

**НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
“КИЄВО-МОГИЛЯНСЬКА АКАДЕМІЯ”**

УДК 612.419+576.535

ЗАТВЕРДЖУЮ
Віце-президент
з науково-навчальних студій,
докт. філол. наук, професор

_____ В. П. Моренець
«__» _____ 2011 р.

З в і т
про науково-дослідну роботу

**РОЗРОБКА СПОСОБУ ЕКСПАНСІЇ ТА ОЦІНКИ СТОВБУРОВИХ
КЛІТИН-ПОПЕРЕДНИКІВ ГЕМОПОЕЗУ У ДОВГОТРИВАЛИХ
КУЛЬТУРАХ IN VITRO І IN VIVO**
заключний

Керівник НДР
докт. мед. наук, професор

Н. М. Білько

Київ - 2011

СПИСОК АВТОРІВ

Прізвище, ім'я, по батькові	Науковий ступінь, вчене звання, посада	Підпис
1. Білько Н. М. Вступ, узагальнення результатів, висновки	доктор медичних наук, професор, керівник Центру молекулярних і клітинних досліджень	
2. Бойко Р. В. Вступ, розд. 1.6., розд. 2.5., висновки	доктор фізико-математичних наук, професор, головний науковий співробітник Центру молекулярних і клітинних досліджень	
3. Білько Д. І. Вступ, розд. 2.2, розд. 2.3.	кандидат біологічних наук, старший науковий співробітник Центру молекулярних і клітинних досліджень	
4. Василовська С. В. Вступ, розд. 2.2, розд. 2.3.	кандидат біологічних наук, науковий співробітник Центру молекулярних і клітинних досліджень	
5. Атаманюк Н. П. Розд. 2.4.	кандидат біологічних наук, старший науковий співробітник Центру молекулярних і клітинних досліджень	
6. Бадюк В. М. Розд. 1.3.	кандидат медичних наук, старший науковий співробітник Центру молекулярних і клітинних досліджень	
7. Кондрашова В. Г. Розд. 2.1., розд. 2.4.	кандидат біологічних наук, старший науковий співробітник Центру молекулярних і клітинних досліджень	
8. Бараш О. О. Розд. 1.2, 1.4	науковий співробітник Центру молекулярних і клітинних досліджень	
9. Борбуляк І. З. Розд. 1.1, 1.5	науковий співробітник Центру молекулярних і клітинних досліджень	

РЕФЕРАТ

Звіт про НДР: 60 с., 70 джерел.

Об'єкт дослідження – умови довготривалого культивування гемопоетичних клітин-попередників кісткового мозку у культурі *in vitro* та *in vivo*.

Мета дослідження – розробити спосіб культивування і накопичення гемопоетичних стовбурових клітин і дослідити морфофункціональні особливості ранніх клітин-попередників гемопоезу і їх найближчих нащадків у процесі їх проліферації і диференціювання. Запропонувати математичну модель проліферації самовідновних систем організму.

Задача дослідження – відбір умов культивування гемопоетичних стовбурових клітин, здатних підтримувати гемопоез впродовж тривалого часу, за рахунок поглибленого аналізу клітинного складу колоній-клонів, отриманих з довготривалих культур.

Методи дослідження – культивування гемопоетичних і стромальних клітин *in vitro* та *in vivo*, клоногенний аналіз у напіврідкому агаровому середовищі для оцінки функціональної активності гемопоетичних клітин-попередників, морфофункціональні методи, метод екзогенного селезінкового колонієутворення, статистична обробка результатів.

Отримано новий спосіб культивування нащадків стовбурової клітини – гемопоетичних клітин-попередників, було оцінено їх морфофункціональний стан і проліферативний потенціал та надано наукове обґрунтування їх використанню як альтернативного джерела стовбурових клітин в разі алогенної трансплантації; запропоновано математичну модель проліферації самовідновних систем організму. Отримані результати дають можливість використовувати запропонований метод для морфофункціональної оцінки стовбурових гемопоетичних клітин та їх найближчих нащадків як потенційного трансплантату і, як наслідок, провести відбір якісного трансплантаційного матеріалу, здатного до ефективного відновлення гемопоезу.

Упровадження результатів НДР – статті, патенти, виступи на конференціях, представлення у лекційних та практичних курсах.

Прогнозні припущення щодо розвитку об'єкта дослідження – отримані в роботі експериментальні дані можуть бути використані як підґрунтя для розробки протоколів експансії гемопоетичних клітин-попередників у культурі *in vitro* з метою отримання їх достатньої кількості та подальшого застосування в експериментальних і клінічних дослідженнях.

ЕКСПАНСІЯ КРОВОТВОРНИХ КЛІТИН, КУЛЬТУРА ТКАНИН, ГЕМОПОЕТИЧНІ КЛІТИНИ-ПОПЕРЕДНИКИ, КЛОНОГЕННИЙ АНАЛІЗ IN VITRO.

Умови одержання звіту: за договором. 10177 Київ, вул. Горького, 180, УкрІНТЕЛ.

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ	5
ПЕРЕДМОВА	6
ВСТУП	7
СУТЬ ЗВІТУ	27
1 ОБ'ЄКТ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ	27
1.1. Виділення клітин кісткового мозку миші	27
1.2. Приготування стромальних фідерних шарів	27
1.3. Тривале культивування гемопоетичних клітин у дифузійних камерах у присутності стромальних фідерних шарів <i>in vitro</i>	29
1.4. Методичні підходи морфофункціональної оцінки культивованих клітин кісткового мозку	30
1.5. Метод екзогенного селезінкового колонієутворення	31
1.6. Математичне моделювання процесу кровотворення	32
2 РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ	36
2.1. Динаміка росту культивованих стромальних клітин кісткового мозку у фідерному шарі	36
2.2. Кінетика формування клітинних агрегатів з кісткового мозку мишей у культурі з напіврідким агаром <i>in vitro</i>	37
2.3. Дослідження здатності стромальних фідерних шарів до підтримки кровотворення у довготривалій культурі <i>in vitro</i>	40
2.4. Аналіз результатів дослідження селезінкового колонієутворення у летально опромінених мишей	44
2.5. Математична модель функціонування системи кровотворення	47
УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ	51
ВИСНОВКИ	55
ПЕРЕЛІК ПОСИЛАНЬ	56

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

ГКП – гемопоетичні клітини-попередники

ГСК – гемопоетичні стовбурові клітини

ЕКУ – ефективність колонієутворення

ЕПО – еритропоетин

ЖМ – жовтковий мішок

КК – кордова кров

КЛУО – кластер-утворюючі одиниці

КМ – кістковий мозок

КСФ – колонієстимулюючі фактори

КУО-ГМ – колонієутворюючі одиниці гранулоцитарно-макрофагальні

КУОк – колонієутворюючі одиниці в культурі

КУОс – колонієутворюючі одиниці в селезінці

КУО-Ф – колонієутворюючі одиниці фібробластів

МНК – моноклеарні клітини

МСК – мезенхімальні стовбурові клітини

ПСКК – поліпотентна стовбутова кровотворна клітина

СКК – стовбурові кровотворні клітини

ФП – фетальна печінка

ЯВК – ядровмісні клітини

PBS – розчин фосфатного буфера

SCF – stem cell factor – фактор росту стовбурових клітин

ПЕРЕДМОВА

Нині трансплантація кісткового мозку є радикальним методом лікування багатьох онкогематологічних захворювань. При трансплантації кісткового мозку гемопоетичні стовбурові клітини відіграють основну роль у пересаженому кістковому мозку, а тому трансплантація кісткового мозку є, по суті, трансплантацією гемопоетичних стовбурових клітин.

Гемопоетичні стовбурові клітини є могутнім джерелом функціонально зрілих елементів, які забезпечують виконання життєво важливих функцій. Однак на сьогодні проблема отримання необхідної кількості стовбурових клітин для відновлення гемопоезу залишається невирішеною. Дані про відомі джерела стовбурових клітин свідчать про те, що клітин не вистачає або їх функціональна активність є недостатньою для відновлення гемопоезу. Брак повноцінного трансплантаційного матеріалу призводить до невдалих результатів та смерті пацієнтів. Тому пошуки альтернативних джерел гемопоетичних стовбурових клітин та їх морфофункціональна оцінка потенційного трансплантату мають вирішальне значення.

ВСТУП

1.1. Сучасні уявлення про систему гемопоезу

Протягом всього життя людини відбувається постійне відновлення клітин крові. Кровотворення, або гемопоез — це тонко регульований процес послідовних диференціювань, в ході якого постійно утворюються більше 300 млн. клітин за хвилину. Теоретично 52 поділи кровотворних стовбурових клітин (СК) достатньо, щоб утворилася необхідна кількість клітин, які здатні забезпечити підтримання на нормальному рівні кількості зрілих клітин крові протягом всього життя людини. В організмі людини продукуються клітини, восьми напрямків диференціювання. При постійному кровотворенні співвідношення між ними, тобто пропорція клітин кожної лінії, підтримується приблизно на одному рівні, що дозволяє зберегти стабільний гемостаз крові в судинному руслі без значних змін [1].

Кровотворення є серією клітинних диференціювань, в результаті яких народжуються зрілі клітини периферійної крові. Кровотворна система являє собою сукупність популяцій різноманітних клітин, що виконують вузькоспеціалізовані функції і мають обмежений життєвий цикл. Стабільність кровотворної системи забезпечується постійною, строго регульованою продукцією зрілих клітин. Число утворених клітин має астрономічний характер. Тільки за один день в організмі дорослої людини продукується (і відповідно гине) близько 250 млрд. еритроцитів, найбільш чисельних клітин крові. Загалом же в організмі дорослої людини за хвилину утворюється близько 30 мільйонів зрілих клітин крові, за добу - продукується більше 300 мільярдів, за рік маса продукції кровотворної системи дорівнює масі людини. Протягом же всього життя продукується близько 5 тонн кров'яних клітин в потрібний час, в потрібному місці і потрібної лінії диференціювання.

Сучасні уявлення про гемопоез твердять, що всі клітини крові мають унітарне походження, тобто процеси диференціювання починаються від єдиного попередника – поліпотентної стовбурової клітини крові (ПСКК). СКК закладаються в онтогенезі. Це клітини, здатні до тривалої (необмеженої) самопідтримки, інтенсивної і тривалої проліферації і диференціювання в усі клітини крові, морфологічно не розпізнаються. Морфологічно подібні на великі лімфоїдні клітини. Проте деякі дослідники висловлюють сумніви щодо необмеженої здатності СКК до проліферації [2]. На їх думку в онтогенезі була закладена необхідна кількість СКК для гемопоезу протягом життя, що знаходяться в стані спокою.

На певному етапі СКК виходить зі стану спокою і продукує кровотворні клітини, доки її проліферативний потенціал не буде вичерпано. Тоді на шлях проліферації виходить наступна СКК. Але більшість дослідників дотримуються унітарної теорії походження клітин крові від примітивних СКК [3, 4]. Кількість таких клітин незначна, приблизно 0,5 % (в КМ), більшість знаходиться в стані спокою. В результаті поліферації, СКК, які виходять зі стану спокою (≈ 20 % від усіх СКК), утворюють клони комітованих клітин-попередників. СКК здатні проводити до 100 мітозів. Клітини-попередники також не піддаються морфологічному розпізнаванню, як і СКК, подібні до великих і середніх лімфоїдних клітин, і здатні проліферувати. Протягом всього життя проходить невинний процес гемопоезу, забезпечуючи надходження в кров нових кров'яних клітин на зміну загиблим, життєвий цикл яких значно коротший за життя багатоклітинного організму. При цьому утворюються родоначальні клітини різних ростків кровотворення, що морфологічно розпізнаються.

Історія дослідження СК пов'язана з багатьма дискусіями і суперечками. Вперше, незалежно один від одного, у 1868 р. Neiman і Bitstsotser було описано утворення клітин крові в кістковому мозку. Розроблений Ehrlich метод диференційного забарвлення клітин на той час сприяв швидкому накопиченню знань про морфологічну будову клітин крові. У 1898 р.

Паппенгейм використавши методи гістологічного забарвлення клітин за Романовським, вперше детально описав перехідні форми клітин кісткового мозку. Вивчаючи гістогенез ембріональної кровотворної тканини, Максимов О.О. ще в 1910 р. висунув ідею монофілетичного походження клітин крові із єдиного родопочаткового попередника. Проте тільки після розвитку сучасних методів дослідження, таких як радіаційна гематологія, цитогенетика, молекулярна біологія, культивування тканин, стало можливим наглядно підтвердити дослідження Максимова. Важливу роль у вивченні стовбурових гемопоетичних клітин зіграли дослідження Lorentz, Ford, Till і McCulloch, Metcalf, Lemishka, Mintz і інших вчених. В результаті проведених досліджень науковцям вдалось чітко охарактеризувати послідовність диференціювання у кровотворних клітин, починаючи з єдиної поліпотентної стовбурової клітини.

Так, для підтримання великої клітинної генерації в кровотворній системі існують спеціальні клітини-попередники, які мають властивість дозрівати до стадії зрілих неподільних клітин, але на відмінну від усіх інших соматичних клітин є «безсмертними», тобто здатними в результаті необмеженого поділу утворити дочірні клітини, повністю ідентичні батьківській (зберігаючи проліферативний потенціал на тому ж рівні, незважаючи на кількість поділів). З іншої сторони, вони мають бути поліпотентними, тобто володіти властивістю до диференціювань у різних напрямках. Ці клітини були названі гемопоетичними стовбуровими клітинами (ГСК).

Впродовж тривалого часу дві характеристики вважалися найважливішими для ГСК, а саме асиметричний поділ і здатність до самовідновлення, тобто до утворення генерації дочірніх клітин, які мають ідентичні регенеративні властивості, такі ж як у материнських клітинах. На даний час відомо, що асиметричному поділу піддаються тільки ГСК; у людини асиметричний поділ клітин безпосередньо пов'язаний із внутрішніми механізмами клітинної полярності [5]. ГСК самовідновлюються протягом всього життя людини, але на даний час кінцевого розуміння механізмів, через

які цей процес відбувається і регулюється, немає, хоча доведено, що це частково пов'язане з рівнем теломеразної активності клітин [6].

На сьогоднішній день для характеристики поняття гемопоетичної стовбурової клітини як такої, вчені використовують чотири основних критерії. До першого відносять асиметричний поділ і властивість до самовідновлення [7]. Другий критерій – окремо взята дочірня клітина ГСК може диференціюватись більше ніж в один тип клітини, а точніше у 8 ліній. Третій критерій, який залишається дискусійним, про те, що кістковомозкові СК, які при пересадці реципієнту мають властивість репродукуватися і відновлювати популяцію тканини печінки і головного мозку [8]. Четвертий критерій, найменш вивчений, – стовбурові клітини дають диференційоване потомство *in vivo* навіть за відсутності пошкодження тканин [9].

Вивчення структурної будови і здатності диференційованого відтворення стовбурових клітин і їх попередників на сьогоднішній день є надзвичайно актуальною і не достатньо вивченою темою. Тому використання новітніх технологій та сучасних методів досліджень, таких як імунофлуоресцентний аналіз, культивування з використанням іморталізованих клітинних ліній, транспланційні моделі, нададуть можливість значно глибше і детальніше вивчити імунологічні та функціональні характеристики ГСК і клітин – попередників гемопоезу.

1.2. Регуляція кровотворення

Існує два рівні регуляції для кровотворення [10]. Вся кількісна регуляція кровотворення, тобто задоволення запиту на зрілі клітини, здійснюється на більш низькому рівні клітинного диференціювання. Мішенню цієї регуляції є клітини-попередники відповідних рядів кровотворення, які вже втратили здатність до тривалої самопідтримки і поліпотентність, тобто компетентність до всіх без виключення міелоїдних і лімфоїдних диференціювань, але зберегли ще доволі чутливий до регуляції

проліферативний потенціал, в результаті чого число поділів, які з ними відбуваються, і число утворених нащадків, залежить від запиту. Така регуляція заснована на функціонуванні системи спеціальних гормонів. Кожен з них викликає утворення з клітин попередників тільки одного виду спеціалізованих клітин. Продукція і/чи виділення гормону викликається запитом, тобто врешті решт зумовлюється прямою чи опосередкованою потребою в клітинах відповідного ряду. Таким чином, ця регуляція має дальню дію і водночас захоплює всі чи більшість кровотворних територій.

Стовбурові клітини регулюються принципово інакше. Їх регуляція носить локальний характер і пов'язана з функціонуванням клітин строми кровотворних органів – системи, що називається кровотворним мікрооточенням [10, 11]. Стовбурові клітини таким чином не чутливі до запиту з боку кровотворної системи загалом. Локальна регуляція забезпечує підтримання на певному рівні загального числа ССК. Сукупність цих двох рівнів регуляції дозволяє одночасно забезпечити, з одного боку, невичерпність кровотворної системи, тобто підтримання популяції ССК, і, з іншого боку, відповідність кровотворення потребам його, які мають місце на даний момент. Диференціювання в кровотворній системі супроводжуються зміною типу регуляції. Можна зробити висновок, що принцип регуляції є однією з основних характеристик класу кровотворних клітин-попередників, тому будь-яке визначення кровотворних попередників повинне включати в себе характеристику і цієї важливої властивості.

1.2.1. Роль кровотворного мікрооточення в регуляції кровотворення. Під кровотворним мікрооточенням розуміють сукупність локальних умов, необхідних і достатніх для підтримки проліферації і диференціювання кровотворних клітин. Його морфологічним субстратом є строма кровотворних органів. У регуляції кровотворення беруть участь різні типи стромальних клітин, суттєву роль відіграє також продукований ними позаклітинний матрикс. Про існування кровотворного мікрооточення свідчить у першу чергу локалізація гемопоезу тільки в спеціалізованих

кровотворних органах. ГСК вільно циркулює в периферичній крові, але проліферує і диференціюється тільки в кровотворних тканинах, де стромальні клітини забезпечують необхідні для цих процесів умови, головне із яких – оптимальна концентрація гуморальних регуляторів кровотворення.

Клітини, що складають стромальну матрицю всіх органів і тканин, включно із гемопоетичними тканинами, утворюються із так званих мезенхімальних стовбурових клітин (МСК). У період онтогенезу, до початку і на стадії органогенезу, стромальна основа всіх органів і тканин ссавців і людини виникає із загального пулу МСК. Тому вважається, що у дорослому організмі більша частина МСК повинна знаходитися у сполучній і кістковій тканинах.

Основні докази існування стромальної стовбурової клітини було отримано в 70-80 роки ХХ-го сторіччя, завдяки роботам Фріденштейна А.Я. і його школи, Черткова Й.Л. і його школи в Росії, Owen M. в Англії, Tavassoli M. в США [12, 13, 14, 15]. Стромальні клітинні елементи можуть бути виявлені за здатністю до утворення в культурі колоній адгезивних клітин. Первинно ці колонії вважалися клонами, що складаються із фібробластів, тому утворюючі їх клітини-попередники було названо колонієутворюючими одиницями фібробластів (КУО-Ф) [13]. Згодом було показано, що в колоніях, які утворюються із КУО-Ф, крім фібробластів, присутні макрофаги і ендотеліальні клітини [16]. При тривалому культивуванні з'являються адипоцити, що розвиваються із фібробластів. Макрофаги і ендотеліальні клітини в цих колоніях виникають не із загального попередника з фібробластами, а в результаті локальної стимуляції їх росту колонієстимулюючими факторами, які продукуються фібробластами [17].

Прогрес у галузі вивчення біології МСК можливий завдяки розробкам технологій їх виділення, що базуються на ідентифікації спектру молекулярних маркерів, притаманних лише цим клітинам, культивуванню, розмноженню *in vitro* і спрямованому диференціюванню. На даний час відомо, що мультипотентні МСК позбавлені специфічного, лише їм

притаманного фенотипу, але експресують комплекс маркерів, характерних для мезенхімальних, ендотеліальних, епітеліальних і м'язових клітин при відсутності експресії маркерів гемопоетичних клітин – CD45, CD34 і CD14 [18]. Крім того, МСК конститутивно і індукційно продукують гемопоетичні і негемопоетичні ростові фактори, інтерлейкіни і хемокіни, а на мультипотентних мезенхімальних клітинах-попередниках експресуються рецептори для деяких цитокінів і ростових факторів [19].

На сьогоднішній день, найбільш детально вивчена строма КМ – основного органу кровотворення у дорослих ссавців. Вона включає декілька типів клітин, очевидно, неоднакових за своїми функціями у підтримці кровотворення. До них належать ретикулярні клітини, бар'єрні клітини [20], адипоцити [13]. Із КМ отримані різні лінії стромальних клітин з морфологією від епітеліоїдної і фібробластоїдної, здатні за певних умов диференціюватися в адипоцити [21, 22].

Іще одним компонентом кровотворної стромати є ендотелій кістковомозкових синусів. За даними Islam зі співавт. [23] в КМ людини спостерігається тісний контакт ендотеліальних клітин з ранніми кровотворними, що свідчить про міжклітинну взаємодію; поблизу ендотелію іде активна проліферація кровотворних клітин. Культури ендотеліальних клітин здатні продукувати різні кровотворні фактори [24], а також підтримувати проліферацію примітивних кровотворних клітин [25] і їх диференціювання у гранулоцити, моноцити, мегакаріоцити [26].

Більшість стромальних клітин КМ, здатних підтримувати кровотворення в культурі, є фібробластами, оскільки вони експресують колаген I і III типів і фібронектин, але не експресують колагени IV і V типів і ламінін. Наявні численні повідомлення про продукцію фібробластами кістковомозкового та іншого походження різних цитокінів [27].

Із стромати кровотворних органів отримано велику кількість клітинних ліній, різних за своєю здатністю до підтримки кровотворення *in vitro*. Багатьма авторами відзначено, що різні стромальні лінії, отримані із одних і

тих же органів, підтримують кровотворення з неоднаковою ефективністю [28]. Очевидно, функціональна неоднорідність цих клітинних ліній відображає гетерогенність кровотворного мікрооточення *in vivo*.

Відзначають також відмінності у підтриманні кровотворення лініями стромальних клітин, отриманими із різних органів. Так, фібробласти із ФП собаки продукують фактор, що стимулює дорослі КУО-ГМ, тоді як фібробласти із фетального кісткового мозку – такий, що пригнічує. Rios M. і Williams D. у своїх експериментах показали, що лінії стромальних клітин не кровотворних тканин (легені, нирки, шкіри) дорослих мишей нездатні підтримувати проліферацію ГСК в культурі, незважаючи на морфологічну і фенотипову схожість зі стромальними клітинами кісткового мозку, що володіють такою здатністю [29].

З іншого боку, є дані про відсутність органоспецифічності у функціях стромальних клітин *in vitro*. Так, лінії клітин строми і КМ, і тимуса здатні тривало підтримувати ГСК, мієлопоез і продукцію попередників Т- і В-лімфоцитів. Припускають, що функція цих стромальних клітин полягає у селективній підтримці найменш диференційованих кровотворних клітин і захисті їх від диференціювання, незалежно від її напрямку. Процеси диференціювання і дозрівання в цьому випадку залежать від цитокінів, які додають до культури [30].

Під час онтогенезу кровотворне мікрооточення зазнає певних змін у структурі і функціях. Так, фетальні гепатоцити щура, що підтримують кровотворення, чітко відрізняються за морфологією і експресованими поверхневими антигенами від нездатних до цього дорослих гепатоцитів [31].

В 1988 р. Van Den Heuvel R.L. зі співавт. було досліджено зв'язок стану строми кровотворних органів ембріонів з інтенсивністю кровотворення в цих органах, що залежить від стадії розвитку. Показано, що стромальні клітини фетальних і неонатальних кровотворних органів миші здатні підтримувати кровотворення в тривалій культурі, причому продукція КУО-ГМ у ній відображає рівень КУО-ГМ в органі, із якого отримана культура [32].

Між лініями стромальних клітин, отриманими із ЖМ, ФП і дорослого КМ, є відмінності в наборі синтезованих цитокінів і в здатності до підтримання кровотворення [33]. Так, стромальні клітини із ЖМ підтримують диференціювання кровотворних клітин в гранулоцити сильніше, а в макрофаги слабше, ніж стромальні клітини із дорослого КМ [34]. Крім того, вони ефективніше за стромальні клітини КМ підтримують ріст примітивних кровотворних клітин з високим проліферативним потенціалом [35].

За даними деяких авторів, як фетальні, так і дорослі кістковомозкові фібробласти собаки пригнічували утворення гранулоцитарно-макрофагальних колоній в культурі, крім того, у фетальних фібробластів ця здатність була виражена сильніше. Багато цитокінів продукуються безпосередньо в кровотворних тканинах, беручи участь у локальній регуляції кровотворення стромальними клітинами. Окрім розглянутих вище основних гемопоетичних цитокінів і факторів росту, первинні культури і іморталізовані лінії клітин кровотворної строми продукують, зокрема, ІЛ-1, ІЛ-2, ІЛ-4, ІЛ-5, ІЛ-7, ІЛ-8, ІЛ-11 [36, 37], а також інтерферон, фактори росту пре-В-клітин.

У ряді випадків показано кореляцію між продукцією стромальними клітинами тих чи інших факторів і здатністю цих клітин до підтримки кровотворення [37, 38]. Однак в інших випадках такої кореляції не спостерігається: лінії стромальних клітин, що виробляють один і той же набір цитокінів, відрізняються за ефективністю підтримки кровотворення [39]. На думку Gibson F. зі співавт., це може бути пов'язано із тим, що багато цитокінів продукуються строною локально на низькому рівні, і концентрації їх у супернатанті можуть не відображати біологічно активні рівні на клітинній поверхні під час взаємодії стромальних клітин із кровотворними [38].

Вироблення цитокінів стромальними клітинами може не тільки відбуватися конститутивно, але й індукуватися різними гуморальними

регуляторами [40]. У ряді випадків вироблення стромою кровотворних цитокінів стимулюється також TGF- β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-7 і епідермальним фактором росту (EGF), фактором росту тромбоцитарного походження (PDGF) і основним фактором росту фібробластів (bFGF) [40, 41]. Як було зазначено вище, деякі із цих стимуляторів (IL-1, IL-2, IL-4, IL-6, IL-7, TGF- β) самі продукуються клітинами кровотворної стромы, тобто можуть діяти аутокринним чи паракринним способом.

На продукцію цитокінів стромою можуть впливати і підтримувані нею кровотворні клітини. Взаємодії стромальних і кровотворних клітин не носять одностороннього характеру; існує вплив не тільки стромы на кровотворення, але і кровотворення на строму. Культивування разом із кровотворними клітинами індукує продукцію Г-КСФ стромальними клітинами лінії MC 3T3-G2/PA6 і значно посилює секрецію IL-6 остеобластами [36]. У першому випадку цей ефект спостерігається лише при безпосередньому контакті кровотворних клітин зі стромальними, у другому він не потребує такого контакту і опосередкований якимись розчинними факторами (але не IL-1 і TNF).

На даний час розроблено методи створення тривалих культур не тільки КМ, але й інших кровотворних тканин. Так в роботах Van den Heuvel R.L. зі співавт. показано здатність фетальних і неонатальних кровотворних органів миші підтримувати продукцію КУО-ГМ у тривалій культурі [41].

Ye Z.-Q. зі співавт. створили тривалу культуру клітин КК людини, здатну підтримувати кровотворення в середньому 4 місяці [42]. Як відомо, фібробласти КК унікальні за конститутивною секрецією високого рівня IL-1, Г-КСФ, ГМ-КСФ і М-КСФ [215]. У тривалій культурі вони продукують SCF і IL-6, але не IL-3 і не ГМ-КСФ, і підтримують проліферацію ранніх кровотворних клітин [42].

Однак слід зазначити, що такі джерела гемопоетичної тканини, як периферична кров, КК містять незначну кількість стромальних попередників, що іноді ускладнює формування адекватного стромального підшару. У

зв'язку з цим розроблено двостадійний метод тривалого культивування (ДТК) [43]. На першому етапі формування стромального підшару здійснюється за рахунок клітин донорського КМ (чи стромальних клітинних ліній). Після опромінення останнього гемопоетичні клітини засіваються на сформований підтримуючий шар. У такій культурі продукція ГКП, що з'являються після 5-8 тижнів, зумовлена присутністю примітивних ГСК у вихідній клітинній популяції, що перебувають у стані спокою.

Окрім розглянутих експериментальних підходів до вивчення кровотворення в системі *in vitro*, існує і множина інших систем, застосовуваних з цією метою. Серед них – імплантація кровотворних тканин під капсулу нирки [13], культивування кровотворних клітин у дифузійних камерах [44] і багато інших. Застосування всіх цих методів дозволило досягнути значного прогресу в розумінні механізмів регуляції кровотворення, хоч залишається багато неясних запитань. Зокрема, питання підтримання кровотворення в культурах гемопоетичних клітин КК стромальними клітинами органів фетального гемопоезу вивчено недостатньо. Крім того, дискусійним залишається питання про необхідність безпосереднього клітинного контакту між гемопоетичними клітинами і клітинами строми в культуральній системі.

Незважаючи на багатообіцяючі результати, отримані в зарубіжних лабораторіях з культивування ГСК КК і їх похідних з метою експансії, говорити про технологію, застосовну на сьогоднішній день для клінічних цілей, ще рано.

Таким чином, питання підтримання кровотворення в умовах тривалої культури *in vitro* зі збереженням високих показників функціональної активності ГСК і ГКП потребують подальшого вивчення, що спонукало нас до проведення даного експериментального дослідження, яке може зробити свій внесок у вирішення цієї актуальної проблеми.

1.2.2. Вплив строми на гемопоетичну функцію. Стромальні клітини гемопоетичних органів є основним компонентом, який регулює тип

диференціювання і темпи прліферації гемопоетичних клітин. Стромальні клітини можуть здійснювати стимулюючу дію на кровотворні клітини-попередники і мають властивість пригнічувати проліферацію грануломоноцитарних попередників. Цей факт пов'язаний як з безпосереднім впливом стромальних клітин на кровотворні клітини, так і з порушенням продукції стимуляторів грануломоноцитопоезу клітинами моноцитарно-макрофагального ряду. Варто згадати, що при застосуванні культурального методу дослідження, який є одним з найпоширеніших в гематології для вивчення гемопоетичних клітин насамперед отримують в культурі стромальну тканину, і вже наступним етапом є розвиток гемопоезу [45]. Зокрема макрофаги експресують більшу частину цитокінів у організмі [46]. Вони виробляють ряд ростових факторів і беруть участь у міжклітинних взаємодіях з кровотворними клітинами-попередниками. Макрофаги кісткового мозку виробляють ФНП і в той же час слугують для нього мішенню. ФНП впливає на секрецію КСФ-М стромальними клітинами. Дія ФНП на макрофаги, що експресують рецептори цього ростового фактору, призводять до порушення в регуляції секреції ІЛ-1 і опосередковано до активації кровотворних клітин-попередників.

Макрофаги здійснюють також модулюючий вплив на структуру та склад позаклітинного матриксу, вміст в ньому фібронектину. Є підстави полягати, що макрофаги беруть участь в регуляції прліферативної активності ПСКК, так як зміни фагоцитарної активності макрофагальних елементів (пригнічення чи стимуляція), обумовлюють зміни числа стовбурових гемопоетичних клітин [47]. Крім того макрофаги відіграють значну роль в регуляції еритропоезу. Темп проліферації та диференціювання еритроїдних клітин в кістковому мозку може регулюватися на основі міжклітинних взаємодій між еритроїдними елементами, що диференціюють, і їх попередниками. Місцем секреції інгібітору еритропоезу при даному прийомі можуть бути ретикулярні клітини (макрофаги) кровотворних органів,

зокрема, макрофагальні клітини, що знаходяться в центрі еритробластичних острівців: фагоцитуючи вільні ядра нормобластів [48].

Висунуто передбачення, що в мікрооточенні ККЛ присутня суміш факторів росту, яка впливає на потенціал реплікації субпопуляції стовбурових клітин [48]. Ендотеліальні клітини пупочної вени продукують безліч факторів росту, в тому числі c-kit ligand який стимулює ріст примітивних гемопоетичних клітин, SCF. Також самі клітини продукують власні ростові фактори, як ГМ-КСФ та ІЛ-3. Це пояснює деякі властивості гемопоетичних клітин.

Вплив стромы на стовбурові клітини крові викликає все більшу зацікавленість. Висуваються пропозиції ввести в практику при тестуванні нових лікарських препаратів, що використовуються при патологіях кровотворної системи, враховувати не лише їх вплив на кровотворні клітини, але й обов'язково, їх вплив на стромальні клітини, зокрема механоцити [4]. Новою проблемою в клінічній медицині називають трансплантацію стромы кісткового мозку. Трансплантація ембріональних стромальних клітин, що синтезують гемопоетини, стимулятори жирових клітин та інгібітори фіброзної тканини, хворим зі злякисними захворюваннями стромы представляється науково обґрунтованою.

Все це свідчить про необхідність поширювати знання про міжклітинні взаємодії кровотворних органів та, зокрема, вплив кровотворного мікрооточення на поліпотентні стовбурові клітини. А також чутливість та зміни кровотворного мікрооточення під впливом певних факторів і залежність від цього змін у процесах кровотворення.

1.3. Математичні моделі процесу кровотворення

Кровотворення – це самовідновна система, яка віддзеркалює всі патологічні процеси, що порушують гомеостаз. Регуляція цих процесів дуже активно досліджується вченими всього світу. Спроба описати процес

кровотворення мовою математики за останні десятиліття здійснювалася неодноразово. Тим не менше, і по сьогоднішній день кровотворна система як яскравий приклад системи оновлення потребує осмислення і узагальнення результатів у вигляді математичних моделей. Аналіз даних літератури і результатів наших попередніх досліджень приводять нас до думки про потребу конкретизувати уже наявні поняття і закономірності процесів, які відбуваються у кровотворній системі. Нами було зроблено спробу проаналізувати кровотворення як стаціонарний процес проліферації і диференціювання кровотворних клітин і, використовуючи закономірності тих чи інших його етапів, перетворити їх у математичні формули. Отримані висновки, підтверджені експериментально, можуть у подальшому слугувати основою для розрахунків числових показників тих чи інших популяцій клітин, необхідних для відновлення гемопоезу.

Механізм підтримки кровотворення в організмі забезпечує продукування 300 млн. клітин крові у хвилину, принаймні за п'ятьма напрямками диференціювання. При стабільному кровотворенні співвідношення між ними у пропорційному відношенні підтримується приблизно на одному і тому ж рівні. Разом з тим при збурюючих впливах продукція одних чи інших клітин різко змінюється.

Обсяг клітинної продукції у кровотворній системі навів на думку про існування клітин-попередників кровотворних клітин, здатних у результаті поділу утворювати «дочірні» клітини, повністю ідентичні материнській клітині, та клітини, які диференціюються по всіх напрямках кровотворення. Ці попередники були названі стовбуровими кровотворними клітинами (СКК).

Насьогодні можна вважати встановленим те, що СКК володіють високим, але не безмежним проліферативним потенціалом, тобто СКК здатні мати скінчене число поколінь нащадків, вони не безсмертні, тобто не можуть «самопідтримуватися» нескінченно довго. СКК закладаються лише в ембріогенезі і витрачаються послідовно, утворюючи як правило короткоживучі локально розташовані клітинні клони, які замінюють один

одного [49, 50], аналогічно тому, як це відбувається у яєчнику. Разом з тим, останні дослідження дозволяють припускати, що самооновлення і диференціювання стовбурових клітин підтримується асиметричним поділом, з допомогою якого стовбура клітина дає початок двом неоднаковим дочірнім клітинам: одна займає ту ж нішу, що й батьківська стовбура клітина, інша приступає до диференціювання [51]. СКК принципово не відрізняються від більш зрілих членів кровотворної ієрархії і всі без винятку кровотворні клітини являють собою транзитні популяції, які неперервно або з перервами просуваються до кінцевих стадій дозрівання. Саме тому усі відділи попередників гетерогенні, містять численні клітинні форми, які поступово переходять одна в одну.

Перша ознака, яка відрізняє ранні стадії дозрівання СКК, полягає у поступовому зниженні проліферативного потенціалу. При подальшому дозріванні клітини залишають стовбуровий відділ і переходять у відділ комітованих попередників. Поступово комітовані клітини втрачають поліпотентність і переходять у відділ уніпотентних клітин. Існує думка, що до вибору того чи іншого напрямку диференціювання приводять внутрішні стохастичні зміни клітин-попередників, які індукують дозрівання і комітування. Останнє може бути визначено як рішення, яке приймає клітина для продукування нащадків певної лінії у майбутньому.

Стовбурові кровотворні клітини морфологічно неможливо відрізнити від клітин-попередників, однак їх можна кількісно визначити при клонуванні у напівтвердих середовищах (агар, метилцелюлоза, згусток плазми крові, колагеновий гель). У той же час популяція СКК неоднорідна. Наприклад, клітини, що утворюють колонії в селезінці, знаходяться в кінці ієрархії СКК; у різних експериментальних системах може бути виявлено популяції більш примітивних стовбурових клітин. За допомогою різних методів (морфологічних, цитохімічних, з використанням моноклональних антитіл, цитогенетичних, біохімічних та ін.) можливо більш чітко відділити СКК від кровотворних клітин-попередників [52].

Комітовані СКК представляють собою поступове стохастичне обмеження диференціювальних потенцій, складний багатостадійний процес перетворення поліпотентної стовбурової клітини в монопотентний попередник. Комітовані клітини набувають чутливості до гуморальних регуляторів кровотворення. Культивування їх у напіврідкому середовищі (агар, метилцелюлоза) у присутності цих факторів дозволяє отримувати колонії термінально диференційованих клітин [53].

Останніми роками традиційне уявлення про необмежене самопідтримання СКК піддають перегляду. Свідченням тому є дані, що у більшості, якщо не у всіх, СКК відбувається скорочення теломеразної ДНК в міру дорослішання організму чи в міру їх проліферації у культурі. Це говорить про обмеженість їх проліферативного потенціалу і зменшення його з віком [54].

Слід зазначити, що іще в 60-х роках було висловлено гіпотезу клональної сукцесії, згідно з якою наявні в організмі СКК по чергово беруть участь в гемопоезі, даючи клони, що виходять у диференціювання [55]. Останніми роками Й.Л. Чертков зі співавторами підтвердили цю гіпотезу, використовуючи розроблений ними метод вивчення динаміки індивідуальних клонів СКК протягом життя миші [56]. За їх даними, в опромінених мишей, відновлених генетично маркованими донорськими стовбуровими клітинами, кровотворення забезпечується одночасно значною кількістю невеликих локально існуючих короткоживучих клонів. Клони змінюють один одного і ніколи не з'являються знову після зникнення. На думку цих авторів, СКК не самопідтримуються, а представляють собою закладену в ембріогенезі популяцію клітин з обмеженою здатністю до проліферації, що витрачаються поступово і змінюють одна одну в міру виснаження проліферативного потенціалу.

Кровотворна тканина є самооновним клітинним комплексом, який характеризується тим, що смерть клітин збалансована продукцією нових клітин. Рівновага між системою крові, цілісним організмом і оточуючим

середовищем регулюється нейрогуморальною системою через спеціальний апарат, що складається із внутрішньоклітинних сигнальних молекул і ферментів (інгібіторів та індукторів процесів диференціювання і проліферації), гормонів, мікроелементів і т. ін. На різних етапах онтогенетичного розвитку, як в пренатальний період, так і в постнатальному житті, механізм цієї регуляції, очевидно, різний. Однак принципова його суть полягає у репресії чи дерепресії відповідних ділянок молекули ДНК геному кровотворних клітин. Загальні схеми ембріонального і постембріонального кровотворення не рівноцінні. Ця обставина підтверджує положення про специфіку регуляції кровотворення на різних стадіях розвитку організму [49].

У літературі відзначається відсутність на сьогоднішній день розуміння того, як регулюється складний процес вступу стовбурової клітини у цикл і вибір нею напряду диференціювання та припускається стохастичність цих процесів.

У міру просування вздовж дерева кровотворних диференційовань стохастична проліферація СКК, не чутлива до запиту, змінюється на регульовану сироватковим рівнем ростових факторів, що і зумовлює можливість кількісної регуляції кровотворення.

Наявність двох фаз регуляції кровотворення: незалежної від запитів на рівні СКК і чутливої до запиту на рівні всіх більш зрілих попередників, включаючи тих, які морфологічно розпізнаються, забезпечує дві основні властивості процесу кровотворення. По-перше, його невичерпність незалежно від інтенсивності запиту за рахунок збереження СКК, які є цитокінонезалежними, виходять зі стану спокою стохастично і здатні відновлювати всю кровотворну систему після її загибелі чи втрачання зрілих клітин. По-друге, можливість швидкої відповіді на запит, яка здійснюється більш зрілими, ніж СКК, попередниками і забезпечує відповідну продукцію зрілих клітин певного типу. При стабільному стані у кровотворній системі у кожний момент часу присутні численні кровотворні попередники, які ще

далеко не вичерпали свій проліферативний потенціал і здатні до негайної і інтенсивної відповіді на запит.

Spangrude G.J. зі співавт. запропоновано наступний можливий механізм регуляції кровотворення. Більш зрілі кровотворні попередники потребують менше стимулів для проліферації, ніж менш зрілі. У відповідь на незначне ослаблення кровотворення вивільняється один чи декілька факторів, які активують достатньо зрілі попередники, що веде до швидкого відновлення відповідних клітинних типів. При вищому запиті на кровотворення вивільняються додаткові фактори, що запускають проліферацію і диференціювання стовбурових клітин. Кількість активованих СКК визначається різноманітністю, і, можливо, кількістю вивільнюваних факторів [57].

Відомо, що більш ранні СКК нечутливі до факторів росту. Goldwasser E. зі співавт. [58] запропонували гіпотезу регуляції СКК шляхом аутокринної продукції ними цитокінів. Ця гіпотеза передбачає наявність мультипотентних гемопоетичних клітин внутрішньоклітинних рецепторів цитокінів, стимуляція яких веде до їх проліферації. Комітування пов'язане із припиненням функціонування внутрішнього аутокринного механізму і з експресією специфічних мембранних рецепторів для тих чи інших факторів, у результаті чого клітина стає залежною від зовнішнього сигналу для даного шляху диференціювання. У підтвердження цієї гіпотези можна навести дані про аутокринну продукцію факторів росту трансформованими кровотворними клітинами, що дозволяє їм проліферувати в культурі за відсутності стромы і незалежно від додавання екзогенних цитокінів [59, 60]. Однак стосовно стовбурових клітин ця модель ще слабо розроблена і потребує перевірки і уточнення.

Перша стохастична модель кровотворення та відповідна математична модель була запропонована в роботі Till et. al., 1964 на основі вивчення вмісту стовбурових кровотворних клітин в окремих селезінкових колоніях [61]. Описана ним стохастична модель проліферації стовбурових клітин

полягає по-перше у тому, що кожна колонієутворююча клітина може поділитися і утворювати дві нові клітини зі здатністю формувати колонії.

З іншого боку, клітина може диференціюватися, відповідно втративши можливість до формування колоній, але зберігаючи можливість продукувати кілька поколінь клітин, здатних до диференціювання. Друга риса моделі полягає в тому, що ці два процеси відбуваються випадково у популяції колонієутворюючих клітин.

Таким чином, у стохастичній моделі Till припускається, що колонієутворююча клітина (стовбурова клітина) після завершення періоду розвитку з імовірністю P_2 ділиться на дві колонієутворюючі клітини і з імовірністю P_0 втрачає можливість формувати колонії, причому $P_2 + P_0 = 1$. Відповідна математична модель Till, що описує запропоновану ним стохастичну модель проліферації стовбурових клітин, називається процесом «народження» і «смерті», у якому акт самопідтримки стовбурової клітини з імовірністю P_2 трактується як «народження», а акт її диференціювання сприймається як «смерть».

Отже, описана вище стохастична модель та відповідна математична модель описують процес кровотворення, зосередившись тільки на відділі стовбурових клітин.

Ця модель отримала подальший розвиток у роботі Korn зі співавт. (1973) [62]. Стохастична модель, яка запропонована Till *et al.*, є моделлю першого етапу кровотворення у стохастичній моделі Korn.

Перевірка на адекватність запропонованих стохастичних моделей реальним процесам кровотворення проводилась авторами при порівнянні результатів моделювання і експериментальних даних спостереження процесів відтворення кровотворення в умовах гемопоетичного стресу, тобто після летального опромінення.

Недоліки обох запропонованих стохастичних моделей виявляються при спробі їх використання для моделювання стабільного процесу кровотворення, коли середнє число всіх типів клітин не змінюється у часі.

У роботі Roeder I. зі співавт., запропонована і досліджується інша стохастична модель організації гемопоетичних стовбурових клітин [64, 65]. У моделі припускається, що властивості клітин можуть змінюватися у певних діапазонах можливих варіантів. Напрямок розвитку клітин і вибір клітиною певної властивості залежить від внутрішнього стану клітини і від сигналів з її ростового середовища. Припускається, що кожна клітина належить до одного з двох середовищ А чи Р і характеризується параметром a , який визначає її можливість належати до середовища А. Припускається, що у середовищі Р клітини втрачають можливість належати середовищу А, а в середовищі А поступово їх повертають. Клітини в середовищі А не проліферують, але у середовищі Р проліферують.

Слід відзначити, що така стохастична модель організації стовбурових клітин не може бути математично проаналізована. Її властивості можуть бути визначені лише за допомогою комп'ютерного моделювання, а модельні параметри можуть бути підібрані на основі аналізу результатів комп'ютерної імітації описаної стохастичної моделі.

Запропонована у роботі Korn (1973) модель є найбільш близькою до стохастичної моделі функціонування кровотворної системи, що пропонується у нашій роботі.

СУТЬ ЗВІТУ

1 ОБ'ЄКТ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

1.1. Виділення клітин кісткового мозку миші

Джерелом клітин кісткового мозку у лабораторних тварин є стегнова, гомілкорова, плечорова кістки. В роботі використовували мишей лінії СВА, статеворо зрілих самців масою 18-20 г.

Тварин забивають методом цервікальної дислокації спинного мозку в шийному відділі. Обробляли поверхню стегна 70%-вим етанолом, розрізали шкіру ножицями, видаляли стегно, очищали його від м'язових волокон. Кістку протирали бинтом, змоченим 70%-вим спиртом. За допомогою голки і шприца вимивали вміст стегнорової кістки середовищем, що містить гепарин 50 Од/мл (на стегнорову кістку миші потрібно 0,5-1 мл середовища). Матеріал ресуспендували у живильному середовищі шляхом пропускання крізь голку зменшувального діаметра, фільтрують крізь 4-шаровий капроновий фільтр, додавали 4-8 мл середовища без гепарину, центрифугували 2-3 рази при 1500 об/хв. із заміною надосадової рідини свіжою порцією середовища (без гепарину) по 5-7 мл на центрифужну пробірку. Після останнього центрифугування надосадову рідину замінили 1-2 мл середовища, матеріал ресуспендували і підраховували загальну кількість мієлокаріоцитів. Усі маніпуляції слід проводити при 4-5 °С .

1.2. Приготування стромальних фідерних шарів

Для визначення здатності строми кісткового мозку до підтримки гемопоезу в культурі *in vitro*, готували стромальні фідерні шари наступним чином. Клітинну суспензію, отриману з клітин кісткового мозку, змішували з 6 мл культурального середовища наступного складу: DMEM, 10% FCS, 1% L-глутаміну (220 мМ/мл) (Sigma, США), 25 Од/мл канаміцину, і засівали у

пластикові культуральні 6-лункові планшети фірми Nunc (Данія). Через добу проводили часткову заміну культурального середовища (1/2 загального об'єму) з видаленням частини неадгезованих клітинних елементів. Потім середовище міняли кожні 72 години шляхом зміни половини супернатанту свіжим середовищем. Культивування проводили в CO₂-інкубаторі – 5% CO₂ при 37°C і абсолютній вологості. На 3 – 4-ий день культивування спостерігалася активна проліферація фібробластоподібних клітин на дні культурального планшета з формуванням моношару до 7-10-ої доби. Експлантація на першому етапі всієї отриманої клітинної суспензії дозволяє клітинам, що володіють найкращою здатністю до адгезії, селективно прикріплюватися до дна культурального флакона. А проведена через добу заміна частини культурального середовища, з видаленням неадгезованих елементів, дає змогу довести щільність клітин до оптимальної, з тим, щоб отримати сформований первинний моношар за 7-10 днів.

Потім проводили субкультивування клітин. Для цього клітини знімали з поверхні культуральної посудини за допомогою розчину 0,25% Trypsin-EDTA, відмивали центрифугуванням 10 хвилин при 1000 об/хв., після видалення супернатанту додавали 12 мл середовища і ретельно перемішували. Для наступного пасажу по 1 мл середовища з клітинами поміщали в два пластикові планшети. Після другого пасажу, сформований протягом 7-10 днів моношар знімали розчином Trypsin-EDTA. Потім клітини заморожували в культуральному середовищі під захистом кріопротектора диметилсульфоксиду (ДМСО) в кінцевій концентрації 5% і зберігали в рідкому азоті (-196° C).

Клітини розморожували на водяній бані (+40° C) за 7-10 днів до проведення основного експерименту, додавали культуральне середовище вищевказаного складу і засівали в шестилункові пластикові планшети Nunc в концентрації 1×10^5 клітин на лунку. Перед досягненням моношару клітини обробляли Мітоміцином-С (Sigma, США) в концентрації 2 мкг/мл впродовж 2 годин при 37°C і 5% CO₂, як описано Ponchio L. [66], таким чином,

зупиняючи процеси клітинного поділу. Потім моношар 5 разів відмивали розчином PBS, додавали культуральне середовище і використовували як фідерний шар.

1.3. Тривале культивування гемопоетичних клітин у дифузійних камерах у присутності стромальних фідерних шарів *in vitro*

Гемопоетичні клітини культивували в порожнині дифузійної камери за методом Н.М. Білько [67]. Використовувана в роботі дифузійна камера виготовлена з пористого інертного гідрогелевого матриксу і є напівпроникною капсулою діаметром 0,8-1 см і товщиною 1-2 мм.

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*.

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

Клітини кісткового мозку миші розводили культуральним середовищем (DMEM + 15% FCS + 1% L-глутамін + 25 Од/мл канаміцин) та додавали напіврідкий агар Difco у співвідношенні 1:1, щоб отримати кінцеву концентрацію 1×10^5 /мл. Клітинну суспензію за допомогою 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

мінjali кожні 72 години шляхом зміни половини супернатанту свіжим середовищем. Культивування проводили в CO₂ - інкубаторі (Jouan, 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 п'яти дифузійних камер, оцінювали зміни в середніх кількостях ЯВК і проводили клоногенний аналіз з підрахунком КУО-ГМ у напіврідкому агаровому середовищі. Отримані значення порівнювали з такими для вихідної суспензії, позначеної як МНК 0 день.

1.4. Методичні підходи морфофункціональної оцінки культивованих клітин кісткового мозку

Життєздатність гемопоетичних клітин визначали за суправітальним забарвленням метиленовим синім. Їх функціональну активність визначали шляхом обліку колоній-клонів, які формуються кровотворними клітинами-попередниками у двотижневий термін в разі культивування *in vitro* у напіврідкому агарі методом Pluznik, Sachs (1965).

Для кількісного підрахунку колоній використовували метод фіксації і забарвлювання за Май-Грюнвальдом. Основним реактивом є барвник Май-Грюнвальда. Методика полягає у тому, що висушений препарат заливали основним барвником на 3-7 хв, промивали проточною водою, висушували і розглядали під мікроскопом.

Розрізняють 3 види колоній – компактні, компактні з “вінчиком” (змішані) і дифузні. За колонію приймали структури, що нараховували більше 40 клітин: клітинні агрегати, які складаються з 20-40 клітин рахували великими кластерами, а від 3 до 20 клітин – малими кластерами.

Після кількісного обліку окремі клони ізолювали і поміщали у живильне середовище, яке складалося з 2 % фетальної телячої сироватки у середовищі RPMI (з розрахунку одна колонія – у 0,05 мл середовища). Слайди для цитологічного аналізу готувалися з культивованих клітин з

використанням цитоцентрифуги. Клітини переносилися на скельця шляхом центрифугування протягом 1 хв. при 450 об/хв. Висушені скельця фіксували за Май-Грюнвальдом та інкубували протягом 2 хвилин при кімнатній температурі. Потім їх промивали дистильованою водою, висушували та забарвлювали за Романовським-Гімза та витримували 2-5 хвилин.

В препаратах з культур, отриманих на цитоцентрифузі і забарвлених за Романовським-Гімзою, оцінювали клітинний склад культивованих клітин. Щоб проаналізувати статус проліферації/диференціювання, клітини класифікували у наступні підтипи: бластні форми, ранні гранулоцити, пізні гранулоцити, макрофаги. Проводили облік клітин (n=100-150) та рахували відсотковий вміст різних субтипів клітин. Морфологічний аналіз препаратів проводили під світловим мікроскопом при збільшенні x900 за обліком клітин різного ступеня зрілості, які формували колонії.

У разі переважання в препаратах клітин мієлоїдного напрямку диференціювання різного ступеня зрілості, але з переважанням проліферуючих клітин, трансплантат оцінюють як високоефективний, який здатен забезпечити відновлення кровотворення.

В той же час макрофагальна експансія, незважаючи на велику кількість клітин в клонах, свідчить про згасання кровотворення, відсутність чи падіння відновлюючого потенціалу, а в зв'язку з чим констатують недоцільність використання продукту з такими характеристиками в якості трансплантату.

1.5. Метод екзогенного селезінкового колонієутворення

Метод полягає в тому, що при введенні клітинних суспензій із кісткового мозку летально опроміненим імунологічно сумісним реципієнтам у їх селезінці утворюються видимі на око колонії. Родоначальниками цих колоній є одиничні клітини, здатні до розмноження і утворення клону.

Доза опромінення мишей-реципієнтів зазвичай підбирається індивідуально залежно від лінії використовуваних тварин і характеристик

застосовуваного джерела іонізуючого випромінювання і може коливатися у широких межах (від 7 до 13 Гр). Зазвичай мишей опромінюють у дозі, при якій загибель контрольних тварин не перевищує 30 % за 8 діб. У даному дослідженні доза опромінення для мишей лінії СВА становила 9,6 Гр.

Кількість внутрішньовенно трансплантованих кровотворних клітин підбирали із такого розрахунку, щоб кількість колоній становила 10-20 на селезінку. Вводили 0,5 мл суспензії клітин кісткового мозку в латеральну вену хвоста через добу після опромінення. Життєздатність клітин визначали загальноприйнятим методом із застосуванням трипанового синього.

Для візуального підрахунку кількості колоній мишей-реципієнтів забивали на 7-8 та на 11-12 добу після трансплантації клітин. Виймали селезінки, фіксували їх протягом 2 год. у рідині Буена (насиченого розчину пікринової кислоти 30 мл, 10 % нейтрального формаліну 10 мл, льодяної оцтової кислоти 2 мл), після чого підраховували селезінкові колонії. Для підрахунку використовували бінокулярну лупу. Кажучи про складність даних, отриманих методом селезінкових колоній, слід підкреслити і той момент, що, імовірно, мікроскопічні колонії продукуються більш зрілою субпопуляцією попередників.

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

1.6. Математичне моделювання процесу кровотворення

Основу нашої стохастичної моделі становитиме схема кровотворення, запропонована Чертковим І. Л. та ін., 1976, 2002, з урахуванням думки, що розділення мегакаріоцитопоезу і еритропоезу від СКК йде, ймовірно через стадію біпотентних еритроїдно-тромбоцитарних попередників [49].

Враховуючи викладене вище і зауваження до раніше запропонованих моделей, пропонується наступна стохастична модель кровотворення. Вона базується на твердженні про те, що кровотворення в організмі підтримують СКК, закладені в ембріогенезі у m_0 джерелах, які витрачаються із цих джерел послідовно.

Для спрощення моделі обмежимося розглядом кровотворення як процесу утворення лімфоцитів, гранулоцитів, моноцитів, тромбоцитів і еритроцитів. З кожного джерела, незалежно один від одного, через випадкові проміжки часу з показниковим розподілом до кровотворної системи надходять СКК (називатимемо їх клітинами типу C_1), які готові до виконання функцій кровотворення.

Цікаво відзначити, що сформульована вище стохастична модель надходження клітин типу C_1 (стовбурових кровотворних клітин, СКК) до кровотворної системи еквівалентна, з точки зору математичного моделювання, схемі підтримки самооновлення та диференціювання стовбурових клітин асиметричним поділом, з допомогою якого стовбура клітина дає початок двом неоднаковим клітинам: одна займає ту ж нішу, що й батьківська стовбура клітина, інша приступає до диференціювання. Відповідна стохастична модель надходження СКК до кровотворної системи має такий вигляд.

Середню тривалість інтервалів, через які поступають СКК у систему кровотворення з кожного джерела, позначатимемо через τ_0 . Одиницею виміру τ_0 вважатиметься доба. Джерела надходжень СКК до кровотворної системи будемо ототожнювати із клітинами типу C_0 . Клітину типу C_0 назвемо ембріональною стовбуровою клітиною (ЕСК). Кожна з m_0 клітин типу C_0 , незалежно від інших клітин у кінці свого генераційного циклу, тривалість якого є випадковою величиною з показниковим розподілом, здійснює асиметричний поділ на дві клітини. Одна з клітин є клітиною типу C_0 , друга клітина є клітиною типу C_1 . При цьому середня тривалість

генераційного циклу клітини типу C_0 дорівнює τ_0 . Як далі буде показано, така схема надходження клітин типу C_1 до кровотворної системи забезпечує існування стаціонарного режиму кровотворення у математичній моделі кровотворення без припущення рівності ймовірностей самовідновлення та диференціювання у стохастичній моделі кровотворення. До речі, така можливість асиметричного поділу стовбурової клітини при побудові стохастичної моделі кровотворення у роботі Korn (1973) не була врахована.

Кожна з клітин типу C_1 у кінці свого генераційного циклу, незалежно від інших клітин, з ймовірністю p самовідновлюється, ділячись на дві клітини типу C_1 , а з ймовірністю $d=1-p$ диференціюється, ділячись на дві клітини типу C_2 , які вже зробили перший крок комітування.

Виходячи з того, що далі будемо припускати існування імовірнісного механізму вибору клітинами-попередниками різних гілок кровотворення, природно припускати існування кількох стадій диференціювання клітин-попередників. Будемо виходити з того, що є r стадій диференціювання. За рахунок самовідновлення на кожній стадії чисельність клітин-попередників зростає, а при їх великій кількості імовірнісний механізм диференціювання клітин у різні гілки кровотворення забезпечуватиме з певною точністю практично детермінований їх розподіл. Тому далі вважатимемо, що кожна клітина типу C_i , $i=2,3,\dots,r-1$, у кінці свого генераційного циклу, незалежно від інших клітин з ймовірністю p самовідновлюється, ділячись на дві клітини того ж типу C_i , а з ймовірністю $d=1-p$ диференціюється, ділячись на дві клітини типу C_{i+1} .

Надалі будемо припускати, що подія диференціювання клітини і подія вибору клітиною певної гілки кровотворення при диференціюванні є стохастично незалежними подіями, тому за визначенням ймовірність одночасного здійснення подій диференціювання і вибору певної гілки кровотворення дорівнює добутку ймовірностей відповідних подій.

Виходячи з цього, клітина типу C_r , незалежно від інших клітин, у кінці свого генераційного циклу з ймовірністю p самовідновлюється, ділячись на дві клітини типу C_r , і з ймовірністю $d = 1 - p$ диференціюється, ділячись на дві клітини, вибираючи лімфоїдну гілку кровотворення з ймовірністю α або з ймовірністю $1 - \alpha$, вибираючи міелоїдну гілку кровотворення. Тобто, клітина типу C_r з ймовірністю $d(1 - \alpha)$ ділиться на дві клітини типу N (клітина типу N є клітиною-попередником мієлопоезу) або з ймовірністю $d\alpha$ ділиться на дві клітини типу L_1 (клітина типу L_1 є клітиною-попередником лімфопоезу).

Таким чином у нашій схемі кровотворення клітини типу C_r є клітинами-попередниками гемопоезу.

Надалі для спрощення моделі припускатимемо, що тривалість генераційного циклу усіх типів клітин, які розглядаються, є випадковою величиною з показниковим розподілом. Для спрощення далі також вважатимемо, що середня тривалість генераційних циклів усіх типів клітин, які розглядатимуться у схемі, є однаковою і дорівнює τ_1 . Одиницею вимірювання τ_1 є доба. Відхилення від цього припущення будуть зазначатися окремо.

2 РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1. Динаміка росту культивованих стромальних клітин кісткового мозку у фідерному шарі

Джерелом клітин для отримання фідерних шарів слугував кістковий мозок мишей лінії СВА. На першому етапі експлантацію клітинної суспензії в культуральний флакон здійснювали без підрахунку кількості клітин. Таким чином, проводили свого роду селекцію клітин, які володіють якнайкращою здатністю до адгезії і селективно прикріплюються до дна культурального планшета. Проведена через добу заміна частини культурального середовища, з видаленням неадгезованих елементів, дозволяла довести щільність клітин до оптимальної, з тим, щоб отримати сформований первинний моношар за 7-10 днів.

На 3-4-ий день культивування спостерігалася активна проліферація фібробластоподібних клітин на дні культурального планшета з формуванням моношару до 7-10-ої доби. При наступному пасажі ми підраховували кількість клітин в зібраній суспензії і здійснювали посадку в концентрації 1×10^5 клітин в мл в шестилункові планшети фірми Nunc. Така щільність клітин є найбільш ефективною для формування фідерного шару в тижневий термін.

Для повноцінного функціонування фібробластоподібних клітин у культурі *in vitro* потрібна їх метаболічна активність, пов'язана з продукцією ростових факторів. В той же час, зупинка проліферації необхідна, оскільки відомий факт пригнічення кровотворення активно проліферуючими стромальними клітинами. На даний час інактивацію мітотичної активності клітин стромального шару проводять шляхом опромінення або, як альтернативу, використовують з цією метою Мітоміцин-С [66]. За результатами нашого дослідження, обробка моношару фібробластоподібних клітин Мітоміцином-С у концентрації 2 мкг/мл впродовж 2 годин при 37°C,

не позбавляє клітини метаболічної активності, а лише притримує їх проліферацію.

2.2. Кінетика формування клітинних агрегатів з кісткового мозку мишей у культурі з напіврідким агаром *in vitro*

Для встановлення оптимального терміну культивування кровотворних клітин-попередників мишей лінії СВА в умовах *in vitro* культивували кістковий мозок тварин у гелевих дифузійних камерах на стромальних фідерних шарах. Кожні 24 години підраховували кількість клітинних агрегатів під інвертованим мікроскопом.

В камерах спостерігали кластери та колонії компактного і дифузного типу. Кластери (рис. 2.1) являють собою агрегати, до складу яких входить не більше 40 клітин. Їх наявність у культурі свідчить про те, що клітина-попередник потрапила до дифузійної камери на пізніх етапах свого диференціювання або (якщо це перші дні культивування) кластер ще не встиг перерости у колонію [67]. При встановленні колонієутворюючої активності кісткового мозку кількість кластерів не береться до уваги.

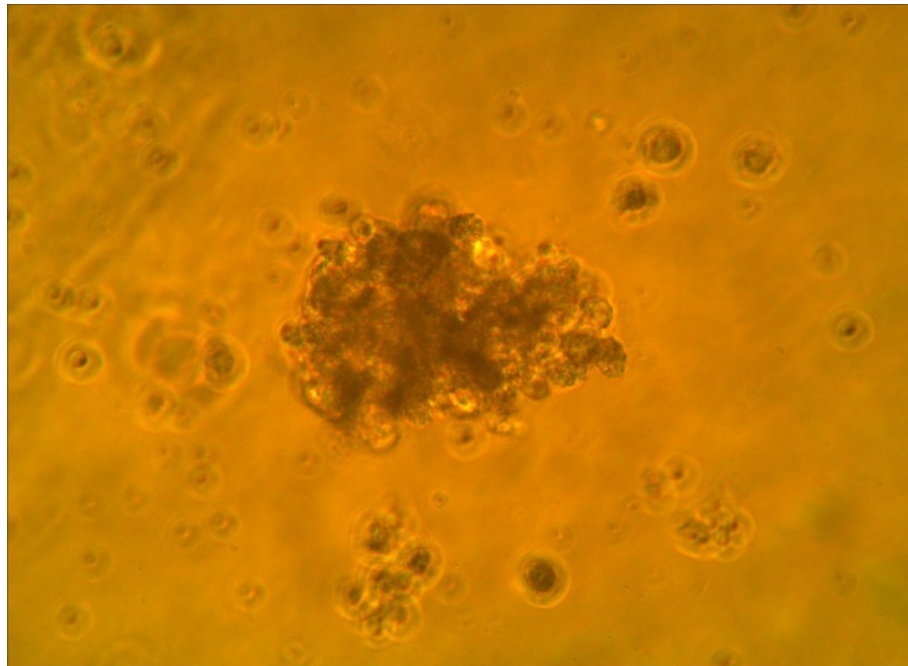


Рис. 2.1. Гранулоцито-макрофагальний кластер. Збільшення 200х.

Гранулоцито-макрофагальні колонії компактного типу (рис. 2.2) являють собою клітинні агрегати, до складу яких входить від 40 до 80 клітин, що щільно прилягають одна до одної. Їх наявність у культурі свідчить про те, що до дифузійної камери потрапили більш ранні моноклеари, які дали початок великій кількості клітин і далі продовжують свою проліферацію [67].

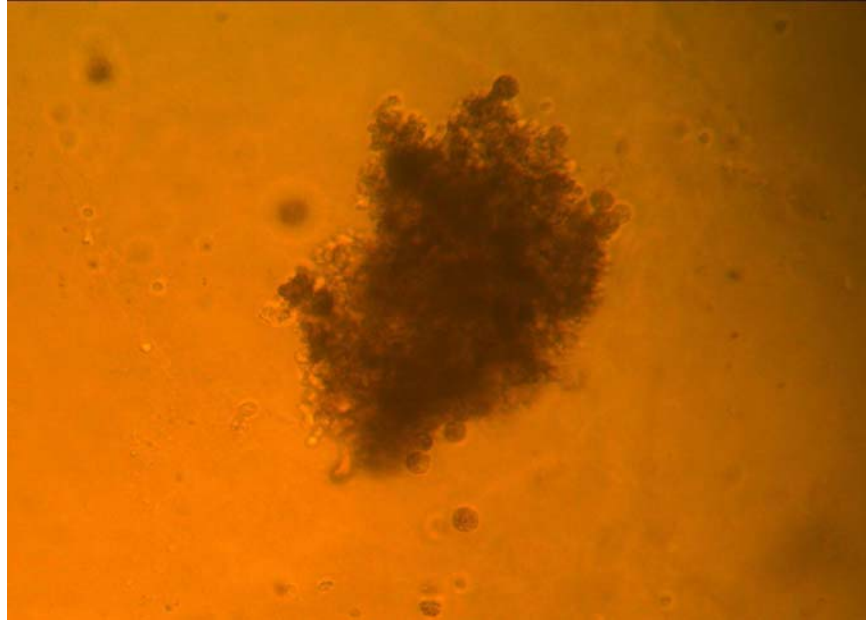


Рис. 2.2. Гранулоцито-макрофагальна колонія компактного типу. Збільшення 400х.

Колонії дифузного типу (рис. 2.3) являють собою агрегати, в яких кількість клітин може становити від 40 до 100 в залежності від стадії дозрівання гемопоетичної клітини-попередника, яка утворила цю колонію. Тут клітини-попередники припиняють проліферувати, завершують дозрівання, перетворюються на макрофаги та поступово розходяться по всьому об'єму камери [67].

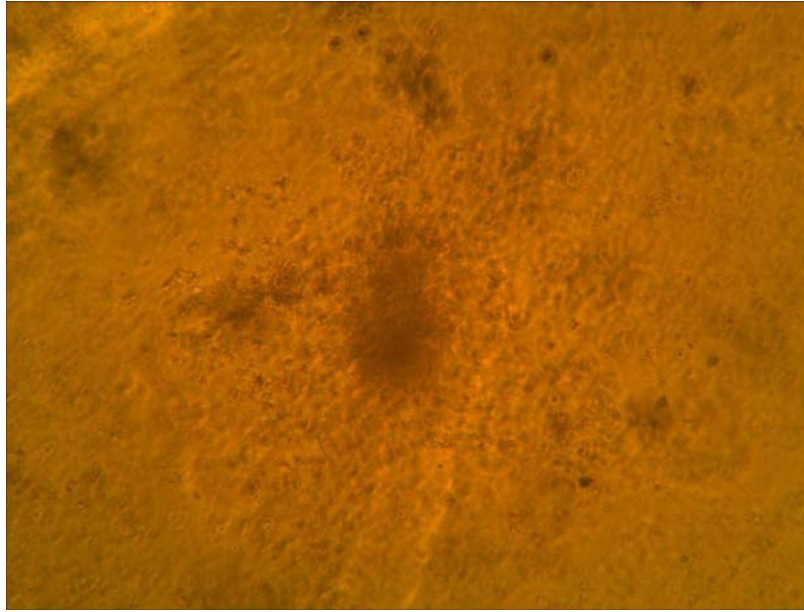


Рис. 2.3 Гранулоцито-макрофагальна колонія дифузного типу. Збільшення 200х.

Результати обліку кількості колонієутворюючих одиниць показали, що в дифузійній камері в умовах *in vitro* проліферація починається вже на 3-тю добу культивування, коли з'являються перші кластери (табл. 2.1). Починаючи з 6-7-ї доби кількість кластерів поступово зменшується паралельно до збільшення кількості колоній і на 11-й день складає 20 % від загальної кількості колоній обох типів.

На 6-ту добу культивування активність проліферації суттєво збільшується, про що свідчить поява перших колоній компактного типу. Їх максимальна кількість з'являється на 11-ту добу культивування і становить $28,3 \pm 1,4$ колоній на 10^5 експлантованих клітин.

Вже починаючи з 8-ї доби культивування деякі клітини-попередники вичерпують свій проліферативний потенціал і перетворюються на колонії дифузного типу. Починаючи з 12-ї доби колонії-клони компактного типу поступово переходять в гранулоцито-макрофагальні колонії дифузного типу.

**Залежність числа колоній, що утворились у дифузійних камерах,
від доби культивування**

Доба культивування	Кількість кластерів	Кількість колоній компактного типу	Кількість колоній дифузного типу
1	0	0	0
2	0	0	0
3	6,3±0,6	0	0
4	15,3±1,2	0	0
5	38,8±2,7	0	0
6	36,5±4,1	15,3±1,4	0
7	32,7±2,3	20,0±3,2	0
8	27,3±1,6	23,1±0,9	4,5±2,2
9	23,5±3,2	25,3±3,1	6,8±1,7
10	20,4±4,1	26,5±4,2	7,3±3,3
11	18,4±1,4	28,3±1,4	8,2±4,1
12	15,1±3,6	23,0±4,3	14,2±3,7
13	10,4±4,6	18,7±5,6	20,4±1,9
14	6,3±5,3	9,6±1,6	28,2±3,1

Отже, оптимальним строком для культивування кровотворних клітин-попередників мишей в умовах *in vitro* є 11-та доба. Саме в такий строк ГСК миші здатні утворити максимальну кількість колоній компактного типу у напіврідкому агаровому середовищі.

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

Використання стромального фідерного шару дозволяє відтворити в культурі необхідну для гемопоезу комбінацію розчинних цитокінів і факторів росту. Досліджувані суспензії кістковомозкових клітин культивували протягом 4 тижнів у дифузійних камерах на фідерних шарах. У контрольному варіанті клітини культивували у порожнині дифузійної камери

за відсутності фідерного шару (без фідера). На кожному етапі експерименту, на 2-му, 3-му і 4-му тижнях, оцінювали зміни в середніх кількостях ЯВК у дифузійних камерах і визначали їх клоногенну активність.

Аналіз результатів 28-добового культивування суспензії мононуклеарів, отриманих з КМ, показав, що у культурах дифузійних камер на стромальних фідерних шарах підтримується гемопоез. Оцінка його ефективності проводилась на 7-му, 14-ту, 17-ту, 21-шу і 28-у добу. У ці дні вилучали камери, визначали кількість клітин і оцінювали їх життєздатність за забарвленням мертвих клітин трипановим синім чи еозином. У всіх випадках життєздатність виявилась високою і знаходилась у інтервалі від 88 до 98 живих клітин проти від 2 до 12 мертвих. Частину клітин використовували для приготування препаратів, частину – для наступного культивування у напіврідкому агарі. Ми звернулися до цієї культури враховуючи той факт, що гемопоетичні клітини-попередники в разі їх повноцінності повинні через два тижні утворити колонії-клони. Їх наявність у цей термін свідчить про те, що гемопоез у попередній культурі справді підтримується.

Результати обліку колоній-клонів у агарових культурах КМ представлено в табл. 2.2.

Таблиця 2.2

**Порівняльний ріст клітин-попередників кісткового мозку
у напіврідкому агарі в культурі клітин *in vitro***

Доба культивування	Кількість колоній у культурі КМ на 1×10^5 посаджених клітин
1	0
7	$20,0 \pm 3,2^*$
14	$37,8 \pm 2,4^*$
17	$12,8 \pm 2,4^*$
21	$31,0 \pm 1,3^*$
28	$11,4 \pm 2,2^*$

Примітка: * – відмінності між порівнюваними показниками статистично вірогідні ($P < 0,05$)

Варто звернути увагу на те, що на 17-й день культивування спостерігалось пригнічення колонієутворюючої активності. Цей термін співпадає з моментом, коли колонії стають дифузними, і клітини мігрують від зони проліферації так далеко, що колонії перестають існувати. Здавалось би, на цьому було варто закінчити експеримент. Але ми його продовжили ще на одинадцять днів, знімаючи результати на 21-й і 28-й день. На 21-й день культивування для КМ ЕКУ дорівнювала $31,0 \pm 1,3$ на 1×10^5 експлантованих клітин.

Новий сплеск колонієутворення може бути пов'язаним з формуванням більш ранніх колоній, ніж попередні. Подібну ситуацію можна спостерігати у процесі колонізації селезінки летально опромінених мишей за Till і McCulloch (1963), коли колонії, які виникли на 11 день, зникають, а на 16-й день з'являються нові. Пояснення цьому феномену дослідники знаходять у гетерогенності клітин-попередників, які формують колонії, залежно від їхнього віку. Більш примітивні попередники починають проявляти проліферативну активність пізніше, ніж ті, що ієрархічно знаходяться ближче до морфологічно ідентифікованих клітин. Проводячи таку паралель, можна припустити, що у нашому випадку склалася така ж ситуація, коли спочатку колонії формувалися більш „зрілими” клітинами-попередниками, а пізніше – більш примітивними. Ця думка підтверджується тим, що кровотворні попередники з обох джерел вели себе ідентично, тобто тенденція у обох випадках була така ж сама, хоча ефективність колонієутворення була різною.

Таким чином, фібробластоподібні клітини строми кісткового мозку є ефективним субстратом для підтримки кровотворення *in vitro* з чисельною експансією мієлоїдних клітин-попередників.

Аналіз морфологічних характеристик культивованих клітин при наступному культивуванні у напіврідкому агарі показує, що клітини, які складають колонії, під інвертованим мікроскопом без забарвлення не можуть бути ідентифікованими, тобто, кількість отриманих колоній-клонів не відображає істинного стану культури. Склад клітин, які формують майбутній

трансплантат, різний, і залежить від умов, в яких культивувалися клітини. Тому, щоб запобігти помилки, для визначення наявності стовбурових гемопоетичних клітин та їх клітин-попередників в культурі, слід не обмежуватись кількісним аналізом клонів.

Якщо об'єднати у групу міелоїдні гемопоетичні клітини, що проліферують (бластні, промієлоцити, мієлоцити і метамієлоцити та інші) і протиставити їх кількості макрофагів, що не є джерелом відродження кровотворення, то виявиться, що в культивованих зразках, в залежності від умов зберігання і культивування, спостерігається різна картина.

Саме вивчення співвідношення кількості міелоїдних до макрофагальних клітин в колоніях-клонах дозволить об'єктивно оцінювати якість потенційного трансплантату. Заявлене співвідношення кількості таких клітин є оптимальним у зв'язку з тим, що у разі зміни співвідношення у сторону збільшення макрофагальної експансії, наприклад, 4 : 2, 4 : 3 та інших, падає здатність культурального матеріалу відновлювати гемопоез. А уявити собі культуру, в якій зовсім немає макрофагів, неможливо.

Однак аналіз морфологічних характеристик культивованих клітин після тривалого культивування (5 тижнів) показав, що кількість отриманих завдяки культивуванню клітин без урахування їх якісного складу не відображають істинного стану культури. Якщо бластні клітини, промієлоцити, мієлоцити і мета мієлоцити об'єднати в групу проліферуючих гемопоетичних клітин і протиставити їх кількості макрофагів, то виявиться, що склад клітин, які складають майбутній трансплантат різний і залежить від умов, у яких накопичувались клітини. Механізми диференціювання їх у визначених напрямках ще до кінця не зрозумілі (Хешлер). Тому оцінка майбутнього трансплантата на його перспективність, а саме, ефективність відновлення гемопоезу є на сьогодні надзвичайно важливою. Обраний нами шлях полягає у вилученні невеликої кількості клітин з супернатанту клітинних культур і разом з кількісною оцінкою і виявленням колонієутворюючої здатності у напіврідкій культурі *in vitro* визначенням

морфології культивованих клітин. В разі переважання в продукті проліферуючих гемопоетичних форм мова може йти про високоефективний трансплантат, який забезпечить відновлення кровотворення. В той же час макрофагальна експансія, не зважаючи на велику кількість клітин в культурі, свідчить про згасання кровотворення, відсутність чи падіння відновлюючого потенціалу, а в зв'язку з чим недоцільності використання продукту з такими характеристиками в якості трансплантату.

Дослідження гемопоетичних стовбурових клітин є складним через відсутність підходящих оцінювальних культуральних систем. Вперше система довготривалого культивування була описана Dexter і співавт., які показали, що така культуральна система відтворює багато особливостей впливу мікрооточення. Довгострокове підтримання життєдіяльності СК у культурі гемопоетичних клітин є головною перевагою даної культуральної системи. Її нормальне функціонування забезпечує реалізацію функцій комітованих клітин-попередників, що веде за собою формування клітинного пулу дозріваючих та зрілих клітин.

2.4. Аналіз результатів дослідження селезінкового колонієутворення у летально опромінених мишей

Запропонований у 1961 р. Till, McCulloch метод для виявлення клоногенних гемопоетичних клітин дозволив довести існування у кровотворній тканині класу поліпотентних, здатних до самопідтримки стовбурових кровотворних клітин-попередників (СКК), що дають початок всім гілкам гемопоезу. Показано, що стовбурові кровотворні клітини, які містяться у гемопоетичній тканині, при введенні летально опроміненим мишам-реципієнтам утворюють у їх селезінці макроскопічні видимі скупчення кровотворних клітин. При цьому кожна колонія є клоном, тобто потомством однієї клітини – колонієутворюючої одиниці у селезінці (КУОс).

Описаний експериментальний підхід до цього часу є основним при вивченні властивостей і механізмів регуляції стовбурових кровотворних клітин. Популяція СКК гетерогенна. Окремі представники цього класу відрізняються один від одного за своїм проліферативним потенціалом. Інтерпретація даних, отриманих при вивченні властивостей СКК та механізмів їх регуляції методом визначення КУОс, ускладнюється тим, що поряд із поліпотентними кровотворними клітинами властивістю утворювати селезінкові колонії володіють і комітовані, нездатні до самопідтримки клітини-попередники. Так, показано, що більша частина поверхневих селезінкових колоній, облік яких проводять на 7-8 добу після трансплантації гемопоетичних клітин, утворюється не із поліпотентних, здатних до самопідтримки кровотворних клітин-попередників, а із комітованих попередників, колонії яких незабаром зникають (через 72 год.). У той же час поліпотентні попередники дають початок колоніям, які рееструють в основному на 11-12 добу після трансплантації.

Для перевірки факту перспективності чи неперспективності клітинного матеріалу для відновлення гемопоезу в експерименті використовували традиційну модель врятування смертельно опромінених мишей ін'єкцією культивованих клітин, оцінених в результаті додаткового короткострокового культивування кісткового мозку миші у напіврідкому агарі, підрахунком колоній і визначенням їх якісного складу під світловим мікроскопом.

В табл. 2.3. наведені результати порівняльного аналізу двох культур кісткового мозку, функціональна оцінка яких відбувалася з урахуванням морфологічного аналізу внутрішнього складу колоній.

Приведені результати виживаності мишей після ін'єкцій трансплантату з переважною кількістю мієлоїдних клітин (1-а серія) та з переважною кількістю макрофагальних клітин (2-а серія).

Порівняльний аналіз результатів функціональної оцінки культур кісткового мозку, з урахуванням морфологічного аналізу внутрішнього складу колоній

Групи порівняння	Показники кістковомозкового колонієутворення		Виживаність мишей після ін'єкції клітин	Кількість ЕКУ на селезінку
1-а серія	Кількість колоній (ЕКУ*) 55,0±1,2		17/20	23-25
	Якісний склад колоній			
	Мієлоїдні клітини 80 %	Макрофаги 20 %		
2-а серія	Кількість колоній (ЕКУ) 53,2±0,9		2/20	0-1
	Якісний склад колоній			
	Мієлоїдні клітини 10 %	Макрофаги 90 %		

Як свідчать приведені результати, саме трансплантат, у якому, згідно із заявленим способом, виявлена переважна кількість мієлоїдних клітин (у 4 рази, порівняно з кількістю макрофагальних клітин) виявився високоефективним, здатним відновити гемопоез – виживають 17 із 20-ти смертельно опромінених мишей.

Таким чином, перевагою отриманого в результаті досліджень способу є можливість об'єктивної оцінки потенційного трансплантату стовбурових гемопоетичних клітин та їх найближчих нащадків і, як наслідок, відбір якісного трансплантаційного матеріалу, здатного до ефективного відновлення гемопоезу, що забезпечить успішне використання заявленого

способу як у наукових цілях, так і у практичній медицині – для лікування хворих широкого кола захворювань.

2.5. Математична модель функціонування системи кровотворення

Зауважимо, що у нашій стохастичній моделі кровотворення імовірнісні механізми вибору напрямку диференціювання та величини імовірностей виходу клітин з відділу стовбурових клітин у певній мірі відповідає механізмам самоорганізації відділу стовбурових клітин, його якісного та кількісного складу в стохастичних моделях організації стовбурових клітин, запропонованих в роботах Roeder I. зі співавт. [63, 64, 65].

Випадковий процес, що визначає в кожний момент часу кількість клітин усіх типів, які самопідтримуються і диференціюються за описаною вище стохастичною моделлю функціонування системи кровотворення, є випадковим марківським гіллястим процесом [68] із $r + m_1 + m_2 + m_3 + m_4 + m_5 + 4$ типами клітин, тобто цей процес описує чисельність усіх гілок гемопоезу: відділ стовбурових клітин (клітин типів C_1, C_2, \dots, C_r), мультіпотентних клітин (клітин типу N), біпотентних клітин (клітин типів GE і ET) та клітин гранулоцитарної (клітин типів G_1, G_2, \dots, G_{m_1}), моноцитарної (клітин типів M_1, M_2, \dots, M_{m_2}), тромбоцитарної (клітин типів T_1, T_2, \dots, T_{m_3}), еритроїдної (клітин типів E_1, E_2, \dots, E_{m_4}) та лімфоїдної (клітин типів L_1, L_2, \dots, L_{m_5}) гілок кровотворення.

Користуючись теорією випадкових марківських гіллястих процесів із скінченим числом типів клітин [68] при аналізі випадкового процесу, що описує запропоновану стохастичну модель функціонування системи кровотворення, приходимо до висновку, що стаціонарний (стабільний) режим кровотворення, який характеризується незмінністю у часі середньої чисельності клітин усіх типів, можливий при сформульованих вище

припущеннях за умови, коли ймовірність диференціювання клітини більша за ймовірність її самовідновлення, тобто коли виконується умова

$$d > p, \quad d + p = 1$$

У тому випадку, коли не виконується умова (1) і $p = d = 1/2$ середня чисельність клітин кожного типу з часом зростає із степеневою швидкістю, а при $p > d$ середня чисельність кожного типу клітин зростає із показниковою швидкістю і ця швидкість буде максимальною при $p = 1, d = 0$. Такі режими роботи кровотворної системи можуть реалізовуватися при відновленні її нормальної роботи після опромінення організму з наступним переходом до стаціонарного (стабільного) режиму.

Запровадимо такі позначення. Через $MC_i, i = 1, 2, \dots, r$ позначатимемо середнє число клітин типу C_i , через MN – середнє число клітин типу N , через MTE – середнє число клітин типу TE , через ML_i – середнє число клітин типу $L_i, i = 1, 2, \dots, m_5$, через MGM – середнє число клітин типу GM , через MG_i – середнє число клітин типу $G_i, i = 1, 2, \dots, m_1$, через MM_i – середнє число клітин типу $M_i, i = 1, 2, \dots, m_2$, через MT_i – середнє число клітин типу $T_i, i = 1, 2, \dots, m_3$, через ME_i – середнє число клітин типу $E_i, i = 1, 2, \dots, m_4$.

При виконанні умови (1) на основі розвинутої теорії гіллястих випадкових процесів [68] дістаємо співвідношення між середніми числами клітин найближчих типів і відповідні формули для їх обчислення через модельні параметри стохастичної моделі системи кровотворення.

Спочатку, відповідно до описаної вище стохастичної моделі функціонування системи кровотворення, виписується система диференційних рівнянь для середніх чисел кожного типу клітин у системі кровотворення. Із отриманої системи диференційних рівнянь за умови рівності нулеві похідних від середнього числа кожного типу клітин отримуємо систему алгебраїчних рівнянь для середнього числа кожних типів клітин при стаціонарному режимі кровотворення, коли $d > p$. Отримані рівняння визначають кількісні залежності між середніми чисельностями

клітин найближчих типів. Розв'язуючи отриману систему алгебраїчних рівнянь, дістаємо формули для обчислення середнього числа клітин усіх типів через модельні параметри стохастичної моделі системи кровотворення.

Зупинимось на формулах для середніх величин, що описують еритроїдну гілку кровотворення. Для середнього числа клітин-попередників кровотворення MC_i , $i=1,2,\dots,r$, дістанемо такі формули:

$$MC_1 = \frac{\tau_1 m_0}{\tau_0 d - p},$$

$$MC_i = \frac{2d}{d-p} MC_{i-1} = \frac{\tau_1 m_0}{\tau_0 d - p} \left(\frac{2d}{d-p} \right)^{i-1}, \quad i = 2, 3, \dots, r$$

Для середнього числа клітин-попередників мієлопоезу MN має місце така формула:

$$MN = (1-\alpha) \frac{2d}{d-p} MC_r = (1-\alpha) \frac{\tau_1 m_0}{\tau_0 d - p} \left(\frac{2d}{d-p} \right)^r.$$

Для середнього числа клітин-попередників еритроцитів і тромбоцитів MTE має місце така формула:

$$MTE = (1-\beta) \frac{2d}{d-p} MN = (1-\alpha)(1-\beta) \frac{\tau_1 m_0}{\tau_0 d - p} \left(\frac{2d}{d-p} \right)^{r+1}$$

Для середнього числа клітин еритропоезу ME_i , $i=1,2,\dots,m$, маємо такі формули:

$$ME_1 = (1-\gamma) \frac{2d}{d-p} MTE = (1-\alpha)(1-\beta)(1-\gamma) \frac{\tau_1 m_0}{\tau_0 d - p} \left(\frac{2d}{d-p} \right)^{r+2}$$

$$ME_i = \frac{2d}{d-p} ME_{i-1} = (1-\alpha)(1-\beta)(1-\gamma) \frac{\tau_1 m_0}{\tau_0 d - p} \left(\frac{2d}{d-p} \right)^{r+i+1}$$

$$, i=2, \dots, m_4-1,$$

$$ME_{m_4} = \frac{2d\tau_N}{\tau_1} ME_{m_4-1} = (1-\alpha)(1-\beta)(1-\gamma) \frac{\tau_E}{\tau_0} m_0 \left(\frac{2d}{d-p} \right)^{r+m_4+1}$$

Формули (2) – (8) ілюструють кількісні взаємозв'язки різних гілок кровотворення та їх стадій диференціювання. Кількісні показники еритроїдної гілки кровотворення виражені через параметри стохастичної моделі кровотворення, які мають конкретну біологічну трактовку. Формули для середніх величин інших гілок кровотворення отримуються аналогічно.

У даній роботі запропоновано математичну модель функціонування кровотворної системи, яка базується на сучасних позиціях клітинних основ кровотворення та на відповідній стохастичній моделі гемопоезу. Запропонована стохастична модель та її математична інтерпретація стала черговим кроком до створення детальної та реальної схеми і моделі кровотворення. Вона ілюструє закономірності співвідношення процесів проліферації і диференціювання на кожному етапі кровотворення і може стати підґрунтям для прогнозування змін у кількості клітин при стаціонарному режимі та при певних впливах на систему гемопоезу.

Дослідження такої моделі сприятиме глибшому розумінню процесів проліферації та диференціювання у кровотворній тканині і тих програм, що забезпечують збалансовану проліферацію та диференціювання кровотворних клітин при стабільному стані та під час регенерації після збурюючих впливів.

Дана математична модель деталізує уявлення про роботу системи крові та може ініціювати нові напрямки досліджень у експериментальній гематології.

УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

Врятувати хворого на лейкемію на сьогодні можна тільки завдяки трансплантації стовбурових гемопоетичних клітин. Смертність після цієї процедури з урахуванням багатьох факторів складає 45-50 %. Результати проведених досліджень, що лягли в основу розробки способу оцінки майбутнього трансплантату, дозволяють збільшити вірогідність успіху трансплантації та можуть надати шанс на виздоровлення багатьом безнадійно хворим.

Проблема вдалої трансплантації залежить від кількох факторів: стану пацієнта, його віку, стадії хвороби, вибраної гемопоетичної тканини, якої часто не вистачає. Необхідність збагачення майбутнього трансплантату стовбуровими клітинами спонукає використовувати культуральні підходи, які дозволяють отримати необхідну масу клітин. На жаль, спосіб оцінки їх за морфологічними ознаками не задовольняє дослідника оскільки не дає інформації про функціональну активність культивованих клітин. Тому використання додаткового культивування збагаченої популяції клітин у напіврідкому агарі з метою отримання колоній клітин-попередників є адекватним способом оцінки потенційного трансплантату. Проте в наших дослідженнях виявилось, що не тільки кількість, але й якість колоній-клонів має бути врахована.

Проведені нами дослідження передбачали, в першу чергу, пошук способу накопичення та оцінки стовбурових гемопоетичних клітин та їх найближчих нащадків з метою подальшого застосування у якості трансплантату. В ході досліджень було визначено оптимальні умови для культивування клітин, зокрема, створення підтримуючого фідерного шару, підбір чинників для успішної експансії кровотворних клітин *in vitro* та морфофункціональний аналіз отриманих клітин. Зокрема, було проведено підбір умов вилучення стромальних клітин кісткового мозку лабораторних тварин, удосконалено методи їх культивування та мітотичної інактивації для

отримання фідерного шару. Після цього здійснювався морфологічний і функціональний аналіз культивованих клітин.

У ході проведених досліджень було розроблено нову клітинну технологію, яка дозволяє оцінити якість культивованих стовбурових гемопоетичних клітин. Так, відомий спосіб оцінки потенційного трансплантату, який полягає у визначенні кількісного і якісного складу формених елементів кісткового мозку з підрахунком різних типів гемопоетичних клітин [69]. Відповідно до цього, клітини кісткового мозку перевіряються на життєздатність завдяки суправітальному забарвленню, наприклад, трипановим синім, а далі готують мазки, забарвлюють за Романовським-Гімзою і проводять їх морфологічний аналіз під світловим мікроскопом. При цьому трансплантат вважають перспективним, якщо в ньому виявлена переважна кількість життєздатних, морфологічно збережених гемопоетичних клітин. Недоліком такого способу є суб'єктивність міркувань. Крім того, його можливості обмежені візуальною оцінкою картини сукупності клітин кісткового мозку, яка не дає змоги розкрити функціональний потенціал отриманих клітин. Цілком очевидна недостатність тільки морфологічного вивчення гемопоетичних клітин. Саме функціональні методи дослідження клітин дозволяють оцінити їх проліферативні і диференційні потенції.

Найбільш цінними у цьому напрямку виявились методи клонування *in vitro* кровотворних гемопоетичних клітин. Загальною відмітною рисою цих методів є посів гемопоетичних клітин у таку культуральну систему (живильне середовище з гелеутворюючою речовиною), де клітини активно розмножуються, а їх нащадки виявляються локалізованими і доступними візуальному спостереженню. Так, відомий спосіб культивування гемопоетичних клітин з кісткового мозку у повному живильному середовищі з напіврідким агаром [70]. У відповідності з цим, після морфологічного вивчення гемопоетичні клітини культивують у рідкому бактоагарі у суворо визначених умовах. В результаті відбувається клональний ріст

гемопоетичних клітин-попередників. Отримані колонії-клони піддають кількісному обліку під інвертованим мікроскопом. Функціональну активність гемопоетичних клітин-попередників оцінюють за кількістю колоній-клонів, які виростають на 10-14-ту добу культивування.

Проте недоліком цього способу є недостатність інформації про шляхи диференціювання гемопоетичних клітин у сформованих клонах, аналіз яких надав би підставу судити про потенції до відновлення кровотворної системи. Сам по собі факт активної проліферації клітин не є показником перспективності культури для отримання на її основі якісного трансплантаційного матеріалу. Проблема полягає в тому, що отримані колонії-клони містять велику кількість мієлоїдних та макрофагальних клітин, останні з яких, як відомо, не є джерелом відродження кровотворення. Тому, переважна більшість саме макрофагальних клітин в колоніях скоріше свідчить про переживання культури, незважаючи на їх зовнішній вигляд, цілісність і активну проліферацію, які можна засвідчити у інвертованому мікроскопі. Звісно, таку культуру не можна вважати перспективною для майбутнього відновлення кровотворення.

Необхідність збагачення майбутнього трансплантату стовбуровими клітинами спонукає використовувати культуральні підходи, які дозволяють отримати необхідну масу клітин. Було виявлено, що не тільки кількість, але й якість колоній-клонів має бути врахована. Тому використання додаткового культивування збагаченої популяції клітин у напіврідкому агарі з метою отримання колоній клітин-попередників є адекватним способом оцінки потенційного трансплантату.

У порівнянні з існуючими, перевагою способу, який було розроблено у результаті проведених нами досліджень, є досягнення високої виживаності тварин після введення збагачених культивуванням стовбурових клітин, оцінених цим способом. Так, використання традиційного способу оцінки потенційного трансплантату призводило до загибелі 25-30 % тварин, а з урахуванням результатів нового способу відсоток загиблих зменшувався

удвічі. В тих випадках, коли трансплантація культивованих клітин летально опроміненим лабораторним тваринам була зроблена з урахуванням якісного складу колоній, і перевага була віддана наявності гранулоцитарних клітин різного ступеня зрілості (а не макрофагальних), результати трансплантацій були особливо вдалимими.

Отже, в результаті проведених досліджень було отримано новий спосіб культивування нащадків стовбурової клітини – гемопоетичних клітин-попередників, було оцінено їх морфофункціональний стан і проліферативний потенціал та надано наукове обґрунтування їх використанню як альтернативного джерела стовбурових клітин в разі алогенної трансплантації пацієнтам із різними патологічними станами; запропоновано математичну модель проліферації самовідновних систем організму.

Новизною в отриманих результатах є можливість об'єктивної оцінки потенційного трансплантату стовбурових гемопоетичних клітин та їх найближчих нащадків і, як наслідок, відбір якісного трансплантаційного матеріалу, здатного до ефективного відновлення гемопоезу.

Розроблено нову клітинну технологію, яка дозволяє оцінити якість культивованих стовбурових гемопоетичних клітин в експерименті на лабораторних тваринах. Вдосконалення умов культивування *in vitro* гемопоетичних клітин-попередників кісткового мозку, підтверджене результатами морфофункціонального аналізу культивованого матеріалу *in vivo*, може бути використано для контролю проліферативної активності та функціонального складу алогенних та аутогенних трансплантатів у клінічній практиці як в Україні, так і за кордоном.

Отримані експериментальні дані можуть бути використані як підґрунтя для розробки протоколів експансії гемопоетичних клітин-попередників у культурі *in vitro* з метою отримання їх достатньої кількості та подальшого застосування в експериментальних і клінічних дослідженнях при трансплантації кісткового мозку.

ВИСНОВКИ

У ході проведених досліджень було розроблено нову клітинну технологію, яка дозволяє оцінити якість культивованих стовбурових гемопоетичних клітин. Вдосконалення умов культивування *in vitro* гемопоетичних клітин-попередників кісткового мозку, підтверджене результатами морфофункціонального аналізу культивованого матеріалу *in vivo*, може бути використано для контролю проліферативної активності та функціонального складу алогенних та аутогенних трансплантатів у клінічній практиці як в Україні, так і за кордоном.

У порівнянні з існуючими, перевагою способу, який було розроблено у результаті проведених нами досліджень, є досягнення високої виживаності тварин після введення збагачених культивуванням стовбурових клітин, оцінених цим способом. Так, використання традиційного способу оцінки потенційного трансплантату призводило до загибелі 25-30 % тварин, а з урахуванням результатів нового способу відсоток загиблих зменшувався удвічі. В тих випадках, коли трансплантація культивованих клітин летально опроміненим лабораторним тваринам була зроблена з урахуванням якісного складу колоній, і перевага була віддана наявності гранулоцитарних клітин різного ступеня зрілості (а не макрофагальних), результати трансплантацій були особливо вдалимими.

Отже, в результаті проведених досліджень було отримано новий спосіб культивування нащадків стовбурової клітини – гемопоетичних клітин-попередників, було оцінено їх морфофункціональний стан і проліферативний потенціал та надано наукове обґрунтування їх використанню як альтернативного джерела стовбурових клітин в разі алогенної трансплантації пацієнтам із різними патологічними станами; запропоновано математичну модель проліферації самовідновних систем організму.

ПЕРЕЛІК ПОСИЛАНЬ

1. Ogawa M. Hemopoietic stem cells: stochastic differentiation and humoral control of proliferation. // *Environ. Health Perspect.* - 1989. - Vol.80.- P.199-207.
2. Kashiwakura I., Takahashi T.A. Fibroblast growth factor and ex vivo expansion of hematopoietic progenitor cells// *Leukemia Lymphoma.* – 2005. –Vol. 46, N 3. – P.329-33.
3. Amsellem S., Pflumio F., Bardinet D., Izac B., Charneau P., Romeo P.-H., Dubart-Kupperschmitt A., Fichelson S. Ex vivo expansion of human hematopoietic stem cells by direct delivery of the HOXB4 homeoprotein// *Nature Medicine.* – 2003. –N 9. - 1423 – 1427.
4. Feng J.F., Zhuang M., Zhu L.J., Sheng Z.L., Zhu Y.Q., Li C.P. Effect of IL-6/sIL-6R on ex vivo expansion of human cord blood derived CD34+ cells// *Ai Zheng.* – 2004. – Vol. 23, N 6. – P. 715-718.
5. Fauber A., Lessard J., Sauvageau G. Are genetic determinants of asymmetric stem cell division active in hematopoietic stem cells?// *Oncogene.*-2004.-№23(43). -P 247-255.
6. Broccoli D., Young J. W., de Lange T. Telomerase activity in normal and malignant hematopoietic cells. -1995, Vol. 92. –P. 9082 - 9086.
7. Anderson D.J., Gage F.H., Weissman I.L. Can stem cells lineage boundaries? // *National Med.*- 2001.- № 7. –P. 393 – 395.
8. Sylvester C. N., Longaker M. T. Stem Cells: Review and Update. // *Arch. Surg.*-2004, Vol. 139. –P.259-267.
9. Verfaillie C. M., Pera M. F. Lansdorf P. M., Stem Cells: Hope and Reality.// *Hematology.*-2002.-P.369-391.
10. Kobari L. et al. CD133⁺ Cell Selection Is an Alternative to CD34⁺ Cell Selection for Ex Vivo Expansion of Hematopoietic Stem Cells// *Journal of gematotherapy & Stem Cell Research.* – 2001. - Vol. 10, No. 2. – P. 273-281.
11. Kashiwakura I., Takahashi T.A. Basic fibroblast growth factor-stimulated ex vivo expansion of haematopoietic progenitor cells from human placental and umbilical cord blood//*The British Journal of Haematology.* – 2003. – Vol. - 122, N 3. – P. 479-488.
12. Фриденштейн А.Я., Лурия Е.А. Клеточные основы кроветворного микроокружения. – М.: Медицина, 1980. – 214с.
13. Чертков И.Л., Гуревич О.А. Стволовая кроветворная клетка и ее микроокружение. – М.: Медицина, 1984. – 240с.
14. Owen M. Histogenesis of bone cells // *Calcif. Tissue Res.* – 1978. – Vol.25. - № 3. – P.205-207.
15. Tavassoli M. Studies on hemopoietic microenvironments. Report of a workshop held in La Jolla, California, August 8-9, 1974 // *Exp. Hematol.* – 1975. – Vol.3. - № 4. – P.213-226.

16. Wang Q.-R., Yan Z.-J., Wolf N.S. Dissecting the hematopoietic microenvironment. VI. The effects of several growth factors on the in vitro growth of murine bone marrow CFU-F // *Exp. Hematol.*, 1990. – Vol.18, №4. – P.341-347.
17. Wang Q.-R., Wolf N.S. Dissecting the hematopoietic microenvironment. VIII. Clonal isolation and identification of cell types in immune CFU-F colonies by limiting dilution // *Exp. Hematol.* – 1990. – Vol.18. - №4. – P.355-359.
18. Pittenger M.F., Mackay A.M., Beck S.C. et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells // *Science*. -1999. – Vol.284. - № 5411. – P.143-147.
19. Haynesworth S.E., Baber M.A., Caplan A.I. Cell surface antigens on human marrow-derived mesenchymal cells are detected by monoclonal antibodies // *Bone*. – 1992. – Vol.13. - № 1. – P.69-80.
20. Weiss L., Geduldig L. Barrier cells: Stromal regulation of hematopoiesis and blood cell release in normal and stressed murine bone marrow // *Blood*. – 1991. – Vol.78. - №4. – P.975-990.
21. Okuyama R., Koduma M., Yanai N., Obinata M. Bone marrow stromal cells induce myeloid and lymphoid development of the sorted hematopoietic stem cells in vitro. // *Blood*. - 1995. – Vol.86. - №7. – P.2590-2597.
22. Sensebe L., Mortensen B.T., Fixe P. et al. Cytokines active on granulomonopoiesis: release and consumption by human marrow myeloid stromal cells // *Br. J. Haematol.* – 1997. – Vol.98. - №2. – P.274-282.
23. Islam A., Slomski C., Henderson E.S. Endothelial cells and hematopoiesis: A light microscopic study of fetal normal and pathologic human bone marrow in plastic – embedded sections // *Anat. Rec.* – 1992. – Vol.233. - №3. – P.440-452.
24. Broudy V.C., Kovach N.L., Bennett L.G. et al. Human umbilical vein endothelial cells display high-affinity c-kit receptors and produce a soluble form of the c-kit receptor // *Blood*. – 1994. – Vol.83. - №8. – P.2145-2152.
25. Davis T.A., Robinson D.H., Lee K.P., Kessler S.W. Porcine brain microvascular endothelial cells support the in vitro expansion of human primitive hematopoietic bone marrow progenitor cells with a high replating potential: Requirement for cell-to-cell interaction and colony-stimulating factors // *Blood*. – 1995. – Vol.85. - №7. – P.1751-1761.
26. Rafii S., Shapiro F., Pettengell R. et al. Human bone marrow microvascular endothelial cells support long-term proliferation and differentiation of myeloid and megakaryocytic progenitors // *Blood*. – 1995. – Vol.86. - №9. – P.3353-3363.
27. Michurina T.V., Paiushina O.V., Bueverova E.I. et al. Hemopoiesis on stromal sublayers formed by constant lines of fibroblasts // *Izv. Akad. Nauk. Ser. Biol.* – 2002. – Vol.4. – P.393-401.
28. Moore K.A., Potowski B., Witte L. et al. Hematopoietic activity of stromal cell transmembrane protein containing epidermal growth factor – like repeat motifs // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. – 1997. – Vol.94. - №8. – P.4011-4016.

29. Rios M., Williams D.A. Systematic analysis of the ability of stromal cell lines derived from different murine adult tissues to support maintenance of hematopoietic stem cells // *Exp. Hematol.* – 1990. – Vol.18. - №6. – P.568.
30. Moore M.A.S. Cytokine and chemokine networks influencing stem cell proliferation, differentiation, and marrow homing // *J. Cell Biochem. Suppl.* – 2002. – №38. – P. 29-38.
31. Fukumoto T. Possible developmental interactions of hematopoietic cells and hepatocytes in fetal rat liver // *Biomed. Res.* – 1992. – Vol.13. - №6. – P.385-413.
32. Van den Heuvel R.L., Schoeters G.E.R., Vanderborght O.L.J. Haemopoiesis in long-term cultures of liver, spleen and bone marrow of pre- and postnatal mice: CFU-GM production // *Br. J. Haemat.* – 1988. – Vol.70. – P.273-277.
33. Yoder M.C., Sullivan M., Breitfeld P. et al. Differential expression of hematopoietic growth factors by immortalized murine fetal and adult stromal cell lines // *Exp. Hematol.* – 1992. – Vol.20. - №6. – P.810.
34. Yoder M.C., Papaioannou V.E., Breitfeld P.P., Williams D.A. Murine yolk sac endoderm – end mesoderm – derived cell lines support in vitro growth and differentiation of hematopoietic cells // *Blood.* – 1994. – Vol.83. - №9. – P.2436-2443.
35. Yoder M.C., King B., Hiatt K., Williams D.A. Murine yolk sac cells promote in vitro proliferation of bone marrow high proliferative potential colony – forming cells // *Blood.* – 1995. – Vol.86. - №4. – P.1322-1330.
36. Taichman R.S., Reilly M.J., Verma R.S., Emerson S.G. Augmented production of interleukin-6 by normal human osteoblasts in response to CD34+ hematopoietic bone marrow cells in vitro // *Blood.* – 1997. – Vol.89. - №4. – P.1165-1172.
37. Mohle R., Salemi P., Moore M.A.S., Rafii S. Expression of interleukin-5 by human bone marrow microvascular endothelial cells: Implication for the regulation of eosinophilopoiesis in vitro // *Brit. J. Haematol.* – 1997. – Vol.99. - №4. – P.732-738.
38. Gibson F.M., Scopes J., Daly S. et al. Haemopoietic growth factor production by normal and aplastic anaemia stroma in long-term bone marrow culture // *Br. J. Haematol.* – 1995. – Vol.91. – P.551-561.
39. Wineman J., Moore K., Lemischka I., Muller–Sieburg C. Functional heterogeneity of the hematopoietic microenvironment: Rare stromal elements maintain long – term repopulating stem cells // *Blood.* - 1996. – Vol.87. - №10. – P.4082-4090.
40. Ogawa Y., Yonekura S., Nagao T. Granulocyte colony – stimulating factor production by human bone marrow fibroblasts stimulated with interleukins // *Amer. J. Hematol.* – 1996. – Vol.52. - №2. – P.71-76.

41. Van den Heuvel RL, Versele SR, Schoeters GE, Vanderborght OL. Stromal stem cells (CFU-f) in yolk sac, liver, spleen and bone marrow of pre- and postnatal mice // *Br. J. Haematol.* – 1987. – Vol.66. - № 1. – P.15-20.
42. Ye Z.-Q., Burkholder J.K., Qiu P. et al. Establishment of an adherent cell feeder layer from human umbilical cord blood for support of long-term hematopoietic progenitor cell growth // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* – 1994. – Vol.91. - №25. – P.1240-1244.
43. Sutherland H.J., Eaves C.J., Eaves A.C. et al. Characterization and partial purification of human marrow cells capable of initiating long-term hematopoiesis in vitro // *Blood.* – 1989. – Vol.74. - № 5. – P.1563-1570.
44. Патент України № 2692. Спосіб виготовлення камери для культивування клітин / Білько Н.М. від 15.04.1994. - Офіційний бюлетень «Промислова власність» – 1994. – № 5. – с. 218.
45. Гематология: новейший справочник. Под общ. ред. К. М. Абдулкадырова. – М.: Сова, 2004. – С. 920.
46. Манакова Т. Е., Цветаева Н. В., Левина А. А., Момотюк К. С., Саркисян Г. П., Хорошко Н. Д., Герасимова Л. П. Продукция цитокинов in vitro стромальными клетками костного мозга и макрофагами больных миелодиспластическим синдромом//Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.-2001.-Т.132.№7.-С.30-33.
47. Юрасов С. В., Владимирская Е. Б., Румянцев А. Г. ., Мур С. Выделение гемопоетических стволовых клеток из пуповинной крови человека для трансплантации// *Гематология и трансфузиология.* - 1997 - № 2 – С. 10-15.
48. Шалимов В.А. Некоторые вопросы межклеточных взаимодействий в органах гемопоэза позвоночных. К.: Общество «Знание» Украины, 2001. – С.20.
49. Чертков И.Л., Дризе Н.Н., Воробьев А.И., Бриллиант М.Д. Кроветворение. В кн.: Руководство по гематологии: в 3 т. Т. 1. Под ред. А. И. Воробьева. – М.: Ньюдиамед, 2002. – 280 с.
50. Чертков И.Л., Фриденштейн А. Я. Клеточные основы кроветворения. – М.: Медицина, 1977. – 274 с.
51. Guo W., Lasky J. L., Wu H. Cancer stem cells // *Pediatric research.* – 2006. – 59, N 4. – P. 59–64.
52. Sutherland H.J., Hogge D.E., Eaves C.J. Characterization, quantitation and mobilization of early hematopoietic progenitors: implications for transplantation // *Bone Marrow Transplant.* – 1996 – Vol.18, Suppl 1. – S1–4.
53. de Wynter E, Ploemacher RE. Assays for the assessment of human hematopoietic stem cells // *J. Biol. Regul. Homeost. Agents.* – 2001. – Vol.15. – № 1. – P.23–27.
54. Lansdorp P.M. Telomeres, stem cells, and hematology // *Blood.* – 2008. Vol.111(4). – P.1759–66

55. Kay H.E. How many cell generations? // *Lancet*. 1965. – Vol.2. P.418 – 419.
56. Чертков И.Л., Дризе Н.И. Дифференцировочный потенциал стволовых клеток (проблема пластичности) // *Вестн. РАМН*. – 2005. – № 10. – С.37–44.
57. Spangrude G.J., Smith L., Uchida N. Mouse hematopoietic stem cells // *Blood*. – 1991. – Vol.78. – №6. – P.1395–1402.
58. Goldwasser E., Hermine O., Pach N., Stage-Morroquin B. Internal autocrine regulation of early stages of hemopoiesis // In: *Annals of the New York Academy of Sciences*. – Vol.718; ed. by Rich I.N., Lappin T.R.I., New York. – 1994. P.326–330.
59. Lemoine F.M., Krystal G., Humphries R.K., Eaves C.J. Autocrine production of pre-B-cell stimulating activity by a variety of transformed murine pre-B-cell lines // *Cancer Res*. – 1988. – Vol.48. – №22. – P.6438–6443.
60. Russell N.H. Autocrine growth factors and leukaemic haemopoiesis // *Blood Rev*. – 1992. – Vol.6. – №3. – P.149–156.
61. Till J.E., McCulloch E.A., Siminovitch L. A stochastic model of stem cell proliferation, based on the growth of spleen colony-forming cells // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. – 1964. – 51, N 1. – P. 29–36.
62. Korn A.P., Henkelman R.M., Ottensmeyer F.P., Till J.E. Investigation of a stochastic model of haemopoiesis // *Experimental hematology*. – 1973. – 1, N 6. – P. 362–375.
63. Roeder I., Kamminga L.M., Braesel K., Dontje B., de Haan G., Loeffler M. Competitive clonal hematopoiesis in mouse chimeras explained by a stochastic model of stem cell organization // *Blood*. – 2005. – 105, N 2. – P. 609–616.
64. Roeder I., Loeffler M. A novel dynamic model of hematopoietic stem cell organization based on the concept of within-tissue plasticity // *Experimental hematology*. – 2002. – 30. – P. 853–961.
65. Roeder I., Loeffler M., Quesenberry P. J., Colvin G. A., Lambert J. F. Quantitative tissue stem cell modeling // *Blood*. – 2003. – 102. – P. 1143–1144.
66. Ponchio L., Duma L., Oliviero B. et al. Mitomycin C as an alternative to irradiation to inhibit the feeder layer growth in long-term culture assays // *Cytotherapy*. – 2000. - Vol.2. - №4. – P.281–286.
67. Білько Н.М. Методи експериментальної гематології // Навчально-методичний посібник. – К.: Видавничий дім «Києво-Могилянська академія», 2006. – 66 с.
68. Севастьянов Б.А. Ветвящиеся процессы. – М.: Наука, 1971. – 436 с.
69. Третяк Н.М. Гематологія: Навч. посібник.–К.: Зовнішня торгівля, 2005. – 240 с.
70. Гольдберг Е.Д., Дыгай А.М., Шахов В.П. Методы культуры ткани в гематологии. – Томск: Изд-во Том. Ун-та, 1992. – 264 с.