними клітинами. Для того, щоб уникнути потрапляння стромальних клітин у суспензію гемопоетичних клітин ми використали гелеві дифузійні камери, у внутрішню порожнину яких вводили гемопоетичні клітини. Камери занурювали у живильне середовище над стромальним шаром клітин. Завдяки вдало підібраним співвідношенням компонентів гелю, камери не сідали на фідер і не плавали на поверхні, а знаходились у середніх шарах середовища і були подібні субмарині [4].

На першому етапі роботи ми провели отримання адгезивних клітин з кісткового мозку для визначення їх кількості, необхідної для формування підложки для подальшого їх використання у якості фідера при культивуванні на них гемопоетичних клітин (див. розділ 2). Використовували кілька концентрацій клітин від 1×10^6 до 1×10^7 . Аналіз результатів показав, що концентрація клітин 1×10^6 не здатна сформувати конфлюентний шар (рис.6.1. а), тоді як концентрація клітин 1×10^7 призводила до відшаровування адгезивних клітин від поверхні пластика. 5×10^6 була такою концентрацією клітин, яка формувала цілісний шар адгезованих клітин, здатних підтримувати гемопоез (рис. 6.1. б). У подальшому ми притримувалися цієї концентрації клітин для отримання фідерів з нормальних кісткомозкових клітин, які готувалися заздалегідь.

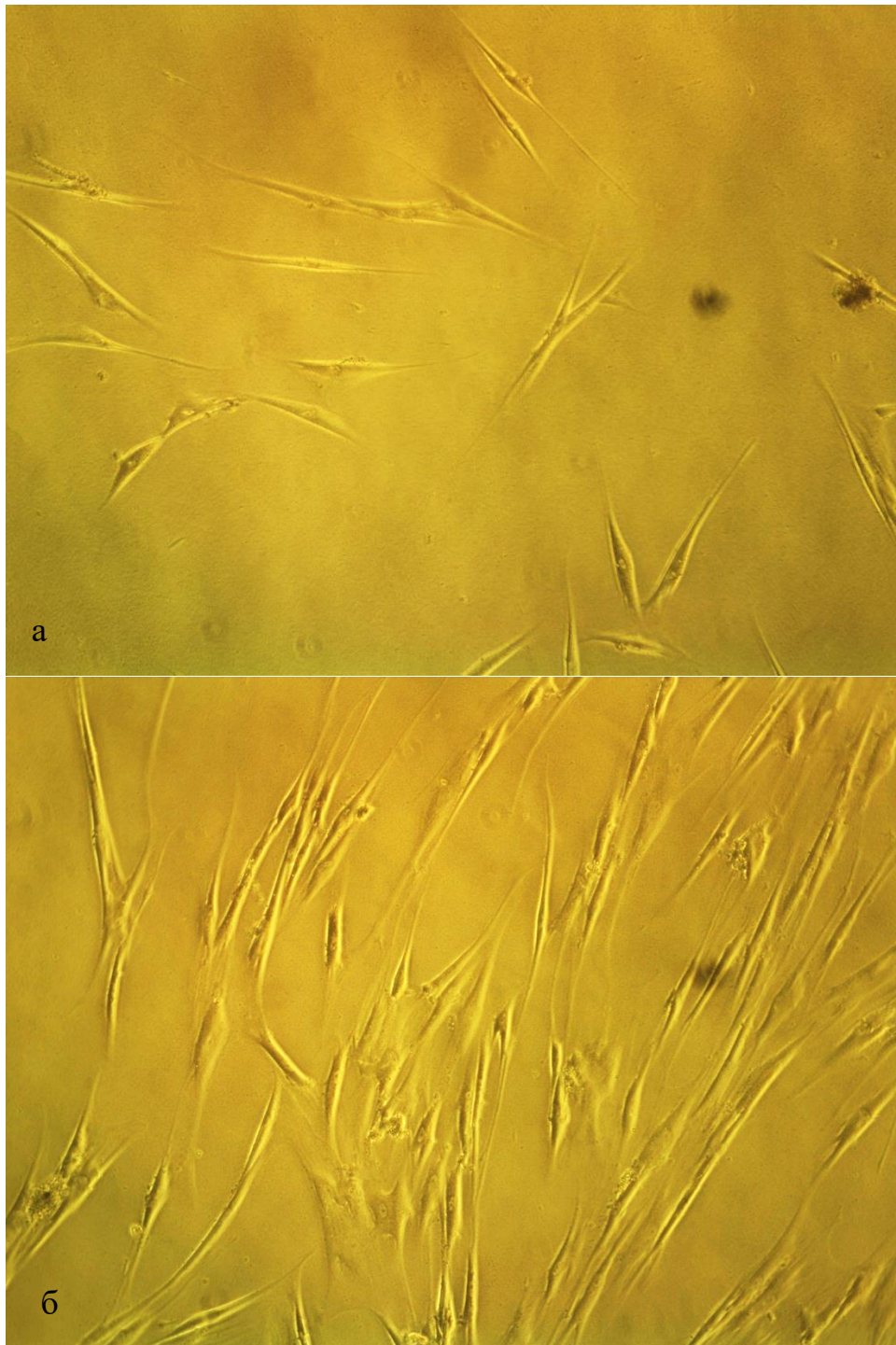


Рис. 6.1. Визначення необхідної для підтримки гемопоезу кількості стромальних клітин в культурі *in vitro*. А – концентрація клітин 1×10^6 ; Б – концентрація клітин 5×10^6 . Інвертований мікроскоп. Збільшення $\times 200$.

Культивували гемопоетичні клітини-попередники осіб без онкогематологічної патології у гелевих дифузійних камерах, занурених у середовище з фідерним шаром і без нього *in vitro*. На 2-му, 3-му і 5-му тижнях

камери вилучали з середовища і визначали клоногенну активність експлантованих в камеру клітин. У кожний термін аналізували по 3 зразки. Кількість гемопоетичних попередників, які представляли колонієутворюючі одиниці гранулоцитарно-макрофагальні (КУО-ГМ), отримані на кожному етапі культивування, порівнювали між собою. Дизайн експерименту був такий: гемопоетичні клітин з кісткового мозку контрольної групи осіб у концентрації 1×10^5 вводили з напіврідким агаром у внутрішню порожнину камер. Камери занурювали у живильне середовище без фідера і з фідерним шаром, отриманим з кістковомозкових клітин хворих без онкогематологічної патології. Оцінку функціональної активності гемопоетичних клітин здійснювалася за кількістю КУО-ГМ, які рахували у камерах без демонтажу під інвертованим мікроскопом.

У разі культивування без фідера колонії не формувалися. Проте кількість малих кластерів у варіанті без фідера становила $18,8 \pm 0,4$ ($p < 0,05$) (табл.6.1). КУО-ГМ на фідері через два тижні дорівнювали $36,7 \pm 3,2$, через 3 – $48,6 \pm 3,8$, через 5 – $28,5 \pm 5,82$. Через 2 тижні у культурах переважали компактні колонії І типу ($28,2 \pm 2,7$), вони складали приблизно 70% від загальної кількості всіх колоній (рис. 6.2.). Через 3 тижні переважали колонії «з вінчиком» ($32,3 \pm 2,8$), а через 5 тижнів – дифузні ($20,5 \pm 1,8$).

Таблиця 6.1

Колонієутворення в довготривалій культурі в залежності від наявності фідерного шару з розрахунку на 1×10^5 культивованих клітин

Показник	Термін культивування, тижнів								
	2			3			5		
	Тип колоній								
	I	II	III	I	II	III	I	II	III
КУО-ГМ/1x10 ⁵	38,2 ± 2,7	13,0 ± 2,7	5,3 ± 1,5	44,0 ±3,5	17,8 ± 2,2	8,2 ± 1,3	27,6 ±3,2	11,0 ± 2,8	10,3 ± 3,2
Сума КУО-ГМ/1x10 ⁵ (на фідері)	36,7 ± 3,2*			48,6 ± 3,8*			28,5 ± 5,8*		

Продовження табл. 6.1

КУО-ГМ (без фідера) / 1×10^5	-	-	-
Сума КЛУО-ГМ (без фідера) / 1×10^5	$18,8 \pm 0,4$ *	-	-

Примітка: * відмінності у разі культивування над фідерним шаром і без нього достовірні ($p < 0,05$).

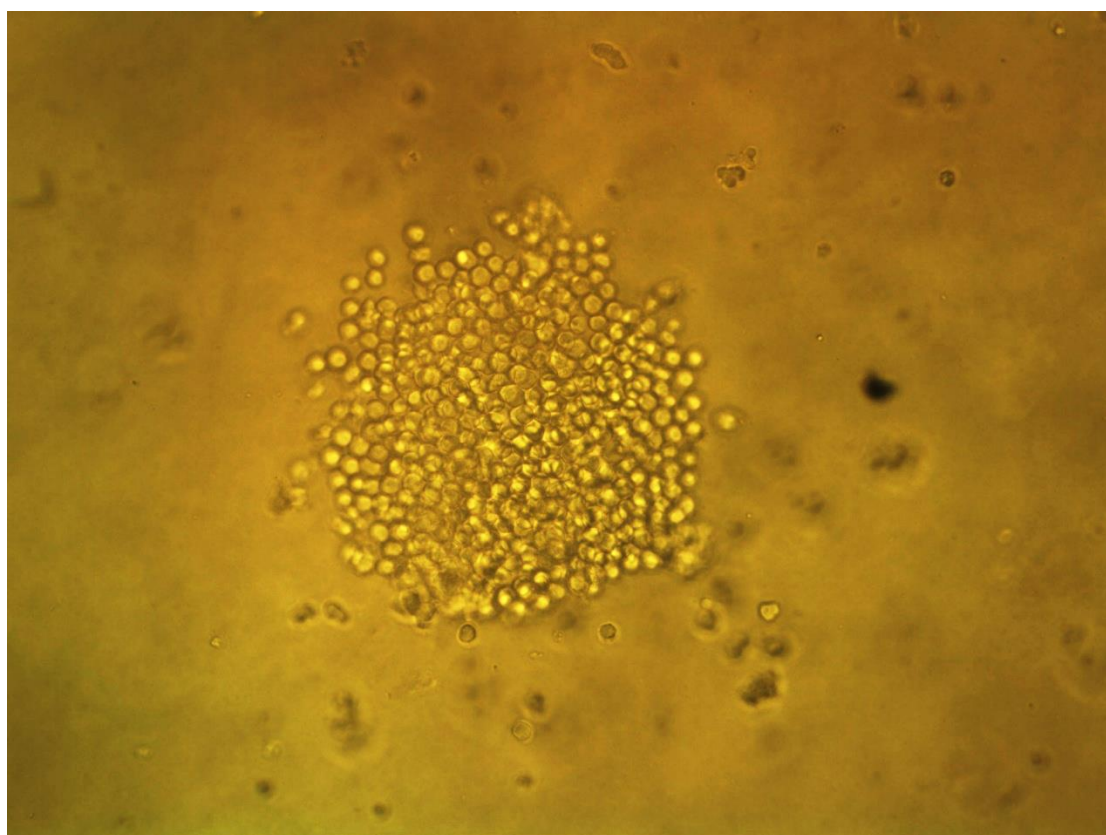


Рис. 6.2. Колонія І-го типу в культурі з напіврідким агаром *in vitro*, отримана з клітин, культивованих у дифузійних камерах над фідерним шаром. Інвертований мікроскоп. $\times 200$

У культурах без фідера переважали кластероутворюючі одиниці, що володіли обмеженою проліферативною активністю і здатністю пройти незначну кількість поділів (рис.6.3.).

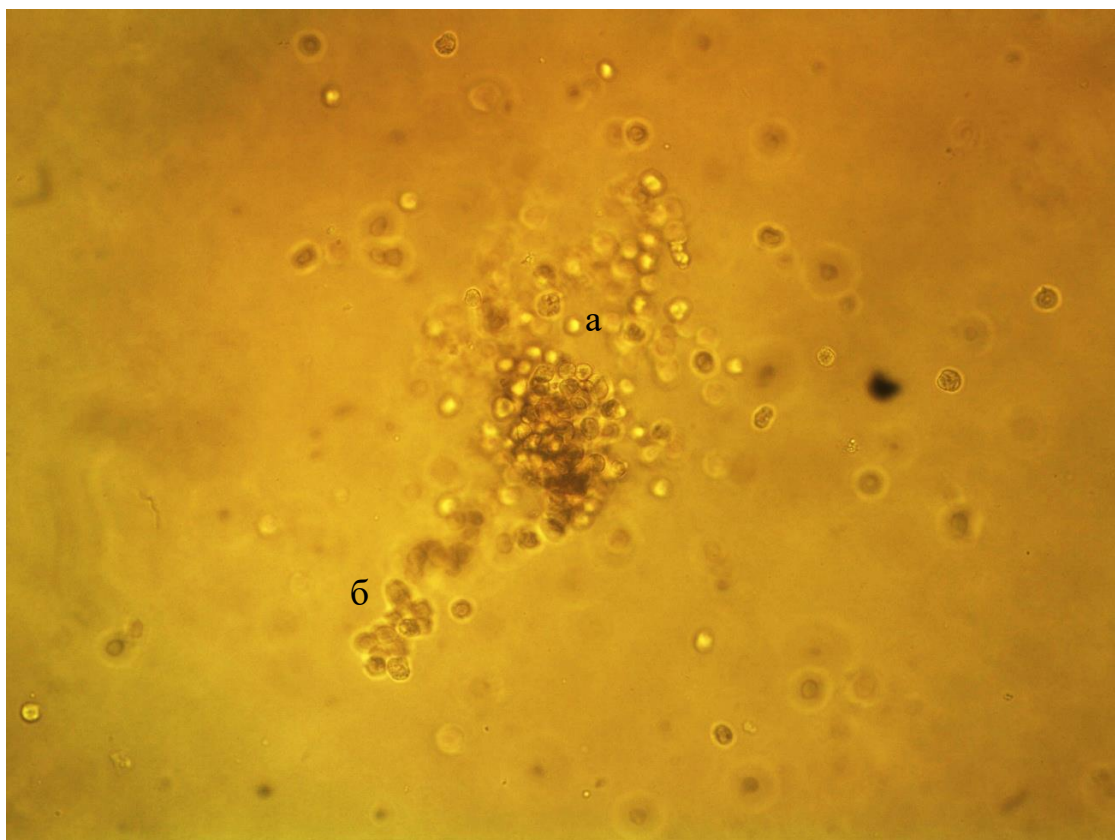


Рис.6.3. Кластери великі (а) і малі (б) в культурі з напіврідким агаром, отримані з клітин, культивованих у дифузійних камерах без фідера. Інвертований мікроскоп. X200

Відсутність колоній і активне кластероутворення у культурі протягом перших 2-х тижнів за відсутності фідерного шару свідчили про згасання проліферативної і диференціювальної активності клітин у зв'язку з відсутністю стимуляторів гемопоезу. Продовження культивування клітин у такій системі було недоцільне.

Найкращий результат, що відображається у максимальному збільшенні кількості клоногенних попередників у порожнині гелевої дифузійної камери, був отриманий за наявності фідерного шару на 3-му тижні перебування клітин в цій системі (табл.6.1). Кількість кластерів суттєво не відрізнялася у вказані терміни. Це можна пояснити тим, що кластери утворюються з більш зрілих попередників, які пройшли кілька поділів до потрапляння у культуру і не можуть у повній мірі

відображати гемопоез. Тому кількісний розподіл кластерів не має вирішального значення при оцінці проліферативного потенціалу культивованих клітин.

6.2. Вивчення впливу стромы, сформованої з адгерентних клітин кісткового мозку хворих на МДС-ІВ і у нормі на колонісутворюючу здатність гемопоетичних клітин-попередників в культурі дифузійних камер *in vitro*

В експериментах використовували стромальні підложки. Перша була отримана від пацієнтів без онкогематологічної патології, які формували групу порівняння (10 осіб). Клітини кісткового мозку хворих на МДС-ІВ (20 осіб) занурювали у повне живильне середовище DMEM, яке нашаровувалося на стромальний шар, отриманий з кісткового мозку пацієнтів без онкогематологічної патології. Культивували гемопоетичні клітини кісткового мозку хворих на МДС-ІВ у кількості 1×10^5 клітин у гелевих дифузійних камерах, занурених у живильне середовище над шаром стромальних клітин, отриманих заздалегідь від осіб без онкогематологічних захворювань (див. розділ 2). Визначали КУО-ГМ на 14-й день культивування. Отримали $12,4 \pm 0,9$ колоній на 1×10^5 експлантованих клітин. Це втричі менше, ніж в контролі. За контроль приймали значення КУО-ГМ гемопоетичних клітин від пацієнтів без онкогематологічних порушень на підложці зі здорових клітин. Цей показник дорівнював $36,7 \pm 3,2$ (рис. 6.4.).

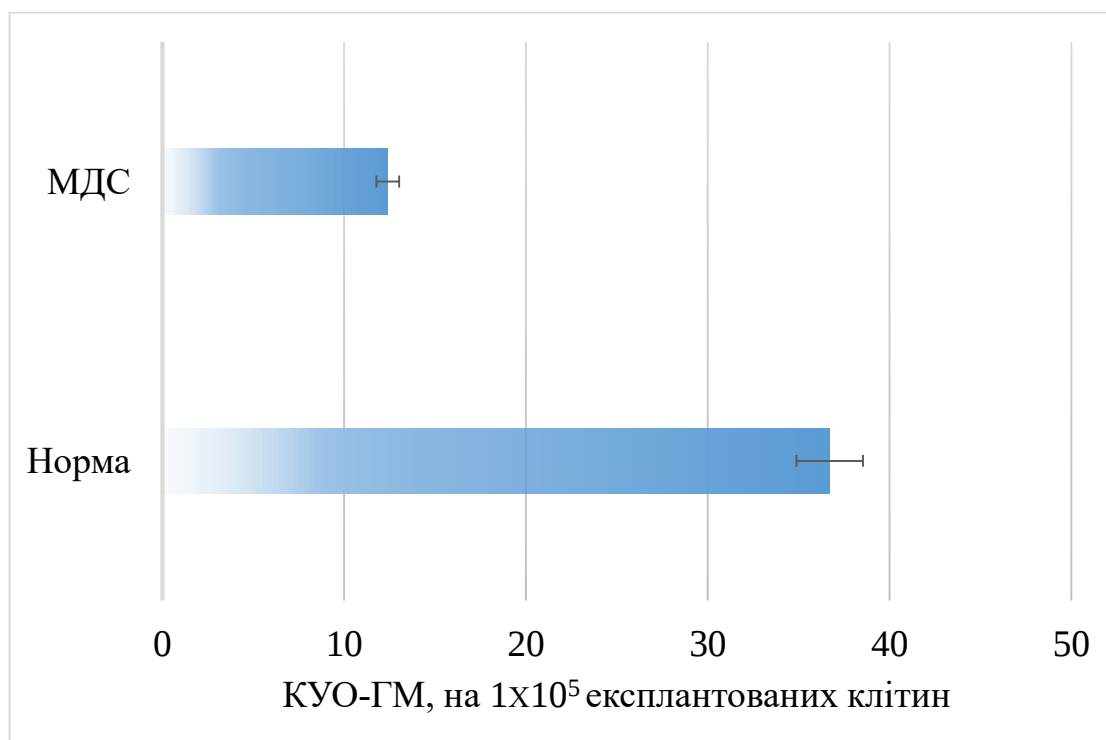


Рис.6.4. Результати культивування КУО-ГМ нормального кісткового мозку та хворих на МДС-ІВ на підложці зі стромы гематологічно здорових осіб.

Другий варіант шару адгезивних клітин вирощували з кістковомозкових клітин хворих на МДС-ІВ. Виявилось, що оптимальна концентрація стромальних клітин 5×10^6 , яка була підібрана для контролю, не призводила до формування цілісного шару *in vitro*. Він був переривчастий і формувався довше на 5 днів. Ми подвоїли кількість клітин і досягли формування конфлюентного шару на 14-й день культивування. З чого ми прийшли до висновку, що строма при МДС дефектна.

Проте, у разі використання дефектного стромального шару (від МДС-ІВ) як фідеру для нормальних гемопоетичних клітин, отримали значення КУО-ГМ, співставні з нормою – $36,5 \pm 4,8$ колоній на 1×10^5 експлантованих клітин (різниця статистично недостовірна). Виходить, що шар з дефектної стромы діяв так, як і шар з нормальних кістковомозкових клітин, незважаючи на те, що він був отриманий від хворих з МДС-ІВ. Це означає, що у фідерному шарі при МДС-ІВ залишаються функціонально активні клітини, які здатні підтримувати гемопоєз у обсязі, співставному з контролем.

РОЗДІЛ 7. ВПЛИВ РЕКОМБІНАНТНИХ ЦИТОКІНІВ НА КОЛОНІЄУТВОРЮЮЧУ ЗДАТНІСТЬ ГЕМОПОЕТИЧНИХ КЛІТИН-ПОПЕРЕДНИКІВ ПРИ МДС *IN VITRO*

7.1. Кінетика формування клітинних агрегатів із кісткового мозку контрольної групи осіб у живильному середовищі із різними факторами росту

Був проведений аналіз функціональної активності клітин-попередників 20 пацієнтів з МДС-ІВ у ініціальний період до лікування і 10 осіб, у яких при стернальній діагностичній пункції не виявлено онкогематологічної патології (контрольна група). На першому етапі, для підбору концентрацій факторів, культивували кістковий мозок контрольної групи осіб. Дослідження проводилися на тлі зростаючої концентрації трьох факторів – гранулоцитарно-макрофагального (GM-CSF), гранулоцитарного (G-CSF) і інтерлейкіну-3 (IL-3). Концентрацію ростових факторів було підібрано емпірично. Мінімальна концентрація вважалася та, при якій з'являлися перші агрегати гемопоетичних клітин. З розрахунку на 1×10^5 експлантованих клітин вона становила 2,5 нг/мл. Відповідно, кількість клітинних агрегатів, більших за 40 клітин, на 14-й день культивування становила $6,0 \pm 1,2$, $5,3 \pm 0,8$ і $8,5 \pm 1,5$, відповідно. У подальшому концентрації ростових факторів подвоювали. На наступному етапі вона сягала 5 нг/мл. При підвищенні концентрації ростових факторів виявлявся значний ріст колонієутворення в культурі, і колонієутворююча здатність становила $12,0 \pm 2,5$, $10,3 \pm 1,5$ і $14,1 \pm 2,3$, відповідно. При концентрації ростових факторів 10 нг/мл КУО-ГМ сягала $22,1 \pm 2,8$, $20,6 \pm 2,5$ і $27,5 \pm 3,2$, відповідно. Концентрація ростових факторів 20 нг/мл виявилася оптимальною і викликала формування колоній у кількості $38,3 \pm 3,5$, $34,0 \pm 4,3$ і $42,5 \pm 5,4$, відповідно (табл.7.1).

Таблиця 7.1.

Ефективність колонієутворення ГПК *in vitro* при зростаючих дозах цитокінів

Назва цитокінів	GM-CSF	G-CSF	IL-3
Концентрація цитокінів, нг/мл	2,5	2,5	2,5
КУО-ГМ	6,0±1,2	5,3±0,8	8,5 ±1,5*
Концентрація цитокінів, нг/мл	5	5	5
КУО-ГМ	12,0±2,5	10,3±1,5	18,1 ±2,3*
Концентрація цитокінів, нг/мл	10	10	10
КУО-ГМ	22,1±2,8	20,6±2,5	27,5 ±3,2*
Концентрація цитокінів, нг/мл	20	20	20
КУО-ГМ	38,3±3,5*	34,0±4,3*	42,5 ±5,4*

Різниця між показниками * статистично достовірна

7.2. Вплив різних факторів росту і їх комбінації на КУО-ГМ при МДС-ІВ в культурі *in vitro*

Культури кісткового мозку хворих на МДС-ІВ демонстрували глибоке пригнічення кровотворної функції при використанні кожного з трьох ростових факторів в їх оптимальних концентраціях. КУО-ГМ дорівнювала 4,0±0,5, 7,0±0,8 і 9,3±1,5 на 1×10^5 експлантованих клітин, відповідно. Характерним виявилось те, що перші два фактори поступалися своєю активністю ІЛ-3. Різниця статистично достовірна.

На наступному етапі досліджень ми зробили дві серії експериментів: у першій ми вдвічі збільшили концентрацію факторів, у другій – використали їх комбінацію. Виявилося, що при збільшенні концентрації ростових факторів ефективність колонієутворення при МДС-ІВ суттєво підвищувалася. Так, при збільшенні концентрації цитокінів вдвічі при використанні GM-CSF колонієутворююча здатність дорівнювала 18,3±1,8, при G-CSF – 12,1±1,5 і при

IL-3 – $24,5 \pm 2,1$, відповідно. При використанні комплексу цитокінів їх КУО-ГМ дорівнювала $28,7 \pm 3,2$, що статистично достовірно вище у порівнянні з цитокінами, діючими окремо, але не досягає значень контрольних показників (табл.7.2).

Таблиця 7.2

Ефективність колонієутворення ГПК від МДС-ІВ при високих дозах цитокінів і їх комбінації у культурі *in vitro*

Назва цитокіна	Концентрація цитокіна	КУО-ГМ
GM-CSF	40 нг/мл	$18,3 \pm 1,8^*$
G-CSF	40 нг/мл	$12,1 \pm 1,5^*$
IL-3	40 нг/мл	$24,5 \pm 2,1^*$
Комбінація GM-CSF+G-CSF+IL-3	По 40 нг/мл	$28,7 \pm 3,2^*$

Різниця між показниками * статистично достовірна

Аналіз результатів проведених досліджень показав, що клітини-попередники при МДС, незважаючи на дефектний ріст, відповідають на стимул проліферацією клітин у клонах, проте межа відповіді при МДС-ІВ стає більш високою, чутливість падає, і це виражається у низькому колонієутворенні. Цей феномен ми спостерігали на першому, самому численному, етапі захворювання (МДС-ІВ). Він не охоплює етапи подальшого перебігу, проте, при цій формі відповіді на цитокіни можна досягти, збільшуючи їхню концентрацію.

Таким чином, беручи до уваги, що при МДС ГПК демонструють дефектну пригнічену реакцію на цитокіни, проте все ж таки здатні на відповідь при збільшенні дози препаратів, і особливо, при їх комбінації, можна рекомендувати такий підхід при вивченні цієї патології в експерименті, а при складанні лікувальних протоколів враховувати дані, отримані поза організмом, в культурі клітин.

РОЗДІЛ 8. АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ

Дисертаційна робота присвячена визначенню особливостей функціонування гемопоетичних клітин-попередників в нормі і порушеннях гемопоезу (МДС). Доцільність визначення морфологічних і функціональних показників гемопоетичних клітин-попередників з кісткового мозку мишей, щурів і людини була обумовлена необхідністю поглиблення знань про особливості їх функціонування, вирішення питання про гетерогенність клітин-попередників у різних ссавців і людини, як загальне виявлення біологічної природи і потенцій у культурі клітин *in vivo* [9].

Культитивування гемопоетичних клітин у культурі *in vitro* потребує наявності цитокінів, які регулюють проліферативну активність клітинних агрегатів. Вивчаючи вплив різних рекомбінантних цитокінів на колонієутворюючу здатність гемопоетичних клітин-попередників *in vitro*, ми проаналізували кінетику формування клітинних агрегатів із кісткового мозку контрольної групи осіб у живильному середовищі із різними факторами росту. Дослідження проводилися на тлі зростаючої концентрації трьох факторів – гранулоцитарно-макрофагального (GM-CSF), гранулоцитарного (G-CSF) і інтерлейкіну-3 (IL-3) від 2,5 до 20 нг/мл. Концентрація ростових факторів 20 нг/мл у контролі виявилася оптимальною і викликала формування колоній у кількості $38,3 \pm 3,5$, $34,0 \pm 4,3$ і $42,5 \pm 5,4$, відповідно.

На наступному етапі досліджень ми зробили дві серії експериментів: у першій ми вдвічі збільшили концентрацію факторів, у другій – використали їх комбінацію. Виявилося, що при збільшенні концентрації ростових факторів ефективність колонієутворення при МДС-ІВ суттєво підвищувалася. Так, при збільшенні концентрації цитокінів вдвічі (40 нг/мл) при використанні GM-CSF колонієутворююча здатність дорівнювала $18,3 \pm 1,8$, при G-CSF – $12,1 \pm 1,5$ і при IL-3 – $24,5 \pm 2,1$. При використанні комплексу цитокінів їх КУО-ГМ дорівнювали

28,7±3,2, що статистично достовірно вище у порівнянні з цитокінами, діючими окремо, але не досягає значень контрольних показників. Таким чином, результати досліджень показали, що при МДС відбувається дефектне сприйняття стимулів. Межа чутливості знижується. Проте спроможність реагувати залишається, що переконливо показано у культурі.

Цей феномен ми спостерігали на ранньому, самому численному, етапі захворювання (МДС-ІВ). Він не охоплює етапи подальшого перебігу, але при цій формі, відповіді можна досягти, збільшуючи концентрацію цитокінів. Таким чином, беручи до уваги, що при МДС ГКП демонструють дефектну пригнічену реакцію на цитокіни, проте все ж таки здатні на відповідь при збільшенні дози препаратів, і особливо, при їх комбінації, можна рекомендувати такий підхід при вивченні цієї патології в експерименті, а при складанні лікувальних протоколів враховувати дані, отримані поза організмом, в культурі клітин.

При культивуванні *in vitro* було виявлено гетерогенність типів колоній при культивуванні кісткового мозку. Виявилось, що як і у людини, у ссавців визначаються чотири типи попередників. Результати культивування гемопоетичних клітин-попередників хворих на МДС-ІВ у метилцелюлозі свідчили про наявність чотирьох типів колоній у культурі. Вони поділялися на гранулоцитарно-еритроїдно-мегакаріоцитарно-макрофагальні чи змішані, (КУО-ГЕММ), гранулоцитарні (КУО-Г), гранулоцитарно-макрофагальні (КУО-ГМ), моноцитарно-макрофагальні (КУО-ММ). Так, кількість змішаних колоній (КУО-ГЕММ) з кісткового мозку людини дорівнювала $2,0 \pm 0,9$ на 10^5 експлантованих клітин, в той час як для гранулоцитарних колоній (КУО-Г) цей показник був у 9 разів більшим і дорівнював $18,3 \pm 3,5$ на 1×10^5 експлантованих клітин. Встановлено, що кількість моноцитарно-макрофагальних колоній (КУО-ММ) перевищувала кількість змішаних колоній у 6 разів і дорівнювала $13,5 \pm 3,3$, в той час як у порівнянні з гранулоцитарними колоніями цей показник був значно меншим. Найбільша колонієутворююча здатність на 12-14-й день відмічалася

для гранулоцитарно-макрофагальних колоній (КУО-ГМ) і дорівнювала $36,8 \pm 2,3$ на 10^5 експлантованих клітин.

У мишей і щурів характер колонієутворення в культурі відрізнявся, але в обох випадках визначалася така ж саме гетерогенність типів колоній, а саме, КУО-ГЕММ, КУО-Г, КУО-ГМ і КУО-ММ. Перевага макрофагальних колоній у мишей і, особливо, у щурів, так як і їх схильність до кластероутворення в культурі пов'язана з біологічними особливостями ссавців і повинна враховуватись при проведенні культуральних досліджень. Таким чином, було доведено, що гетерогенність гемопоетичних клітин-попередників не є перевагою кісткового мозку людини, а має ширше розуміння, охоплюючи представників біологічного світу, на прикладі мишей і щурів. Отримані дані, які вказують на особливості поведінки клітин миші, щура і людини в культурі гелевих дифузійних камер, поглиблюють уявлення про функціонування і кінетику росту стовбурових клітин і їх найближчих нащадків в організмі ссавців і людини і мають практичний вихід для подальших досліджень кровотворення в нормі і при злоякісних захворюваннях. Кістковий мозок миші, щура і людини культивувався в гелевих дифузійних камерах, занурених у організм лінійних мишей, оброблених за добу цитостатиком ендоксаном (Baxter Oncology GmbH, Німеччина). Аналіз отриманих даних показав, що кількість клітинних агрегатів, утворених під час культивування у напіврідкому агарі, лінійно зростала із збільшенням концентрації ядровмісних клітин (ЯВК), що занурювали у гелеву дифузійну камеру перед культивуванням, як мишей і щурів, так і людини. Визначений найбільш придатний термін зняття результатів експериментів – 12-14-а доба культивування для кісткового мозку людини, 10-й день – для миші і 8-й день – для щура. Кількість клітин, що була вибрана, як оптимальна для проведення подальших досліджень у всіх трьох випадках, становила 5×10^5 клітин в 1мл, або 1×10^5 клітин на одну камеру. Про це свідчить проліферативний потенціал колонієутворення.

Із метою встановлення особливостей функціональної активності гемопоетичних стовбурових клітин та клітин-попередників кісткового мозку (КМ) пацієнтів з МДС-ІВ у порівнянні з контрольною групою осіб проводили підрахунок кількості клітинних агрегатів. Колонії мали примхливу форму. Серед них переважали дифузні колонії і дифузні з вінчиком. За формою при МДС, так як і в нормі, розрізняли три типи колоній: компактні, змішані (з вінчиком) і дифузні [7]. Проте в разі культивування кісткомозкових клітин у нормі переважали компактні колонії округлої форми, які складали 60 % від решти типів колоній. Примітивні клітини, які проліферують, формували центр колоній (бласти, промієлоцити), їх оточували проліферуючі клітини- мієлоцити і метамієлоцити, тоді як дозріваючі клітини (палочкоядерні і сегментоядерні лейкоцити) знаходились на периферії колоній.

При МДС поряд з пригніченням колонієутворюючої активності визначали зменшення кількості клітин у клонах. Цей показник не перевищував 50 клітин, що свідчило про обмежену здатність клітин-попередників до проліферації. Спостерігався порушений порядок знаходження клітин у клонах, коли більш примітивні і дозріваючі клітини розташовувались хаотично. Вивчення залежності між кількістю колоній та числом мононуклеарних клітин у 1 мл кісткового мозку у хворих на МДС-ІВ показало, що ця залежність носить прямий кореляційний характер.

Порівняння відносного вмісту різних типів колоній, що утворюються при культивуванні клітин групи осіб з МДС і у контролі показало, що гемопоетичні клітини-попередники мають різний потенціал до диференціювання *in vitro*, і при МДС-ІВ він є нижчим. Найбільша колонієутворююча здатність відмічалась для гранулоцитарно-макрофагальних колоній, як для МДС-ІВ, так і для контролю ($28,5 \pm 2,2$ і $46,5 \pm 3,4$, відповідно). А от щодо моноцитарно-макрофагальних попередників (КУО-ММ), кількість їх як при МДС, так і у контролі виявилася співставною і дорівнювала $13,6 \pm 2,5$ і $15,3 \pm 2,0$, відповідно.

Результати аналізу свідчать про те, що популяція гемопоетичних клітин-попередників як при МДС, так і в контролі, гетерогенна. При МДС-ІВ переважаючими примітивні попередники, якими є КУО-ГЕММ та КУО-Г, в той час як в контролі перевага надається більш зрілим попередникам, якими вважаються КУО-ГМ та КУО-ММ.

Роль мікрооточення у механізмі розвитку МДС найкраще може бути продемонстрованою у культурі клітин. Для цього нами була використана модель, в якій можна стежити за взаємодією гемопоетичних і стромальних клітин-попередників при МДС-ІВ у довготривалій культурі *in vitro*. Ми використали цю модель для визначення ефективності використання стромальної підложки для підтримки гемопоезу у гелевих дифузійних камерах, занурених у культуру при МДС *in vitro*.

Строма в культурі використовується як підложка для культивування гемопоетичних клітин. Вона являє собою матрикс для подальшої підтримки гемопоезу. Проте завжди у таких культурах є ризик контамінації стромальними клітинами. Для того, щоб уникнути потрапляння стромальних клітин у суспензію гемопоетичних клітин ми використали гелеві дифузійні камери, у внутрішню порожнину яких вводили гемопоетичні клітини. Камери занурювали у живильне середовище над стромальним шаром клітин. Завдяки вдало підібраним співвідношенням компонентів гелю, камери не сідали на фідер і не плавали на поверхні, а знаходились у середніх шарах середовища і були подібні субмарині [4].

Нами була визначена оптимальна концентрація клітин, необхідних для отримання шару адгезивних клітин в нормі і при МДС. Виявилося, що у контролі цей показник дорівнює 5×10^6 , а при МДС – 1×10^7 експлантованих клітин. Конфлюєнтний шар формувався з кістковомозкових клітин хворих на МДС пізніше на тиждень. Найкращий результат підтримки гемопоезу у камерах, занурених над живильним середовищем з фідером, спостерігався на 3-й тиждень культивування і дорівнював $48,6 \pm 3,8$.

Кількість кластерів суттєво не відрізнялася у вказані терміни. Це можна пояснити тим, що кластери утворюються з більш зрілих попередників, які пройшли кілька ділень до потрапляння у культуру і не можуть в повній мірі відображати гемопоез. Тому кількісний розподіл кластерів не має вирішального значення при оцінці проліферативного потенціалу культивованих клітин.

На наступному етапі досліджень вивчали вплив стромальної підложки, сформованої з адгерентних клітин кісткового мозку від хворих на МДС-ІВ і у нормі, на колонієутворюючу здатність гемопоетичних клітин-попередників в культурі дифузійних камер *in vitro*. В експериментах використовували два типи стромальної підложки. Перша була отримана від пацієнтів без онкогематологічної патології, які формували групу порівняння. Клітини кісткового мозку хворих на МДС-ІВ занурювали у повне живильне середовище DMEM, яке нашаровувалося на стромальний шар, отриманий з кісткового мозку пацієнтів без онкогематологічної патології. Культивували гемопоетичні клітини кісткового мозку хворих на МДС-ІВ у кількості 1×10^5 клітин у гелевих дифузійних камерах, занурених у живильне середовище над шаром стромальних клітин, отриманих заздалегідь від осіб без онкогематологічних захворювань. Визначали КУО-ГМ на 12-14-й день культивування. Отримали $12,4 \pm 0,9$ колоній на 1×10^5 експлантованих клітин. Це втричі менше, ніж в контролі. За контроль приймали значення КУО-ГМ гемопоетичних клітин від пацієнтів без онкогематологічних порушень на підложці з таких самих клітин. Цей показник на 12-14-й день дорівнював $36,7 \pm 3,2$.

Надалі дизайн експерименту було модифіковано. Шар адгезивних клітин вирощували з кістковомозкових клітин хворих на МДС-ІВ. Виявилось, що оптимальна концентрація стромальних клітин 5×10^6 , яка підібрана для контролю, не призводила до формування цілісного шару *in vitro*. Він був переривчастий і формувався довше на 5 днів. Ми подвоїли кількість клітин і досягли формування конфлюентного шару на 14-й день культивування. З чого ми прийшли до висновку, що строма при МДС дефектна. Проте, коли використали такий

стромальний шар як фідер для нормальних гемопоетичних клітин, отримали значення КУО-ГМ, співставні з нормою – $36,5 \pm 4,8$ колоній на 1×10^5 експлантованих клітин (різниця статистично недостовірна). Отже, шар з дефектної стромы діяв так, як і шар з нормальних кістковомозкових клітин, незважаючи на те, що він був дефектним. Це означає, що у фідерному шарі при МДС-ІВ залишаються функціонально спроможні клітини, які здатні підтримувати гемопоез у обсязі, співставному з контролем, і своєчасне використання лікувальних засобів на цьому етапі перебігу захворювання має шанси на позитивний результат, щоб протидіяти трансформації у ГМЛ.

Отже, єдиної точки зору щодо ролі гемопоетичних клітин-попередників, найближчих нащадків стовбурової клітини і прогностичної цінності клональних культуральних методів досліджень при мієлодиспластичному синдромі (МДС) немає [41]. На частку МДС з надлишком бластів (МДС-ІВ) припадає 40 % випадків МДС [124]. Причина виникнення МДС залишається до кінця невизначеною, але можна з впевненістю сказати, що це клональне захворювання зі змінами, які сталися завдяки мутаціям, що призвели до цитогенетичних порушень і охоплюють відділ стовбурової клітини. Все більше даних дозволяють припускати вирішальну роль не лише гемопоетичних стовбурових клітин (ГСК), але й клітин-попередників кісткового мозку (ГКП) як у виникненні, так і у прогресуванні онкогематологічних захворювань [41, 1]. Припускають, що сигнальні шляхи, що регулюють проліферацію, диференціювання та чутливість до апоптозу ГСК та клітин-попередників КМ в процесі еволюції захворювання задіяні і при МДС [70].

Таким чином, у роботі виявлено особливості колонієутворення *in vitro* і *in vivo* в культурі з напіврідким агаром кісткового мозку пацієнтів при МДС-ІВ. Встановлено, що у хворих у момент діагностики захворювання відбувається пригнічення колонієутворюючої здатності клітин-попередників, зменшення кількості клітин у колоніях і поява примхливих форм клітинних агрегатів із змінами у диференціюванні в культурі. Визначені інформативні показники

морфофункціональних характеристик стовбурових клітин та їх нащадків в культурі, такі як колонієутворююча здатність і клітинний вміст колоній. Крім того, отримані нами дані дозволяють зробити висновок, щодо ролі гемопоетичних клітин-попередників у формуванні патологічного процесу при МДС, про що свідчить здатність гемопоетичних стовбурових клітин та клітин-попередників кісткового мозку до утворення дефектних клонів у культурі *in vitro*. В зв'язку з тим, що в культурі *in vitro* при МДС-ІВ формуються колонії з обмеженою кількістю клітин, порушеною проліферативною активністю і викривленим диференціюванням, можна вважати, що було виявлено зміни функціональної активності клітин-попередників при МДС-ІВ, і вони свідчать про глибину патологічного процесу, який охоплює рівень гемопоетичних клітин-попередників, найближчих нащадків стовбурових клітин.

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі було виявлено гетерогенність гемопоетичних клітин-попередників в культурі *in vitro* і *in vivo* і з'ясовано їх роль у формуванні патологічного процесу при МДС-ІВ.

1. На підставі культуральних досліджень отримані дані про гетерогенність гемопоетичних клітин-попередників у культурі. Виявлена наявність КУО-ГЕММ, КУО-Г, КУО-ГМ і КУО-ММ у людини, миші і щура розглядається, як загальнобіологічне явище. Проте при МДС-ІВ виявляється перевага ранніх попередників КУО-ГЕММ, КУО-Г, а у нормі – пізніх КУО-ГМ і КУО-ММ, що пояснює залучення в патологічний процес при МДС ранніх форм попередників.

2. Доведено, що терміни зняття результатів культивування гемопоетичних клітин-попередників різняться у миші, щура і людини. Оптимальним терміном для миші є 10 діб, для щура – 8, а для людини – 12-14 діб.

3. Показано, що ефективність колонієутворення збільшується з підвищенням концентрації цитокінів і потребує вдвічі більшого стимулу при культивуванні гемопоетичних клітин від пацієнтів з МДС-ІВ. Оптимальною концентрацією в контролі для G-CSF, GM-CSF, IL-3 була 20 нг/мл, а для клітин від пацієнтів з МДС-ІВ – 40 нг/мл.

4. Доведено, що у разі використання комплексу цитокінів (GM-CSF, G-CSF, IL-3) колонієутворююча здатність клітин-попередників від пацієнтів з МДС-ІВ значно зростає, у порівнянні з такими показниками для цитокінів, що діяли окремо ($28,7 \pm 3,2$ до $18,3 \pm 1,8$, $12,1 \pm 1,5$ та $24,5 \pm 2,1$ відповідно).

5. Виявлена пряма кореляційна залежність між кількістю мононуклеарів в 1 мл кісткового мозку і кількістю сформованих колоній у пацієнтів з МДС-ІВ.

6. Показано, що в культурі з напіврідким агаром як *in vitro*, так і *in vivo* при МДС формується у півтора рази менше колоній, ніж у нормі. Кількість клітин в них не перевищує 50, а в нормі – 500. Колонії володіють примхливою формою і складаються з клітин різного ступеня зрілості, які розташовуються хаотично, тоді як в нормі вони знаходяться в колонії за ступенем зрілості – від бластної клітини у центрі, до промієлоцитів, мієлоцитів та метамієлоцитів по мірі руху до периферії. По периферії розташовуються палочкоядерні і сегментноядерні гранулоцити.

7. Культивування гемопоетичних клітин від пацієнтів з МДС-ІВ у гелевих дифузійних камерах, занурених у живильне середовище з стромальною підложкою, отриманої з кістковомозкових клітин контрольної групи осіб, не призводило до виправлення морфології клітин; гемопоез залишався дефектним. Заміна стромальної підложки на підложку з клітин, вилучених у пацієнтів з МДС, не впливала негативно на нормальні гемопоетичні клітини, культивовані у гелевих дифузійних камерах.

8. Було виявлено, що для формування стромальної підложки у контролі, оптимальною концентрацією кістковомозкових клітин є 5×10^6 , а при МДС – 1×10^7 клітин.

9. Пошкодження чи дефекти гемопоезу при МДС-ІВ, виявлені в культурі клітин *in vitro* і *in vivo*, а саме, пригнічення колонієутворення, обмежена кількість клітин у клонах, примхлива форма колоній, хаотичне розташування клітин у клонах, персистування довгоживучої популяції пропонуються як додаткова ознака, поряд з клінічними, лабораторними, цитогенетичними і фенотиповими показниками для своєчасної ранньої діагностики і прогнозування ініціальних етапів розвитку МДС.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Білько ДІ, Пахаренко МВ, Білько НМ. Здатність до утворення колоній клітин-попередників кісткового мозку в культурі *ex vivo* хворих на мієлодиспластичний синдром. Наукові записки НаУКМА. Біологія і екологія. 2021;4:21-25. DOI:10.18523/2617-4529.2021.4.21-25
2. Білько ДІ, Пахаренко МВ. Особливості функціонування гемопоетичних клітин-попередників кісткового мозку хворих на мієлодиспластичний синдром у культурі *in vitro* і в гелевих дифузійних камерах *in vivo*. Наукові записки НаУКМА. Біологія і екологія. 2022;5:33-38. DOI:10.18523/2617-4529.2022.5.33-38
3. Білько ДІ, Чайковський ЮБ, Руссу ІЗ, Пахаренко МВ, Лагоднюк ІЮ, Білько НМ. Морфофункціональні характеристики гемопоетичних клітин-попередників кісткового мозку у гуманізованій культуральній системі *in vivo*. Фізіол. журн. 2022;68(2):14-22. DOI:10.15407/fz68.02.014
4. Білько ДІ. винахідник; Спосіб довготривалого культивування гемопоетичних стовбурових клітин: патент 146819 Україна: МПК А61К 35/28, С12N 5/00, А61Р 37/00 /; № u 2020 08462. 17 Бер 2021.
5. Глузман ДФ, Склярєнко ЛМ, Надгорная ВА, Климнюк ГА. Иммуноцитохимическая диагностика опухолей кроветворной и лимфоидной тканей у детей. Київ: ДИА; 2005. 216с.
6. Лакін ГФ. Біометрія. М: Вища школа;1980. 3:293.
7. Пахаренко МВ, Білько ДІ, Третьак НМ, Стародуб ГС, Лагоднюк ІЮ, Білько НМ. Функціональна активність кровотворних клітин-попередників при мієлодиспластичному синдромі в умовах *in vitro*. Наукові записки НаУКМА. Біологія і екологія. 2020;3:48-52. DOI:10.18523/2617-4529.2020.3.48-52
8. Стародуб ГС, Кубарова ВО, Горяїнова НВ, Третьак НМ, Гордієнко АІ, Басова ОВ, Білько НМ, Пахаренко МВ. Визначення ризику трансформації мієлодиспластичного синдрому в гостру мієлоїдну лейкемію за показником

функціональної активності клітин кісткового мозку. Гематологія і переливання крові: Міжвідомчий збірник. 2021;41:259-269. DOI:10.33741/0435-1991.41.22

9. Чайковський ЮБ, Дельцова ОІ, Геращенко СБ. Стовбурові клітини. Івано-Франківськ: Місто НВ; 2014. 497 с.

10. Ackermann M, Liebhaber S, Klusmann J, Lachmann N. Lost in translation: pluripotent stem cell-derived hematopoiesis. *EMBO Mol Med*. 2015;7(11):1388-402. DOI: 10.15252/emmm.201505301

11. Anthony BA, Link DC. Regulation of hematopoietic stem cells by bone marrow stromal cells. *Trends Immunol*. 2014;35(1):32-7. DOI: 10.1016/j.it.2013.10.002

12. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, Thiele J, Borowitz MJ, Le Beau MM, Bloomfield CD, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*. 2016;127(20):2391-405. DOI: 10.1182/blood-2016-03-643544

13. Arber DA, Orazi A, Hasserjian RP, Borowitz MJ, Calvo KR, Kvasnicka HM, Wang SA, et al. International Consensus Classification of Myeloid Neoplasms and Acute Leukemia: Integrating Morphological, Clinical, and Genomic Data. *Blood*. 2022. DOI: 10.1182/blood.2022015850

14. Arenas-Ramirez N, Woytschak J, Boyman O. Interleukin-2: Biology, Design and Application. *Trends Immunol*. 2015;36(12):763-77. DOI: 10.1016/j.it.2015.10.003

15. Arinobu Y, Mizuno SI, Chong Y, Shigematsu H, Iino T, Iwasaki H, Graf T, et al. Reciprocal Activation of GATA-1 and PU.1 Marks Initial Specification of Hematopoietic Stem Cells into Myeloerythroid and Myelolymphoid Lineages. *Cell Stem Cell*. 2007;1(4):416-27. DOI: 10.1016/j.stem.2007.07.004

16. Babovic S, Eaves CJ. Hierarchical organization of fetal and adult hematopoietic stem cells. *Exp Cell Res*. 2014;329(2):185-91. DOI: 10.1016/j.yexcr.2014.08.005

17. Bannon S, DiNardo C. Hereditary Predispositions to Myelodysplastic Syndrome. *Int J Mol Sci.* 2016;17(6):838. DOI: 10.3390/ijms17060838
18. Barbui T, Thiele J, Gisslinger H, Kvasnicka HM, Vannucchi AM, Guglielmelli P, Orazi A, et al. The 2016 WHO classification and diagnostic criteria for myeloproliferative neoplasms: document summary and in-depth discussion. *Blood Cancer J.* 2018;8(2). DOI: 10.1038/s41408-018-0054-y
19. Barreda D. Regulation of myeloid development and function by colony stimulating factors. *Dev Amp Comp Immunol.* 2004;28(5):509-54. DOI: 10.1016/j.dci.2003.09.010
20. Beerman I, Seita J, Inlay MA, Weissman IL, Rossi DJ. Quiescent Hematopoietic Stem Cells Accumulate DNA Damage during Aging that Is Repaired upon Entry into Cell Cycle. *Cell Stem Cell.* 2014;15(1):37-50. DOI: 10.1016/j.stem.2014.04.016
21. Bodo M, Baroni T, Tabilio A. Haematopoietic and stromal stem cell regulation by extracellular matrix components and growth factors. *J Stem Cells.* 2009;4(1):57-69.
22. Boulais PE, Frenette PS. Making sense of hematopoietic stem cell niches. *Blood.* 2015;125(17):2621-9. DOI: 10.1182/blood-2014-09-570192
23. Calvi LM, Adams GB, Weibrecht KW, Weber JM, Olson DP, Knight MC, Martin RP, et al. Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche. *Nature.* 2003;425(6960):841-6. DOI: 10.1038/nature02040
24. Calvi LM, Link DC. Cellular Complexity of the Bone Marrow Hematopoietic Stem Cell Niche. *Calcif Tissue Int.* 2013;94(1):112-24. DOI: 10.1007/s00223-013-9805-8
25. Campo E, Swerdlow SH, Harris NL, Pileri S, Stein H, Jaffe ES. The 2008 WHO classification of lymphoid neoplasms and beyond: evolving concepts and practical applications. *Blood.* 2011;117(19):5019-32. DOI: 10.1182/blood-2011-01-293050

26. Candelaria M, Dueñas-Gonzalez A. Therapy-related myelodysplastic syndrome. *Expert Opin Drug Saf.* 2015;14(5):655-65. DOI: 10.1517/14740338.2015.1014340
27. Cheng H, Zheng Z, Cheng T. New paradigms on hematopoietic stem cell differentiation. *Protein Cell.* 2020;11(1):34-44. DOI: 10.1007/s13238-019-0633-0
28. Chiereghin C, Travaglino E, Zampini M, Saba E, Saitta C, Riva E, Bersanelli M, et al. The Genetics of Myelodysplastic Syndromes: Clinical Relevance. *Genes.* 2021;12(8):1144. DOI: 10.3390/genes12081144
29. Crane GM, Jeffery E, Morrison SJ. Adult haematopoietic stem cell niches. *Nat Rev Immunol.* 2017;17(9):573-90. DOI: 10.1038/nri.2017.53
30. Crisan M, Dzierzak E. The many faces of hematopoietic stem cell heterogeneity. *Development.* 2016;143(24):4571-81. DOI: 10.1242/dev.114231
31. DeZern AE, Sekeres MA. The Challenging World of Cytopenias: Distinguishing Myelodysplastic Syndromes From Other Disorders of Marrow Failure. *Oncologist.* 2014;19(7):735-45. DOI: 10.1634/theoncologist.2014-0056
32. Eaves CJ. Hematopoietic stem cells: concepts, definitions, and the new reality. *Blood.* 2015;125(17):2605-13. DOI: 10.1182/blood-2014-12-570200
33. Eggold JT, Rankin EB. Erythropoiesis, EPO, macrophages, and bone. *Bone.* 2019;119:36-41. DOI: 10.1016/j.bone.2018.03.014
34. Escobedo-Cousin M, Madrigal JA, Saudemont A. *Methods in Molecular Biology.* New York, NY: Springer New York; 2013:65-72. DOI: 10.1007/978-1-4614-9437-9_4
35. Fontana D, Elli EM, Pagni F, Piazza R. Myelodysplastic Syndromes/Myeloproliferative Overlap Neoplasms and Differential Diagnosis in the WHO and ICC 2022 Era: A Focused Review. *Cancers.* 2023;15(12):3175. DOI: 10.3390/cancers15123175
36. Galton D. The myelodysplastic syndrome kills through cytopenia or malignant transformation. *BMJ.* 1989;299:582.

37. Garcia-Manero G, Chien KS, Montalban-Bravo G. Myelodysplastic syndromes: 2021 update on diagnosis, risk stratification and management. *Am J Hematol.* 2020;95(11):1399-420. DOI: 10.1002/ajh.25950
38. Gerke MB, Christodoulou I, Karantanos T. Definitions, Biology, and Current Therapeutic Landscape of Myelodysplastic/Myeloproliferative Neoplasms. *Cancers.* 2023;15(15):3815. DOI: 10.3390/cancers15153815
39. Gianelli U, Thiele J, Orazi A, Gangat N, Vannucchi AM, Tefferi A, Kvasnicka HM. International Consensus Classification of myeloid and lymphoid neoplasms: myeloproliferative neoplasms. *Virchows Arch.* 2022. DOI: 10.1007/s00428-022-03480-8
40. Gluzman D, Nadgornaya V, Sklyarenko L, Ivanovskaya T. New classification of the myelodysplastic (preleukaemias) syndromes. *Oncology.* 2010;12(3):276-281.
41. Gondek LP, DeZern AE. Assessing clonal haematopoiesis: clinical burdens and benefits of diagnosing myelodysplastic syndrome precursor states. *Lancet Haematol.* 2020;7(1):e73-e81. DOI: 10.1016/s2352-3026(19)30211-x
42. Goswami R, Kaplan MH. A Brief History of IL-9. *J Immunol.* 2011;186(6):3283-8. DOI: 10.4049/jimmunol.1003049
43. Greenberg PL, Tuechler H, Schanz J, Sanz G, Garcia-Manero G, Solé F, Bennett JM, et al. Revised International Prognostic Scoring System for Myelodysplastic Syndromes. *Blood.* 2012;120(12):2454-65. DOI: 10.1182/blood-2012-03-420489
44. Haferlach T. The Molecular Pathology of Myelodysplastic Syndrome. *Pathobiology.* 2018;86(1):24-9. DOI: 10.1159/000488712
45. Harris NL, Jaffe ES, Diebold J, Flandrin G, Muller-Hermelink HK, Vardiman J, Lister TA, et al. World Health Organization Classification of Neoplastic Diseases of the Hematopoietic and Lymphoid Tissues: Report of the Clinical Advisory Committee Meeting—Airlie House, Virginia, November 1997. *J Clin Oncol.* 1999;17(12):3835-49. DOI: 10.1200/jco.1999.17.12.3835

46. Hart PH, Bonder CS, Balogh J, Dickensheets HL, Donnelly RP, Finlay-Jones JJ. Differential responses of human monocytes and macrophages to IL-4 and IL-13. *J Leukoc Biol.* 1999;66(4):575-8. DOI: 10.1002/jlb.66.4.575
47. Hasserjian RP, Buckstein R, Patnaik MM. Navigating Myelodysplastic and Myelodysplastic/Myeloproliferative Overlap Syndromes. *Am Soc Clin Oncol Educ Book.* 2021;(41):328-50. DOI: 10.1200/edbk_320113
48. Hasserjian RP, Germing U, Malcovati L. Diagnosis and classification of myelodysplastic syndromes. *Blood J.* 2023;blood.2023020078. DOI: 10.1182/blood.2023020078
49. Hasserjian RP. Myelodysplastic Syndrome Updated. *Pathobiology.* 2018;86(1):7-13. DOI: 10.1159/000489702
50. Hawley RG, Ramezani A, Hawley TS. *Adult Stem Cells.* Elsevier. 2006:149-79. DOI: 10.1016/s0076-6879(06)19007-2
51. Hernández-Barrientos D, Pelayo R, Mayani H. The Hematopoietic Microenvironment: A Network of Niches for the Development of All Blood Cell Lineages. *J Leukoc Biol.* 2023;114(5):404-420. DOI: 10.1093/jleuko/qiad075
52. Hess DA, Wirthlin L, Craft TP, Herrbrich PE, Hohm SA, Lahey R, Eades WC, et al. Selection based on CD133 and high aldehyde dehydrogenase activity isolates long-term reconstituting human hematopoietic stem cells. *Blood.* 2006;107(5):2162-9. DOI: 10.1182/blood-2005-06-2284
53. Höfer T, Rodewald HR. Differentiation-based model of hematopoietic stem cell functions and lineage pathways. *Blood.* 2018;132(11):1106-13. DOI: 10.1182/blood-2018-03-791517
54. Hoffman CM, Calvi LM. Minireview: Complexity of Hematopoietic Stem Cell Regulation in the Bone Marrow Microenvironment. *Mol Endocrinol.* 2014;28(10):1592-601. DOI: 10.1210/me.2014-1079
55. Hofmann WK, Koeffler HP. Myelodysplastic Syndrome. *Annu Rev Med.* 2005;56(1):1-16. DOI: 10.1146/annurev.med.56.082103.104704

56. Hoggatt J, Singh P, Sampath J, Pelus LM. Prostaglandin E2 enhances hematopoietic stem cell homing, survival, and proliferation. *Blood*. 2009;113(22):5444-55. DOI: 10.1182/blood-2009-01-201335
57. Hosono N. Genetic abnormalities and pathophysiology of MDS. *Int J Clin Oncol*. 2019;24(8):885-92. DOI: 10.1007/s10147-019-01462-6
58. Huang X, Pierce LJ, Chen GL, Chang KT, Spangrude GJ, Prchal JT. Erythropoietin receptor signaling regulates both erythropoiesis and megakaryopoiesis in vivo. *Blood Cells Mol Dis*. 2010;44(1):1-6. DOI: 10.1016/j.bcmd.2009.09.007
59. Hurwitz SN, Jung SK, Kurre P. Hematopoietic stem and progenitor cell signaling in the niche. *Leukemia*. 2020;34(12):3136-48. DOI: 10.1038/s41375-020-01062-8
60. Ivanovs A, Rybtsov S, Ng ES, Stanley EG, Elefanty AG, Medvinsky A. Human haematopoietic stem cell development: from the embryo to the dish. *Development*. 2017;144(13):2323-37. DOI: 10.1242/dev.134866
61. Iwasaki H, Akashi K. Hematopoietic developmental pathways: on cellular basis. *Oncogene*. 2007;26(47):6687-96. DOI: 10.1038/sj.onc.1210754
62. Jagannathan-Bogdan M, Zon LI. Hematopoiesis. *Development*. 2013;140(12):2463-7. DOI: 10.1242/dev.083147
63. Jahandideh B, Derakhshani M, Abbaszadeh H, Akbar Movassaghpour A, Mehdizadeh A, Talebi M, Yousefi M. The pro-Inflammatory cytokines effects on mobilization, self-renewal and differentiation of hematopoietic stem cells. *Hum Immunol*. 2020;81(5):206-17. DOI: 10.1016/j.humimm.2020.01.004
64. Jain AG, Zhang L, Bennett JM, Komrokji R. Myelodysplastic Syndromes with Bone Marrow Fibrosis: An Update. *Ann Lab Med*. 2022;42(3):299-305. DOI: 10.3343/alm.2022.42.3.299
65. Jalali S, Ansell SM. Role of the Bone Marrow Niche in Supporting the Pathogenesis of Lymphoid Malignancies. *Front Cell Dev Biol*. 2021;9. DOI: 10.3389/fcell.2021.692320

66. Katzman SD, Hoyer KK, Doms H, Gratz IK, Rosenblum MD, Paw JS, Isakson SH, et al. Opposing functions of IL-2 and IL-7 in the regulation of immune responses. *Cytokine*. 2011;56(1):116-21. DOI: 10.1016/j.cyto.2011.07.005
67. Kaur-Bollinger P. Role of secreted factors in the regulation of hematopoietic stem cells by the bone marrow microenvironment. *Front Biosci*. 2012;17(1):876. DOI: 10.2741/3962
68. Kennedy JA, Ebert BL. Clinical Implications of Genetic Mutations in Myelodysplastic Syndrome. *J Clin Oncol*. 2017;35(9):968-74. DOI: 10.1200/jco.2016.71.0806
69. Khoury JD, Solary E, Abela O, Akkari Y, Alaggio R, Apperley JF, Bejar R, et al. The 5th edition of the World Health Organization Classification of Haematolymphoid Tumours: Myeloid and Histiocytic/Dendritic Neoplasms. *Leukemia*. 2022. DOI: 10.1038/s41375-022-01613-1
70. Kirstetter P, Anderson K, Porse BT, Jacobsen SE, Nerlov C. Activation of the canonical Wnt pathway leads to loss of hematopoietic stem cell repopulation and multilineage differentiation block. *Nat Immunol*. 2006;7(10):1048-56. DOI: 10.1038/ni1381
71. Kode A, Manavalan JS, Mosialou I, Bhagat G, Rathinam CV, Luo N, Khiabani H, et al. Leukaemogenesis induced by an activating β -catenin mutation in osteoblasts. *Nature*. 2014;506(7487):240-4. DOI: 10.1038/nature12883
72. Kondo M, Wagers AJ, Manz MG, Prohaska SS, Scherer DC, Beilhack GF, Shizuru JA, et al. Biology of hematopoietic stem cells and progenitors: Implications for Clinical Application. *Annu Rev Immunol*. 2003;21(1):759-806. DOI: 10.1146/annurev.immunol.21.120601.141007
73. Kristensen HB, Andersen TL, Patriarca A, Kallenbach K, MacDonald B, Sikjaer T, Ejerdsted C, et al. Human hematopoietic microenvironments. *PLOS ONE*. 2021;16(4):e0250081. Доступно на: 10.1371/journal.pone.0250081

74. Kruijf EF, Fibbe WE, Pel M. Cytokine-induced hematopoietic stem and progenitor cell mobilization: unraveling interactions between stem cells and their niche. *Ann New York Acad Sci.* 2019;1466(1):24-38. DOI: 10.1111/nyas.14059
75. Le PM, Andreeff M, Battula VL. Osteogenic niche in the regulation of normal hematopoiesis and leukemogenesis. *Haematologica.* 2018;103(12):1945-55. DOI: 10.3324/haematol.2018.197004
76. Lee C, Kim HN, Kwon JA, Yoon SY, Jeon MJ, Yu ES, Kim DS, et al. Implications of the 5th Edition of the World Health Organization Classification and International Consensus Classification of Myeloid Neoplasm in Myelodysplastic Syndrome With Excess Blasts and Acute Myeloid Leukemia. *Ann Lab Med.* 2023;43(5):503-7. DOI: 10.3343/alm.2023.43.5.503
77. Lee D, Kim DW, Cho JY. Role of growth factors in hematopoietic stem cell niche. *Cell Biol Toxicol.* 2020;36(2):131-44. DOI: 10.1007/s10565-019-09510-7
78. Lee WH, Tsai MT, Tsai CH, Tien FM, Lo MY, Tseng MH, Kuo YY, et al. Validation of the molecular international prognostic scoring system in patients with myelodysplastic syndromes defined by international consensus classification. *Blood Cancer J.* 2023;13(1). DOI: 10.1038/s41408-023-00894-8
79. Lin SJ, Cheng PJ, Hsiao SS. Effect of interleukin-15 on effector and regulatory function of anti-CD3/anti-CD28-stimulated CD4⁺ T cells. *Bone Marrow Transplant.* 2006;37(9):881-7. DOI: 10.1038/sj.bmt.1705348
80. Lindsley RC. Uncoding the genetic heterogeneity of myelodysplastic syndrome. *Hematology.* 2017;2017(1):447-52. DOI: 10.1182/asheducation-2017.1.447
81. Liu Y, Niu H, Song N, Zhang W, Li L, Wang H, Fu R, et al. Single-cell RNA sequencing identifies the properties of myelodysplastic syndrome stem cells. *J Transl Med.* 2022;20(1). DOI: 10.1186/s12967-022-03709-9
82. Loele W. Eine Dauerfärbung der Oxydasen der myeloischen Leukozyten im Blutausschlag. *Dtsch med Wochenschr.* 1936;62(49):2004-2005.

83. Luis TC, Weerkamp F, Naber BA, Baert MR, de Haas EF, Nikolic T, Heuvelmans S, et al. Wnt3a deficiency irreversibly impairs hematopoietic stem cell self-renewal and leads to defects in progenitor cell differentiation. *Blood*. 2009;113(3):546-54. DOI: 10.1182/blood-2008-06-163774
84. Lunger I, Fawaz M, Rieger MA. Single-cell analyses to reveal hematopoietic stem cell fate decisions. *FEBS Lett*. 2017;591(15):2195-212. DOI: 10.1002/1873-3468.12712
85. Malcovati L, Cazzola M. Recent advances in the understanding of myelodysplastic syndromes with ring sideroblasts. *Br J Haematol*. 2016;174(6):847-58. DOI: 10.1111/bjh.14215
86. Malcovati L, Papaemmanuil E, Bowen DT, Boultonwood J, Della Porta MG, Pascutto C, Travaglino E, et al. Clinical significance of SF3B1 mutations in myelodysplastic syndromes and myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms. *Blood*. 2011;118(24):6239-46. DOI: 10.1182/blood-2011-09-377275
87. Mangaonkar AA, Lasho TL, Finke C, Ketterling RP, Reichard KK, McCullough K, Gangat N, et al. SF3B1-mutant myelodysplastic syndrome/myeloproliferative neoplasms: a unique molecular and prognostic entity. *Haematologica*. 2022. DOI: 10.3324/haematol.2021.280463
88. Masuda S, Ageyama N, Shibata H, Obara Y, Ikeda T, Takeuchi K, Ueda Y, et al. Cotransplantation with MSCs improves engraftment of HSCs after autologous intra-bone marrow transplantation in nonhuman primates. *Exp Hematol*. 2009;37(10):1250-7. DOI: 10.1016/j.exphem.2009.07.008
89. Möhle R, Kanz L. Hematopoietic Growth Factors for Hematopoietic Stem Cell Mobilization and Expansion. *Semin Hematol*. 2007;44(3):193-202. DOI: 10.1053/j.seminhematol.2007.04.006
90. Mosaad YM. Hematopoietic stem cells: An overview. *Transfus Apher Sci*. 2014;51(3):68-82. DOI: 10.1016/j.transci.2014.10.016
91. Mukaida N. Interleukin-8: an expanding universe beyond neutrophil chemotaxis and activation. *Int J Hematol*. 2000;72(4):391-8.

92. Müller-Tidow C, Steffen B, Cauvet T, Tickenbrock L, Ji P, Diederichs S, Sargin B, et al. Translocation Products in Acute Myeloid Leukemia Activate the Wnt Signaling Pathway in Hematopoietic Cells. *Mol Cell Biol.* 2004;24(7):2890-904. DOI: 10.1128/mcb.24.7.2890-2904.2004
93. Nachtkamp K, Kobbe G, Gattermann N, Germing U. Myelodysplastic syndromes: new methods of diagnosis, prognostication, and treatment. *DTSCH Arzteblatt Int.* 2023;120:203–10. DOI: 10.3238/arztebl.m2023.0005
94. Nakada D, Oguro H, Levi BP, Ryan N, Kitano A, Saitoh Y, Takeichi M, et al. Oestrogen increases haematopoietic stem-cell self-renewal in females and during pregnancy. *Nature.* 2014;505(7484):555-8. DOI: 10.1038/nature12932
95. Naveiras O, Nardi V, Wenzel PL, Hauschka PV, Fahey F, Daley GQ. Bone-marrow adipocytes as negative regulators of the haematopoietic microenvironment. *Nature.* 2009;460(7252):259-63. DOI: 10.1038/nature08099
96. Nemeth MJ, Mak KK, Yang Y, Bodine DM. β -Catenin Expression in the Bone Marrow Microenvironment Is Required for Long-Term Maintenance of Primitive Hematopoietic Cells. *STEM CELLS.* 2009;27(5):1109-19. DOI: 10.1002/stem.32
97. Nemeth MJ, Topol L, Anderson SM, Yang Y, Bodine DM. Wnt5a inhibits canonical Wnt signaling in hematopoietic stem cells and enhances repopulation. *Proc National Acad Sci.* 2007;104(39):15436-41. DOI: 10.1073/pnas.0704747104
98. Ng AP, Alexander WS. Haematopoietic stem cells: past, present and future. *Cell Death Discov.* 2017;3(1). DOI: 10.1038/cddiscovery.2017.2
99. Nobta M, Tsukazaki T, Shibata Y, Xin C, Moriishi T, Sakano S, Shindo H, et al. Critical Regulation of Bone Morphogenetic Protein-induced Osteoblastic Differentiation by Delta1/Jagged1-activated Notch1 Signaling. *J Biol Chem.* 2005;280(16):15842-8. DOI: 10.1074/jbc.m412891200
100. Ogawa S. Genetic basis of myelodysplastic syndromes. *Proc JPN Acad Ser B.* 2020;96(3):107-21. DOI: 10.2183/pjab.96.009

101. Olofsson T, Olsson I. Granulopoiesis in chronic myeloid leukemia. II. serial cloning of blood and bone marrow cells in agar culture. *Blood*. 1976;48(3):351-60.
102. Orkin SH, Zon LI. Hematopoiesis: An Evolving Paradigm for Stem Cell Biology. *Cell*. 2008;132(4):631-44. DOI: 10.1016/j.cell.2008.01.025
103. Papayannopoulou T, Kaushansky K. Evolving insights into the synergy between erythropoietin and thrombopoietin and the bipotent erythroid/megakaryocytic progenitor cell. *Exp Hematol*. 2016;44(8):664-8. DOI: 10.1016/j.exphem.2015.11.010
104. Park D. The hematopoietic stem cell niche. *Front Biosci*. 2012;17(1):30. DOI: 10.2741/3913
105. Park M. Myelodysplastic syndrome with genetic predisposition. *BLOOD RES*. 2021;56(S1):S34—S38. DOI: 10.5045/br.2021.2020327
106. Patel SA, Cerny J. TP53-mutant myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia: the black hole of hematology. *Blood Adv*. 2022;6(6):1917-8. DOI: 10.1182/bloodadvances.2021006580
107. Pati H, Kundil Veetil K. Myelodysplastic Syndrome/Myeloproliferative Neoplasm (MDS/MPN) Overlap Syndromes: Molecular Pathogenetic Mechanisms and Their Implications. *Indian J Hematol Blood Transfus*. 2019;35(1):3-11. DOI: 10.1007/s12288-019-01084-y
108. Platzbecker U. Treatment of MDS. *Blood*. 2019;133(10):1096-1107.
109. Pol JG, Caudana P, Paillet J, Piaggio E, Kroemer G. Effects of interleukin-2 in immunostimulation and immunosuppression. *J Exp Med*. 2019;217(1). DOI: 10.1084/jem.20191247
110. Porada CD, Atala AJ, Almeida-Porada G. The hematopoietic system in the context of regenerative medicine. *Methods*. 2016;99:44-61. DOI: 10.1016/j.ymeth.2015.08.015
111. Pouzolles M, Oburoglu L, Taylor N, Zimmermann VS. Hematopoietic stem cell lineage specification. *Curr Opin Hematol*. 2016;23(4):311-7. DOI: 10.1097/moh.0000000000000260

112. Rasheed A. Niche Regulation of Hematopoiesis: The Environment Is Micro, but the Influence Is Large. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2022;42:691–699. DOI: 10.1161/atvbaha.121.316235
113. Renström J, Kröger M, Peschel C, Oostendorp RA. How the niche regulates hematopoietic stem cells. *Chem Biol Interact.* 2010;184(1-2):7-15. DOI: 10.1016/j.cbi.2009.11.012
114. Rieger MA, Schroeder T. Hematopoiesis. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2012;4(12):a008250. DOI: 10.1101/cshperspect.a008250
115. Rouault-Pierre K, Smith AE, Mian SA, Pizzitola I, Kulasekararaj AG, Mufti GJ, Bonnet D. Myelodysplastic syndrome can propagate from the multipotent progenitor compartment. *Haematologica.* 2016;102(1):e7-e10. DOI: 10.3324/haematol.2016.152520
116. Saygin C, Carraway HE. Current and emerging strategies for management of myelodysplastic syndromes. *Blood Rev.* 2020;100791. DOI: 10.1016/j.blre.2020.100791
117. Seshadri M, Qu CK. Microenvironmental regulation of hematopoietic stem cells and its implications in leukemogenesis. *Curr Opin Hematol.* 2016;23(4):339-45. DOI: 10.1097/moh.0000000000000251
118. Shastri A, Will B, Steidl U, Verma A. Stem and progenitor cell alterations in myelodysplastic syndromes. *Blood.* 2017;129(12):1586-94. DOI: 10.1182/blood-2016-10-696062
119. Smith JN, Calvi LM. Concise Review: Current Concepts in Bone Marrow Microenvironmental Regulation of Hematopoietic Stem and Progenitor Cells. *STEM CELLS.* 2013;31(6):1044-50. DOI: 10.1002/stem.1370
120. Stauder R, Lambert J, Desruol-Allardin S, Savre I, Gaugler L, Stojkov I, Siebert U, et al. Patient-reported outcome measures in studies of myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia: Literature review and landscape analysis. *Eur J Haematol.* 2020;104(5):476-87. DOI: 10.1111/ejh.13389

121. Szade K, Gulati GS, Chan CK, Kao KS, Miyanishi M, Marjon KD, Sinha R, et al. Where Hematopoietic Stem Cells Live: The Bone Marrow Niche. *Antioxid Amp Redox Signal*. 2018;29(2):191-204. DOI: 10.1089/ars.2017.7419
122. Takatsu K, Nakajima H. IL-5 and eosinophilia. *Curr Opin Immunol*. 2008;20(3):288-94. DOI: 10.1016/j.coi.2008.04.001
123. Tamma R, Ribatti D. Bone Niches, Hematopoietic Stem Cells, and Vessel Formation. *Int J Mol Sci*. 2017;18(1):151. DOI: 10.3390/ijms18010151
124. Tefferi A, Thiele J, Vardiman JW. The 2008 World Health Organization classification system for myeloproliferative neoplasms. *Cancer*. 2009;115(17):3842-7. DOI: 10.1002/cncr.24440
125. Thol F, Weissinger EM, Krauter J, Wagner K, Damm F, Wichmann M, Gohring G, et al. IDH1 mutations in patients with myelodysplastic syndromes are associated with an unfavorable prognosis. *Haematologica*. 2010;95(10):1668-74. DOI: 10.3324/haematol.2010.025494
126. Thomas D, Vadas M, Lopez A. Regulation of haematopoiesis by growth factors – emerging insights and therapies. *Expert Opin Biol Ther*. 2004;4(6):869-79. DOI: 10.1517/14712598.4.6.869
127. Tian T, Wang M, Ma D. TNF- α , a good or bad factor in hematological diseases? *Stem Cell Investig*. 2014;1:12. DOI: 10.3978/j.issn.2306-9759.2014.04.02
128. Tobinsson M, Kittang AO. Treatment of myelodysplastic syndrome in the era of next-generation sequencing. *J Intern Med*. 2019;286(1):41-62. DOI: 10.1111/joim.12893
129. Vardiman JW, Harris NL, Brunning RD. The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms. *Blood*. 2002;100(7):2292-302. DOI: 10.1182/blood-2002-04-1199
130. Vardiman JW, Thiele J, Arber DA, Brunning RD, Borowitz MJ, Porwit A, Harris NL, et al. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood*. 2009;114(5):937-51. DOI: 10.1182/blood-2009-03-209262

131. Vignali DA, Kuchroo VK. IL-12 family cytokines: immunological playmakers. *Nat Immunol.* 2012;13(8):722-8. DOI: 10.1038/ni.2366
132. Will B, Zhou L, Vogler TO, Ben-Neriah S, Schinke C, Tamari R, Yu Y, et al. Stem and progenitor cells in myelodysplastic syndromes show aberrant stage-specific expansion and harbor genetic and epigenetic alterations. *Blood.* 2012;120(10):2076-86. DOI: 10.1182/blood-2011-12-399683
133. Winer H, Rodrigues GO, Hixon JA, Aiello FB, Hsu TC, Wachter BT, Li W, et al. IL-7: Comprehensive review. *Cytokine.* 2022;160:156049. DOI: 10.1016/j.cyto.2022.156049
134. Woolthuis CM, Park CY. Hematopoietic stem/progenitor cell commitment to the megakaryocyte lineage. *Blood.* 2016;127(10):1242-8. DOI: 10.1182/blood-2015-07-607945
135. Yao Y, Simard AR, Shi FD, Hao J. IL-10-Producing Lymphocytes in Inflammatory Disease. *Int Rev Immunol.* 2013;32(3):324-36. DOI: 10.3109/08830185.2012.762361
136. Yassin MA, Elsabagh A. Editorial: Uncovering the relationship between myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia. *Front Oncol.* 2023;13. DOI: 10.3389/fonc.2023.1131785
137. Yin CC, Medeiros LJ, Bueso-Ramos CE. Review: Recent advances in the diagnosis and classification of myeloid neoplasms - comments on the 2008 WHO classification. *Int J Lab Hematol.* 2010;32(5):461-76. DOI: 10.1111/j.1751-553x.2010.01246.x
138. Young HE, Black AC. Adult stem cells. *FASEB J.* 2006;20(4). DOI: 10.1096/fasebj.20.4.a18-b
139. Yu VW, Scadden DT. Heterogeneity of the bone marrow niche. *Curr Opin Hematol.* 2016;23(4):331-8. DOI: 10.1097/moh.0000000000000265
140. Zavras PD, Sinanidis I, Tsakiroglou P, Karantanos T. Understanding the Continuum between High-Risk Myelodysplastic Syndrome and Acute Myeloid Leukemia. *Int J Mol Sci.* 2023;24(5):5018. DOI: 10.3390/ijms24055018

141. Zhang Y, Wu J, Qin T, Xu Z, Qu S, Pan L, Li B, et al. Comparison of the revised 4th (2016) and 5th (2022) editions of the World Health Organization classification of myelodysplastic neoplasms. *Leukemia*. 2022. DOI: 10.1038/s41375-022-01718-7
142. Zhao M, Li L. Regulation of hematopoietic stem cells in the niche. *Sci China Life Sci*. 2015;58(12):1209-15. DOI: 10.1007/s11427-015-4960-y

ДОДАТОК 1

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА

Праці, в яких опубліковано основні наукові результати дисертації

1. **Пахаренко МВ**, Білько ДІ, Третяк НМ, Стародуб ГС, Лагоднюк ІЮ, Білько НМ. Функціональна активність кровотворних клітин-попередників при мієлодиспластичному синдромі в умовах *in vitro*. Наукові записки НаУКМА. Біологія і екологія. 2020;3:48-52. DOI:10.18523/2617-4529.2020.3.48-52 *(Наукове фахове видання України, категорія Б) (Здобувач особисто проводила експериментальні дослідження, брала участь у написанні тексту статті та висновків)*

2. Білько ДІ, **Пахаренко МВ**, Білько НМ. Здатність до утворення колоній клітин-попередників кісткового мозку в культурі *ex vivo* хворих на мієлодиспластичний синдром. Наукові записки НаУКМА. Біологія і екологія. 2021;4:21-25. DOI:10.18523/2617-4529.2021.4.21-25 *(Наукове фахове видання України, категорія Б) (Здобувач особисто проводила експериментальні дослідження, брала участь у написанні тексту статті та висновків)*

3. Стародуб ГС, Кубарова ВО, Горяїнова НВ, Третяк НМ, Гордієнко АІ, Басова ОВ, Білько НМ, **Пахаренко МВ**. Визначення ризику трансформації мієлодиспластичного синдрому в гостру мієлоїдну лейкемію за показником функціональної активності клітин кісткового мозку. Гематологія і переливання крові: Міжвідомчий збірник. 2021;41:259-269. DOI:10.33741/0435-1991.41.22 *(Наукове фахове видання України, категорія Б) (Здобувач особисто проводила дослідження культуральних особливостей гемопоетичних клітин-попередників осіб з МДС, брала участь у написанні тексту статті та висновків)*

4. Білько ДІ, **Пахаренко МВ**. Особливості функціонування гемопоетичних клітин-попередників кісткового мозку хворих на мієлодиспластичний синдром у культурі *in vitro* і в гелевих дифузійних камерах

in vivo. Наукові записки НаУКМА. Біологія і екологія. 2022;5:33-38. DOI:10.18523/2617-4529.2022.5.33-38 (Наукове фахове видання України, категорія Б) (Здобувач особисто проводила експериментальні дослідження, брала участь у написанні тексту статті та висновків)

5. Білько ДІ, Чайковський ЮБ, Руссу ІЗ, **Пахаренко МВ**, Лагоднюк ІЮ, Білько НМ. Морфофункціональні характеристики гемопоетичних клітин-попередників кісткового мозку у гуманізованій культуральній системі *in vivo*. Фізіол. журн. 2022;68(2):14-22. DOI:10.15407/fz68.02.014 (Стаття індексується у базі Scopus, Q4) (Здобувач особисто проводила частину експериментальних досліджень, брала участь у написанні тексту статті)

Наукові праці, які засвідчують апробацію матеріалів дисертації

1. **Пахаренко М. В.**, Стародуб Г. С. Гетерогенність гемопоетичних клітин-попередників осіб, хворих на мієлодиспластичний синдром, у культурі *in vitro* / Тези конференції. Науково-практична конференція молодих вчених «Фундаментальна медицина: інтегральні підходи до терапії хворих з онкопатологією», 4–5 лютого 2019 року, м. Київ, Україна, Онкологія. Том 21, № 1; с. 70.

2. **Пахаренко М. В.**, Стародуб Г. С., Лагоднюк І. Ю. Функціональна активність гемопоетичних клітин-попередників при мієлодиспластичному синдромі у культурі клітин *in vitro*. Збірник. II науково-практична internet-конференція з міжнародною участю «Механізми розвитку патологічних процесів і хвороб та їхня фармакологічна корекція», 21 листопада 2019 року, м. Харків, Україна, С. 281.

3. Білько Д.І., Руссу І. З., **Пахаренко М. В.**, Білько Н. М. Морфологічні та функціональні особливості гемопоетичних клітин-попередників в умовах культивування у мікрооточенні, сформованому мезенхімальними стромальними стовбуровими клітинами щурів, опромінених у сублетальній дозі. Тези

доповідей / уклад. В. В. Михайловський. XXVI Щорічна наукова конференція Інституту ядерних досліджень НАН України, 8-12 квітня 2019 року, Київ, Україна, С. 141.

4. **Пахаренко М.**, Лагоднюк І., Стародуб Г., Третяк Н., Білько Н. Морфологічна характеристика гемопоетичних клітин-попередників хворих на мієлодиспластичний синдром у культурі клітин *in vitro*. Молодь і поступ біології: збірник тез доповідей XVI Міжнародної наукової конференції студентів і аспірантів, присвяченої 75 річниці створення біологічного факультету Львівського національного університету та 90 річниці від дня народження проф. М.П. Деркача (м. Львів, 27-29 квітня 2020р.). – Львів: Галицька Видавнича спілка, 2020. – С. 183-184.

5. **Pakharenko M**, Starodub H, Lahodniuk I, Tretiak N, Bilko N. Morphofunctional characteristics of hematopoietic progenitor cells in myelodysplastic syndrome in culture *in vitro*. Medicina. ABSTRACTS accepted for the International Scientific Conference on Medicine organized within the frame of the 78th International Scientific Conference of the University of Latvia. 12 March 2020. Riga, Latvia. Vol.56, Supp.1. – p.5.

6. Bilko N, Sniezhkova Ye, Bilko D, **Pakharenko M**, Russu I. The influence of orally administered nanostructural highly activated charcoal on functional activity of hematopoietic progenitor cells in the culture of diffusion chambers *in vivo*. Medicina. ABSTRACTS accepted for the International Scientific Conference on Medicine organized within the frame of the 78th International Scientific Conference of the University of Latvia. 12 March 2020. Riga, Latvia. Vol.56, Supp.1. – p.17.

7. Bilko N, **Pakharenko M**, Lahodniuk I, Bilko D, Horiainova N, Starodub H, Tretiak N. Features Of Functioning Of Hematopoietic Bone Marrow Progenitor Cells In Mds, Which Is Transformed Into Acute Myeloblastic Leukemia. 25th Congress of the European Hematology Association (Virtual Edition 2020) : Abstract Book / European Hematology Association. - [S. l. : Wolters Kluwer Health], June 11-14 2020. - Vol. 4, Issue S1 - P. 900.

8. **Pakharenko M**, Bilko D. Evaluation of hematopoietic progenitor cells potential in patients with myeloproliferative diseases *in vitro*. *Medicina*. ABSTRACTS accepted for the International Scientific Conference on Medicine organized within the frame of the 79th International Scientific Conference of the University of Latvia. 10 February 2021. Riga, Latvia. Vol.57, Supp.1. – p.13.

9. **Пахаренко М.** Морфофункціональні особливості гемопоетичних клітин-попередників хворих на мієлодиспластичний синдром та гостру мієлоїдну лейкемію у культурі клітин *in vitro*. Молодь і поступ біології: збірник тез доповідей XVII Міжнародної наукової конференції студентів і аспірантів (м. Львів, 19-21 квітня 2021р.). – Львів: ТОВ «Ромус-поліграф», 2021. – С. 172.

10. **Pakharenko M**, Bilko D, Lahodniuk I. Morphofunctional characteristics of hematopoietic progenitor cells of human bone marrow in a humanized *in vivo* model // *Medicina*. Abstracts of the International Scientific Conference on Medicine organized within the frame of the 80th International Scientific Conference of the University of Latvia. 11 February 2022. Riga, Latvia. Vol.58, Supp.1. – p.186.

11. Бутенко Є. С., **Пахаренко М. В.** Альтернативні джерела стовбурових клітин з кісток різної локалізації. Збірник матеріалів конференції. IV науково-практична конференція студентів та молодих вчених з міжнародною участю «Від експериментальної та клінічної патофізіології до досягнень сучасної медицини і фармації» 19 травня 2022 р., Харків, Україна. С. 101-102.

12. **Pakharenko M**, Lahodniuk I, Starodub H. Hematopoietic progenitor cells in normal and dysplastic hematopoiesis. Programme/Abstracts. XXIII. Wilsede Meeting on Modern Trends in Human Leukemia and Cancer, June 24-27, 2023, Wilsede, Germany. P.74.

ДОДАТОК 2

ВИТЯГ

з протоколу № 1 розширеного засідання
комітету з етики наукових досліджень Національного університету
«Києво-Могилянська академія» та
кафедри лабораторної діагностики біологічних систем
факультету природничих наук
Національного університету «Києво-Могилянська академія»
від 1 лютого 2023 року

Присутні: Юрочко Т.П., голова комітету, керівник Школи Охорони Здоров'я; Білько Н.М., зав.кафедри лабораторної діагностики біологічних систем; Богданов С.О., керівник Центру психічного здоров'я та психосоціального супроводу; Криворучка Л.Д., керівник Докторської школи імені родини Юхименків; Мальцева К.С., зав.кафедри соціології; Фуртат І.М., доцент кафедри біології; Чуканова С.О., керівник Американської бібліотеки імені Віктора Китастого; Тихонкова І.О. (за згодою) - експерт з інформаційно-аналітичних ресурсів та навчання компанії Clarivate Analytics, науковий співробітник відділу сигнальних систем клітини Інституту молекулярної біології і генетики НАН України.

Слухали: доповідь Пахаренко Маргарити Вікторівни, здобувача наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю 091 – Біологія (Галузь знань 09 – Біологія) на тему: «Гетерогенність гемопоетичних клітин-попередників у культурі клітин *in vitro* та *in vivo* у нормі та при мієлодиспластичному синдромі» вимогам норм біоетики.

У дослідженнях планувалося провести та визначити оптимальні терміни культивування гемопоетичних клітин-попередників у культурі клітин *in vitro* та *in vivo* для вивчення їх гетерогенності та впливу цитокінів на колонієутворення. Також планувалося дослідити вплив стромальних підложок на кровотворення при мієлодиспластичному синдромі. В якості матеріалу для

досліджень слугував кістковий мозок осіб хворих на мієлодиспластичний синдром і осіб без онкогематологічних захворювань, як контроль. Експериментальні дослідження проводились на мишах лінії СВА і щурах Wistar.

Робота була виконана у рамках державних тем кафедри лабораторної діагностики біологічних систем Національного університету «Києво-Могилянська академія»: «Роль компонентів мікрооточення у моделюванні гемопоетичної ніші *in vitro*» (№ держреєстрації: 0116U004704, 02.2016-12.2017 рр., виконавець), «Оцінка морфологічних та функціональних особливостей клітин-попередників при злоякісному процесі» (№ держреєстрації: 0119U103427, 09.2019-09.2024 рр., виконавець), договору про наукове співробітництво між Національним університетом «Києво-Могилянська академія» та ДУ «Інститут гематології та трансфузіології» НАМН України з 2018 р. по 2021 р., а також між Національним університетом «Києво-Могилянська академія» та ДУ «Інститут травматології і ортопедії НАМН України» з 2021 р. по 2024 р.

В дослідженнях були використані зразки тільки від тих осіб, які не заперечували їх використання у наукових дослідженнях і давали на це письмову згоду. В роботі не було використано конфіденційної інформації про донорів, дані було систематизовано та проаналізовано відповідно до етичних норм.

Робота була проведена відповідно до Гельсінської декларації Всесвітньої медичної асоціації про етичні принципи проведення наукових медичних досліджень за участю людини (1964-2013 рр.), Міжнародного керівництва з етики для біомедичних досліджень за участі людини в якості досліджуваних Ради міжнародних організацій медичних наук, Декларації принципів толерантності (28-а сесія ЮНЕСКО, 1995), Універсальної декларації з біоетики та прав людини (ООН, 1997), норм Конвенції про захист прав людини у зв'язку з впровадженням нових біомедичних технологій, прийнятою у 1997 році у м. Ов'єдо (Іспанія).

Постановили: наукові дослідження, представлені в матеріалах дисертації Пахаренко Маргарити Вікторівни, здобувача наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю 091 – Біологія (Галузь знань 09 – Біологія) на тему: «Гетерогенність гемопоетичних клітин-попередників у культурі клітин *in vitro* та *in vivo* у нормі та при мієлодиспластичному синдромі» обґрунтовані і повністю відповідають вимогам морально-етичних норм українського національного законодавства та принципам Гельсінської декларації прав людини.

Голова комітету з етики наукових досліджень
Національного університету
«Києво-Могилянська академія»



Т.П. Юрочко



Документ підписано у сервісі Вчасно (продовження)
Дисертація Пахаренко.pdf

Документ відправлено: 19:09 11.12.2023

Власник документу

Електронний підпис

19:09 11.12.2023

Ідентифікаційний код: 3452001061

ПАХАРЕНКО МАРГАРИТА ВІКТОРІВНА

Власник ключа: ПАХАРЕНКО МАРГАРИТА ВІКТОРІВНА

Час перевірки КЕП/ЕЦП: 19:09 11.12.2023

Статус перевірки сертифікату: Сертифікат діє

Серійний номер: 5E984D526F82F38F040000006BFF34012AC29E04

Тип підпису: удосконалений