

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

## Магістерська робота

освітній ступінь – магістр

на тему: **«ОПТИМІЗАЦІЯ УМОВ КУЛЬТИВУВАННЯ  
ГЕМОПОЕТИЧНИХ СТОВБУРОВИХ КЛІТИН З КОРДОВОЇ КРОВІ У  
КУЛЬТУРИ *IN VITRO*»**

Виконала: студентка 2-го року  
навчання  
Галузі знань: 09 Біологія  
Спеціальності: 091 Біологія  
Освітньо-наукової програми:  
Лабораторна діагностика біологічних  
систем

Приз Анастасія Максимівна

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

Рецензент Стародуб М.Ф.

Магістерська робота захищена  
з оцінкою \_\_\_\_\_

Секретар ЕК Пахаренко М.В.

«01» червня 2022 року

## ЗМІСТ

	Стор.
<b>ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ.....</b>	4
<b>ВСТУП.....</b>	5
<b>РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....</b>	7
1.1. Сучасні уявлення про гемопоетичні стовбурові клітини і клітини-попередники людини.....	7
1.2. Роль цитокінів, як регуляторів процесу кровотворення.....	12
1.3. Переваги гемопоетичних стовбурових клітин вилієнних з кордової крові для трансплантації.....	19
1.4. Загальна характеристика ніші ГСК.....	20
1.5. Експериментальне моделювання умов культивування <i>ex vivo</i> .....	24
<b>РОЗДІЛ 2. ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА.....</b>	30
<b>2.1. Матеріали та методи дослідження.....</b>	30
2.1.1. Матеріали дослідження.....	30
2.1.2. Характеристика клітинної лінії MCF-7 та умов культивування.....	32
2.1.3. Отримання моноклеарної фракції клітин кордової крові.....	33
2.1.4. Спосіб тривалого культивування гемопоетичних клітин у культурі <i>in vitro</i> .....	33
2.1.5. Додавання комплексу цитокінів у культуральне середовище.....	34
2.1.6. Клоногенний спосіб визначення клітин-попередників у одношаровому агаровому середовищі.....	34
2.1.7. Проведення МТТ-тесту.....	35
<b>РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ... 36</b>	36
<b>3.1. Результати досліджень.....</b>	36
3.1.1. Вибір способу виділення моноклеарної фракції кордової крові	36
3.1.2. Вивчення токсичності гідрогелей і можливості використовувати їх в якості підложки для культивування ранніх гемопоетичних клітин з кордової крові.....	42

3.1.3. Проліферативний потенціал гемопоетичних клітин-попередників кордової крові у процесі довготривалого культивування на гідрогелевих підложках.....	45
<b>УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ.....</b>	<b>49</b>
<b>ВИСНОВКИ.....</b>	<b>51</b>
<b>СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....</b>	<b>53</b>

**ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ**

БУО-Е – бурстутворююча одиниця еритроїдна

ГКП – гемопоетична клітина-попередник

ГМ-КСФ – гранулоцитарно-макрофагальний колонієстимулюючий фактор

ГСК – гемопоетична стовбутова клітина

КК – кордова кров

КЛУО – кластероутворюючі одиниці

КМ – кістковий мозок

КСФ – колонієстимулюючий фактор

КУО – колонієутворююча одиниця

КУО-Г – колонієутворююча одиниця гранулоцитарна

КУО-ГЕММ – колонієутворююча одиниця гранулоцитарно-еритроїдно-мегакаріоцитарно-моноцитарна

КУО-ГМ – колонієутворююча одиниця гранулоцитарно-макрофагальна

КУО-Е – колонієутворююча одиниця еритроїдна

КУО-Еоз – колонієутворююча одиниця еозинофільна

КУО-Мег – колонієутворююча одиниця мегакаріоцитарна

КУОс – колонієутворююча одиниця селезінки

М-КСФ – макрофагальний колонієстимулюючий фактор

МНК – моноклеарні клітини

ЯВК – ядровмісні клітини

МСК – мезенхімальні стовбурові клітини

## ВСТУП

Однією із найважливіших задач у біотехнології стовбурових клітин є досягнення тривалої експансії гемопоетичних стовбурових клітин за умови того, що не втрачатимуться їхні функціональні характеристики та досягатиметься високий рівень їх росту. Метою таких досліджень є розробка моделі для визначення умов експансії раних гемопоетичних клітин-попередників кордової крові людини та встановлення їхніх функціональних характеристик *in vitro*.

Серед концептуальних підходів, які на сьогодні застосовуються для аналізу проліферативного і диференційного потенціалу гемопоетичних клітин-попередників людини, культуральні дослідження *ex vivo* дозволяють оцінювати не лише морфологічні, а й функціональні характеристики стовбурових клітин для подальшої трансплантації.

Одним з перспективних напрямків досліджень у онкогематології є пошук оптимальних умов культивування *ex vivo* гемопоетичної стовбурової клітини і гемопоетичних клітин-попередників і шляхів оцінки їх функціональної активності. Це пов'язано з обмеженою кількістю кровотворних клітин, отримуваних від одного донора, що гальмує використання кордової крові в якості альтернативного джерела гемопоетичної тканини для трансплантацій.

Інтенсивне вивчення питань регуляції кровотворення протягом останніх десятиріч привело до розробки різних експериментальних систем, проте невирішеними залишаються питання щодо можливості тривалого збереження і підтримки функціональної активності клітин кордової крові *ex vivo*. Тому дослідження, пов'язані з вибором шляхів накопичення гемопоетичних стовбурових клітин і клітин-попередників кордової крові, є сьогодні актуальними і доцільними.

Оцінка якісних характеристик гемопоетичних клітин-попередників у культурі впродовж культивування є важливим етапом контролю якості потенційного трансплантаційного матеріалу та при подальшій розробці може бути застосованим при трансплантації стовбурових гемопоетичних клітин.

Аналіз клоногенної активності та характеристика якісного складу гемопоетичних стовбурових клітин є одним з найважливіших прогностичних факторів щодо відновлення гемопоезу в разі трансплантації.

**Метою** роботи було визначення оптимальних умов підтримки кровотворення *ex vivo* і оцінка функціональної активності стовбурових клітин і гемопоетичних клітин-попередників з кордової крові у процесі довготривалого культивування на гелевій підложці у присутності комплексу цитокінів.

Завдання дослідження:

1. Здійснити адаптацію лінії MCF-7 аденокарциноми молочної залози для визначення цитотоксичності гелевої підложки в культурі *ex vivo*.
2. Обрати найменш токсичний варіант геля, як підложки для культивування *ex vivo*.
3. Підібрати оптимальний спосіб виділення моноклеарної фракції кордової крові.
4. Оптимізувати спосіб вирощування клітин кордової крові з використанням гелевої підложки.
5. Дати оцінку функціональної активності гемопоетичних клітин-попередників кордової крові у процесі тривалого культивування на гідрогелевих підложках і визначити переваги такого способу підтримки гемопоезу в культурі.

**Об'єктом дослідження** була оптимізація процесу кровотворення у кордовій крові в культурі *ex vivo*. **Предметом дослідження** були властивості гемопоетичних клітин-попередників з кордової крові, при різних умовах культивування *ex vivo*.

Експериментальну частину роботи було виконано на базі кафедри лабораторної діагностики біологічних систем Національного університету «Києво-Могилянська академія».

## РОЗДІЛ 1

### ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

#### 1.1. Сучасні уявлення про гемопоетичні стовбурові клітини і клітини-попередники людини

Перше повідомлення про наявність гемопоетичних попередників у кордовій крові (КК) новонародженого було опубліковано 1974 року та підтверджено потім іншими дослідниками [17, 39, 41]. В кінці 80-х років групою вчених під керівництвом Broxmeyer Н. Е. експериментально показано, що в одиниці об'єму КК міститься більша кількість гемопоетичних клітин-попередників (ГКП), відносно периферичної крові дорослого і приблизно еквівалентна одиниці об'єму дорослого кісткового мозку (КМ) кількість цих клітин [6, 7]. Ці заключення послужили стимулом для подальшого вивчення КК людини як потенційного матеріалу для клінічного застосування у якості гемопоетичної тканини [45, 49].

У ксеногенній системі при трансплантації фракціонованих клітин КК людини сублетально опроміненим мишам з комбінованим імунодефіцитом було отримано високі рівні мультилінійного приживлення (80 %) донорських зразків. У КМ реципієнтів були присутні у великих кількостях мультипотентні і комітовані мієлоїдні і еритроїдні попередники, виявлені незрілі CD34<sup>+</sup> клітини. Крім того, у значної кількості мишей при введенні їм 1 мл КК, що містила  $5 \times 10^6$  ядерних клітин, більше 50 % кістковомозкового кровотворення було людського походження, що свідчить про високий трансплантаційний потенціал клітин КК. Автори відзначають, що на відміну від клітин дорослого КМ, трансплантовані клітини КК не потребували цитокінів людини для приживлення в мишачій моделі. Можливим поясненням феномену незалежності гемопоезу клітин КК від факторів росту у такій моделі може бути більш високий проліферативний

потенціал клітин КК порівняно з попередниками КМ, а також здатність клітин КК продукувати свої власні цитокіни в паракринному вигляді [24, 37].

Існують певні вимоги до трансплантату кровотворної тканини, необхідні для відновлення кровотворення при різних мієлодепресивних станах. Згідно з класичними уявленнями, для успішного приживлення аlogenного трансплантату кровотворної тканини, доза введених ядровмісних клітин крові (ЯВК) повинна знаходитися у межах від 1 до  $3 \times 10^8$  ЯВК на кілограм маси тіла реципієнта [18]. Таким чином, зразки КК, що містять в середньому  $5,4 - 12,7 \times 10^8$  ЯВК, підходять тільки для дитячих трансплантацій, що зумовлює ширше використання цього джерела гемопоетичних стовбурових клітин (ГСК) у педіатричній практиці [5, 6, 17, 18].

ГСК характеризують на основі вивчення їх фенотипових і функціональних властивостей. Функціональні методи базуються на клональному рості досліджуваної клітинної популяції *in vitro*. Використання напіврідкого середовища (агар чи метилцелюлоза) дозволяє зберегти просторове розташування клітин (колоній) і, таким чином, ретроспективно охарактеризувати вихідну популяцію комітованих ГКП у короткотривалій культурі (2-3 тижні) [1]. Ця популяція клітин представляє собою безпосередніх попередників зрілих клітин у периферичній циркуляції. Залежно від морфологічного складу колоній гемопоетичні попередники можуть бути підрозділені на мультипотентні (що дають ріст гранулоцитарним, еритроїдним, мегакаріоцитарним і макрофагальним елементам – КУО-ГЕММ); біпотентні (наприклад, гранулоцитарно-макрофагальні – КУО-ГМ) і уніпотентні (гранулоцитарні – КУО-Г, макрофагальні – КУО-М, еозинофільні – КУО-Еоз, базофільні – КУО-Баз, мегакаріоцитарні – КУО-Мег, еритроїдні – КУО-Е). Результати клоногенного культивування кровотворних попередників багато в чому залежать від умов культивування і, головне, від використовуваних факторів росту (кондиційоване середовище чи комбінація цитокінів) [11, 13].



Присутність у культурі цитокінів, що впливають на ранні етапи кровотворення (GM-CSF, IL-3, IL-1, IL-6, SCF) дає ріст популяції клітин, що володіють високим проліферативним потенціалом (КУК-ВПП) і здатні формувати колонії, які складаються із декількох тисяч клітин і розміром перевищують 0,5 мм [22, 36, 40, 54, 57]. Клітини, що їх складають, здатні формувати нові колонії при культивуванні в агарі.

В КК виявлені найбільш ранні із відомих до цього часу гемопоетичні попередники – LTC-ICs – «клітини, що ініціюють кровотворення у довготривалих культурах», названі так через свою здатність давати початок всім росткам кровотворення при довготривалому культивуванні. За даними Pettengell R. зі співавт. [46], їх пропорція у КК або була подібною до їх пропорції в КМ, або навіть перевищувала її, що виявлено як при використанні методу лімітуючих розведень, так і в стандартній довготривалій культурі [10]. Доведено, що LTC-IC КК володіють більшим проліферативним потенціалом, ніж LTC-IC КМ [44]. Виходячи із отриманих даних, було зроблено висновок про те, що трансплантаційний потенціал стовбурових клітин КК не поступається трансплантаційному потенціалу відповідних клітин КМ.

Процес проліферації і диференціювання гемопоетичних попередників супроводжується фенотиповими змінами клітин і може бути виявлений з використанням моноклональних антитіл. ГСК і ранні ГКП характеризуються експресією CD34-антигену [5, 23, 31], який служить індикатором наявності даних клітин в трансплантаті гемопоетичної тканини [51]. Припускають, що молекула CD34 запускає внутрішньоклітинні механізми регуляції експресії генів гемопоетичного розвитку у відповідь на зміну клітинного оточення [23]. CD34-антиген експресується найбільшою мірою на ранніх ГСК, з прогресуючим зниженням експресії в міру дозрівання клітин-попередників. Приблизно 1 % ядромісних клітин нефракціонованої кордової крові експресує CD34 антиген, що складає майже таку ж пропорцію, що і в КМ дорослого, але менше, ніж знайдено у фетальній печінці (ФП) чи «мобілізованій» периферичній крові [29]. За даними інших авторів, CD34<sup>+</sup> клітини складають 0,3-1,9 % у КК, 0,5-5,0 % – в

нормальному КМ дорослого і менше 1 % в периферичній крові [55]. Гемопоетичні CD34<sup>+</sup> клітини включають в себе гетерогенну популяцію комітованих попередників і поліпотентних попередників, а також малу фракцію репопулюючих ГСК [11].

Для виявлення більш комітованих попередників використовується коекспресія на CD34<sup>+</sup> клітинах таких антигенів, як Thy-1, панелі диференціовальних (лінійноспецифічних – lineage-specific – Lin) антигенів. До них належать CD2 (Т-лімфоцити), CD14 (моноцити), CD15 (гранулоцити), CD16 (натуральні кіллери), CD19 (В-лімфоцити), глікофорин А (еритроїдні) і т. ін. [14]. Експресія на клітинах високих рівнів CD34 антигену за відсутності коекспресії на їх поверхні лінійноспецифічних (Lin-) антигенів, характеризує некомітовані кровотворні клітини [34, 46].

Значна кількість CD34<sup>+</sup> клітин КК коекспресує CD13 антиген, що характеризує міелоїдні клітини-попередники. Малочисельні клітини, що коекспресують CD71-антиген, спільний для активованих Т- і В- клітин, макрофагів, ранніх представників клітин еритроїдного ряду [52]. 25 % CD34<sup>+</sup> клітин КК мають фенотип CD34<sup>+</sup>/CD71<sup>-</sup>/CD45RA<sup>-</sup>, а в КМ така субпопуляція складає 5-20 % [34].

Значення експресії HLA-DR на клітинах КК не зовсім зрозуміле. В КМ CD34<sup>+</sup>/DR<sup>-</sup> клітини більш примітивні, ніж CD34<sup>+</sup>/DR<sup>+</sup> клітини КК. Вони утворюють у рідкій культурі значно більше КУО-ГМ, ніж CD34<sup>+</sup>/DR<sup>+</sup> клітини, однак у КК все навпаки – CD34<sup>+</sup>/DR<sup>+</sup> клітини утворюють більше КУО-ГМ, ніж CD34<sup>+</sup>/DR<sup>-</sup> клітини, що викликає сумніви у оцінці експресії DR-антигену в КК [58]. Група Moore M.A.S. і співавт. висловили припущення, що експресія антигенів II класу гістосумісності пов'язана з процесом активації ГСК, а низький рівень, чи відсутність HLA-DR – з перебуванням клітини у стані спокою G<sub>0</sub> фази клітинного циклу [36].

Одним із найактуальніших питань відносно клінічного застосування КК залишається проблема достатньої кількості ГКП, що містяться в окремому зразку КК, яка необхідна для відновлення гемопоезу реципієнта, зокрема дорослого [8].

За даними одних авторів, об'єм зібраної крові і вміст ядерних елементів у ній корелюють з кількістю CD34<sup>+</sup> клітин, КУО-ГМ, БУО-Е і КУО-ГЕММ [7]. На думку інших авторів, зокрема Gluckman E. зі співавт. [19], навіть у зразках КК малих об'ємів може міститися достатня кількість ГКП для трансплантації. Автори оцінювали якість зразків КК, виходячи із вмісту у них мінімальної кількості КУО-ГМ, рівної  $2 \times 10^3$  на 1 кг маси тіла реципієнта. Було отримано такі результати: близько 90 % досліджених зразків були придатні для трансплантації дитині, крім того, 45 % із них за вмістом клітин були достатніми для трансплантації дорослій людині з масою тіла більше 50 кг і тільки 10 % зразків були непридатні через недостатній вміст клітинних елементів.

Проблема недостатності клітин у трансплантаті (як ядровмісних, так і CD34<sup>+</sup> гемопоетичних зокрема) – не нова. Ще в 1969 році було описано спроби збільшення кількості клітин у трансплантаті шляхом використання другого неспорідненого донора КМ [33]. На даний час існують два основних напрямки у вирішенні проблеми «недостатності дози трансплантату» – експансія гемопоетичних клітин *in vitro* і трансплантація суміші ядровмісних клітин із двох різних зразків КК. Про клінічний успіх другого напрямку повідомляла група Ohwada S. [43]. Однак, в експериментальній роботі Yahata T. зі співавт. [57] було виявлено «асиметричний химеризм» і явище конкуренції за приживлення між двома зразками КК, один із яких не піддавався фракціонуванню, а другий містив збагачену фракцію CD34<sup>+</sup> клітин. Несподівано дослідники спостерігали розвиток реакції «трансплантат проти трансплантату», що було асоційовано з наявністю CD34<sup>-</sup>/Lin<sup>+</sup> клітин. De Lima M. зі співавт. описують спостереження приживлення обох трансплантованих донорських зразків КК з досягненням повної ремісії у пацієнта з гострою формою лейкемії [11]. Таким чином, механізми конкурентного приживлення при одномоментній трансплантації двох зразків КК залишаються не до кінця зрозумілими і дискусійними.

Експансія ГСК на сьогодні є предметом інтенсивного вивчення. На жаль, оскільки технології постійного отримання в культурі значимих кількостей гемопоетичних стовбурових клітин ще не розроблені, потенціал застосування

цієї технології обмежений. Успішне підтримання і експансія трансплантабельних гемопоетичних клітин *in vitro* потребує запуску ГСК в проліферацію без проходження диференціювання. Клітини, що знаходяться в культурі, повинні зберігати здатність до «хоумінгу», приживлення а також диференціювання у відповідні тканини. Регулювання цих процесів включає взаємодію між рецепторами клітинної поверхні і великою групою розчинних і зв'язаних з матриксом регуляторних молекул - модуляторів клітинної функції, до яких належать гормони, нейропептиди, цитокіни і фактори росту [35]. Головним підходом в дослідженнях, спрямованих на експансію ГСК людини *in vitro* є маніпулювання культуральним мікросередовищем, первинно через додавання рекомбінантних цитокінів. У різних лабораторіях світу досягнуто певні успіхи в цьому напрямку, однак протоколи експансії, комбінації використовуваних у них цитокінів і факторів росту, а також їх концентрації, суттєво відрізняються [15, 32, 5, 28, 35, 21, 36, 54], що потребує подальших досліджень.

## **1.2. Роль цитокінів як регуляторів процесу кровотворення**

Регуляція гемопоезу здійснюється за допомогою кровотворних цитокінів і залежить від базисної основи, на якій культивуються клітини. Особливо перспективним виявилось культивування клітин не на жорсткому склі чи пластику, а на гідрогелевій основі. На даний час відомі десятки таких підложек і факторів. В основному це стимулятори проліферації і диференціювання кровотворних клітин, але зустрічаються і інгібітори. Так, трансформуючий фактор росту  $\beta$  (TGF $\beta$ ), відомий своєю інгібуючою дією на ріст епітеліальних клітин різних тканин [3], пригнічував також і проліферацію ГСК із жовткового мішку ембріонів миші [26], хоч повідомляли і про стимулюючу дію цього фактора на кровотворення [49].

Характерною особливістю цитокінів є їх плейотропність і надлишковість дії (ріданденз), тобто вони мультифункціональні, володіють широким спектром

біологічної дії на різні типи клітин і тканин. Одна і та ж клітина може секретувати декілька різних цитокінів і в той же час один і той же цитокін може продукуватися різними типами клітин. Дія цитокінів зазвичай комплексна, тобто на одну і ту ж клітину одночасно спільно діють декілька цитокінів, частково перекриваючи ефект один одного, а один і той же вид цитокіну може здійснювати вплив на різні типи клітин [22]. Деякі із цитокінів і факторів росту діють на клітину безпосередньо, інші – опосередковано, однак їх більша частина діє обома шляхами. Так, деякі цитокіни з гемопоетичною активністю стимулюють проліферацію і диференціювання зразу декількох типів клітин, діючи на одні як короткодистантні медіатори, а на інші здійснюючи дистантний вплив. У даному розділі ми вважаємо за необхідне сказати декілька слів про окремих представників цитокінів і фактори росту, що беруть участь у регуляції кровотворення, рекомбінантні форми яких використовуються на даний час для експансії ГСК і ГКП у системах *in vitro*.

Інтерлейкін-6 (IL-6) був уперше виділений із фібробластів людини, які є джерелом його утворення. Крім того цитокін продукується моноцитами і активованими Т-лімфоцитами [54]. Рецепторами для IL-6 є IL-6Ra і gp-130, які експресуються на стромальних клітинах, В- і Т-лімфоцитах, гепатоцитах. Вища експресія рецептора IL-6 відзначається на пізніх мієлоїдних CD34+ клітинах-попередниках, ніж на ранніх [57]. Рекомбінантна форма IL-6 не здійснює прямого впливу на гемопоетичні клітини людини, однак він синергічно діє з багатьма цитокінами, які безпосередньо впливають на проліферацію гемопоетичних клітин. В комбінації з IL-3 IL-6 індукує проліферацію примітивних гемопоетичних клітин-попередників, включно з КУОс. При додаванні в культуру кістковомозкових клітин IL-3 і IL-6 різко зростає утворення колоній, що складаються із бластів, що, на думку Lotz M., може бути пов'язане із вкороченням G<sub>0</sub>-періоду і входженням гемопоетичних клітин-попередників у стані спокою в мітотичний цикл [31]. Однак IL-6 може діяти і як інгібітор проліферації, зокрема для макрофагів. У культурі мононуклеарних клітин КМ людини, стимульованих М-КСФ і SCF, додавання IL-6 викликало затримку

утворення макрофагальних колоній на 55-73 %. У даній ситуації ІЛ-6 виступає як інгібітор, здійснюючи свій вплив переважно на відносно зрілі клітини-попередники [40].

За своєю дією на гемопоез зазначений цитокін подібний до ІЛ-1. Його біологічна активність достатньо широка. ІЛ-6 у синергізмі з ІЛ-3 *in vitro* збільшує проліферативну активність поліпотентних ГСК шляхом скорочення періоду G<sub>0</sub> фази клітинного циклу. Спільно з ІЛ-3 він стимулює ріст колоній КУО-Мег, КУО-ГЕММ і КУО-БУО-Е у поєднанні з ГМ-КСФ індукує колонієутворення гранулоцитів, а з М-КСФ – ріст колоній макрофагів. У поєднанні з ІЛ4, ІЛ-6 індукує проліферацію Т-клітин і колонієутворення поліпотентних клітин-попередників. *In vitro* у поєднанні з ІЛ-11 і ТПО цитокін стимулює утворення тромбоцитів [26].

За рахунок швидкої активації транскрипційного фактора Pu.1 ІЛ-1 може збільшувати кількість клітин мієлоїдної та гранулоцитарно-макрофагальної лінії [61].

Роль ІЛ-3 у проліферації ГСК достатньо велика, оскільки за відсутності цього фактора, стовбурові клітини перебувають в стані спокою [61, 62].

Фактор стовбурових клітин (SCF) – основний регуляторний цитокін стовбурових клітин, який має вплив на ГСК за допомогою c-Kit рецептора тирозинкінази. Фактор експресують МСК та ендотеліальні клітини. За допомогою SCF забезпечується регуляція і проліферація ГСК. Сучасні цитокінові коктейлі, які використовуються для підтримки культивованих ГСК *in vitro* включають в себе фактор стовбурових клітин [61, 62].

Тромбопоетин (ТРО) – регуляторний цитокін глікопротеїнової природи, який впливає на диференціацію мегакаріоцитів та активацію тромбоцитів. Регуляторний вплив на ГСК відбувається за допомогою рецептора тромбопоетину – Мр16, який експресується гемопоетичними стовбуровими клітиними [62].

Ангіопоетин-1 – фактор, який входить у сімейство білків ангіопоетинів та виконує важливу функцію у регуляції та формуванні судинної системи –

ангіогенез. За допомогою сигнального шляху Tie-2/Ang1 відбувається підтримка стону спокою ГСК у природньому мікрооточенні КМ [62].

Трансформуючий фактор росту бета (TGF- $\beta$ ) обмежує ріст стовбурових клітин *in vitro* та підтримує стан спокою. При використанні специфічних цитокінових комплексів можливим є збільшення кількості культивованих клітин в декілька раз [63].

Інтерферон-альфа (IFN- $\alpha$ ) є стресовим цитокіном для ГСК, оскільки його використання у дослідженні на мишах показало, що клітини-попередники ефективно виходять з фази G0 і вступають в активний клітинний цикл, тим самим IFN- $\alpha$  індукує проліферацію гемопоетичних стовбурових клітин *in vivo*. Цей процес обумовлений підвищенням фосфорилуванням STAT1 і AKT1 [64].

При вивченні впливу IL-9 на розвиток тучних клітин із CD34<sup>+</sup> пуповинної крові людини було доведено, що додаткова стимуляція фактором стовбурових клітин призвела до підвищення загальної кількості колоній у культурі [65].

У загальному розумінні IL-9 індукує проліферацію примітивних еритроїдних клітин людини [64].

Таблиця 1.1

### Основні цитокіни, які впливають на стовбурові клітини [61]

Цитокін	Основний ефект на стовбурові клітини	Клітини, які піддаються впливу	Механізм регуляції
SCF (stem cell factor)	Проліферація та самовідновлення	Більшість типів стовбурових клітин	Сигналізація c-Kit
LIF (leukemia inhibitory factor)	Проліферація клітин, диференціація до нейрональних клітин	Більшість типів	Активація STAT3 і MEK

		стовбурових клітин	
IL-1	Прискорене зростання клітин	ГСК	Активація транскрипційного фактора Pu.1
IL-1 $\alpha$	Посилений нейрогенез	Нервові стовбурові клітини (НСК), МСК	Немає даних
IL-1 $\beta$	Диференціювання МСК в остеобласти	МСК	Активація MAPK і NF- $\kappa$ B
IL-2	Роль у здатності до відновлення клітин	Більшість типів стовбурових клітин	Немає даних
IL-3	Проліферація та виживання	Більшість типів стовбурових клітин	Сигналізація IL-3
IL-4	Важлива ефективність під час раннього мієлопоезу, сприяння диференціації клітин серця та скелетних м'язів	Більшість типів стовбурових клітин	Активація STAT3
IL-6	Регуляція нейронних попередників. При поєднанні з SCF виникає експансія гемопоетичних попередників	Більшість типів стовбурових клітин	Шлях JAK/STAT



IL-7	Диференціація Т- і В-клітин	ГСК, ембріональні стовбурові клітини (ЕСК)	Сигналізація IL-7
IL-8	Важлива роль для кровотворення та нейропоезу	ГСК, НСК	Індукована PI3K/Akt і MAPK/ERK-опосередкована продукція VEGF.
IL-9	Проліферація примітивних еритроїдних клітин людини	ГСК	Фосфорилування STAT3
IL-10	Здатність до репопуляції клітин	ГСК	Немає даних
IL-11	При поєднанні з SCF забезпечення експансії мишачих гемопоетичних попередників	ГСК	Немає даних
IL-13	Важлива роль під час раннього мієлопоезу	ГСК	Сигналізація IL-13
IL-15	Генерація стовбурових Т-клітин пам'яті людини з наївних попередників	ГСК	Сигналізація IL-15
IL-16	Проліферація та диференціація CD34+ гемопоетичних клітин у зрілі дендритні клітини	ГСК	Сигналізація IL-16

IL-27	Індукція диференціювання гемопоетичних стовбурових клітин	ГСК	Сигналізація IL-27
IL-32	Проліферація гемопоетичних попередників	ГСК	Сигналізація IL-32
IL-34	Роль у розвитку клітин Лангерганса	ГСК	Сигналізація IL-34
TNF- $\alpha$	Потужне пригнічування нормальної активності ГСК	ГСК	Сигналізація через рецептор p55 TNF
IFN- $\alpha$	Активація ГСК, НСК	ГСК, НСК	Підвищене фосфорилування STAT1 і AKT1
TGF- $\beta$	Регулюція гетерогенності ембріональних стовбурових клітин (ЕСК)	ЕСК	Nodal - сигналізація

Таким чином, умови культивування гемопоетичних клітин-попередників залежать від наявності комплексу цитокінів.

### **1.3. Переваги гемопоетичних стовбурових клітин виієленних з кордової крові для трансплантації**

Ще у 1974 році у дослідженні гемопоетичних стовбурових клітин *in vitro* Knudtson виявив, що з кордової крові людини можливе виділення достатньо великої кількості стовбурових клітин в порівнянні з периферичною. Це дослідження показало, що виділені та культивовані клітини пуповинної крові людини у подальшому можуть бути застосовані як джерело гемопоетичних

стовбурових клітин у людей для трансплантації у разі певних захворювань кісткового мозку [66].

Перша алогенна трансплантація стовбурових клітин кордової крові була проведена у 1989 році пацієнту з анемією Флакони від HLA-ідентичного сиблінга [18].

Надалі усі дослідження були направлені на покращення експериментів для збільшення кількості клітин для подальшої трансплантації.

Виділення гемопоетичних стовбурових клітин з кордової крові та їх подальше використання має велике значення у трансплантології, оскільки саме ГСК з пуповинної крові мають ряд переваг, якими не володіють клітини, виділені з інших джерел, наприклад з кісткового мозку:

1. Новонароджені діти мають незрілу імунну систему, а отже і вік стовбурових клітин та їх незрілість, тобто юність, дозволяють мінімізувати ускладнення «трансплантат проти господаря» (РТПГ) за рахунок невеликого алореактивного потенціалу лімфоцитів, що є важливим аспектом у трансплантації ГСК дітям.

2. Під час трансплантації стовбурових клітин з КМ є вірогідність передачі латентних інфекцій реципієнту, оскільки вони не можуть бути визначеними під час стандартних лабораторних досліджень. Трансплантація ГСК із пуповинної крові мінімізує ризик передачі цих інфекцій [67].

3. Велику роль у трансплантації грає проліферативна здатність, яку можна відзначити саме у стовбурових клітинах, виділених з кордової крові, оскільки вони мають довгі теломери [67].

4. Загальна кількість ГСК у КМ значно більша ніж у КК, однак при клоногенному аналізі було досліджено, що кількість КУО-ГЕММ, КУО-ГМ та БУО-Е у загальному порівнянні майже у 5 разів більше ніж у КМ [67].

5. Процес забору біоматеріалу є безпечним як для дитини, так і для матері.

6. Можливість кріоконсервації клітин для подальших досліджень та майбутньої трансплантації.

## 1.4. Загальна характеристика ніші ГСК

Первинний гемопоез починається ще з ембріонального періоду розвитку та характеризується появою первинних ГСК в аорто-гонадо-мезонефросі. Наступний етап кровотворення відбувається між 6-8 тижнем екстравакулярно у печінці плода, яка є головним кровотворним органом до 20-го тижня вагітності. З п'ятого тижня ембріонального розвитку гемопоетична активність печінки починає зменшуватися, але є активною до кінця вагітності. Кровотворна функція кісткового мозку розвивається з 12-го тижня розвитку плода та в подальшому стає основою кровотворної системи [68].

Основне місце розташування гемопоетичних стовбурових клітин у дорослому віці – червоний кістковий мозок епіфізів трубчастих кісток та губчата речовина плоских кісток; поряд з остеобластами на ендofітній стінці кістки, або поруч із ендотеліальними клітинами синусоїдальних кровоносних судин у кісткомозковій рідині. Потрібно відмітити, що ГСК схильні розташовуватися у трабекулярній області метафізу [69].

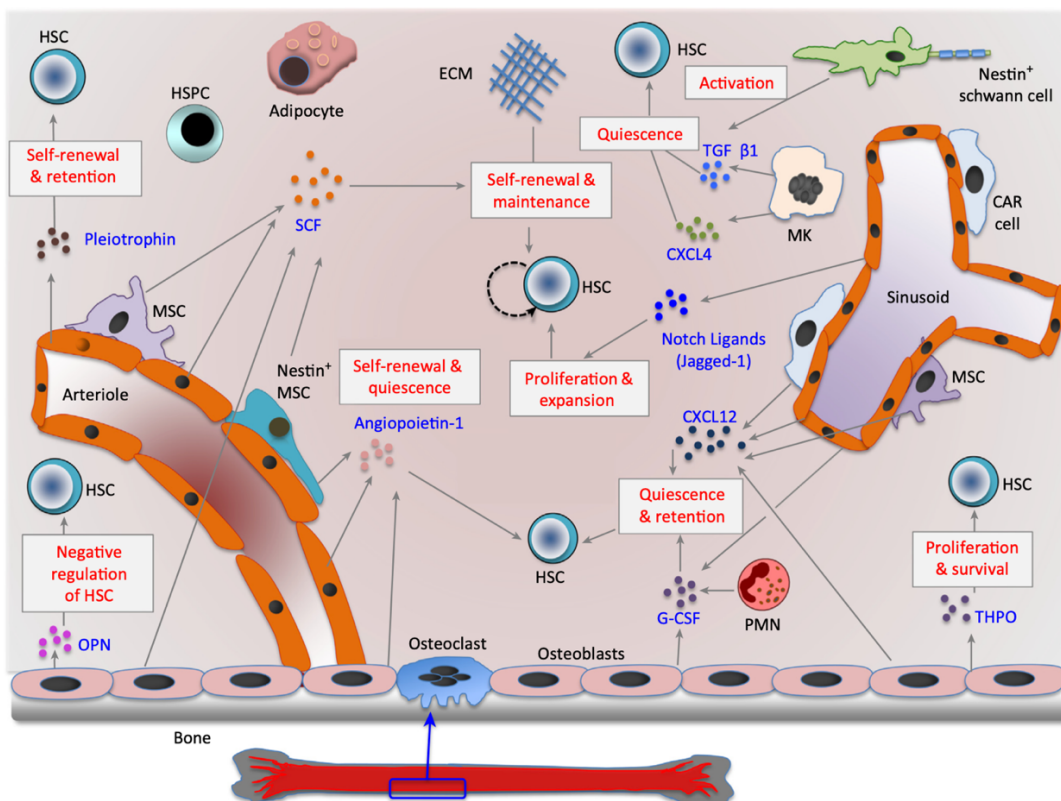


Рис. 1.1. Ніша гемопоетичних стовбурових клітин у червоному кістковому мозку [70].

ГСК мають здатність до самовідновлення у специфічній **ніші**, або мікросередовищі спочатку аорто-гонадо-мезонефросу, жовткового мішку, плаценти, печінки плода, селезінки та кісткового мозку, яке має вплив на клітини та регулює ріст та проліферацію завдяки допоміжним компонентам [68].

Мікрооточення КМ виділяє певні фактори - цитокіні, які регулюють гемопоез у цілому та впливають на ріст та диференціацію гемопоетичних стовбурових клітин. Цитокіні, які синтезуються стромою КМ регулюють самовідновлення, апоптоз, стан спокою та диференціацію ГСК [62].

Клітини, які знаходяться у природній ніші та впливають на ГСК:

1. Мезенхімальні стромальні клітини – мультипотентні стовбурові скітини, які володіють фібробластичною морфологією та у подальшому можуть диференціюватися у клітини кісткової, жирової та хрящової тканини. У КМ займають одну з головних ролей у підтримці ГСК за допомогою виділення розчинних факторів розчинних факторів (CXCL12, SCF та ангіопоетин) [71].

2. Ендотеліальні клітини (ЕК) – грають велику роль в утворенні внутрішньої оболонки кровоносних судин, тим самим забезпечуючи обмін речовин та підтримують судини у стані тонуусу. За допомогою продукції ліганду Notch, CXCL12, SCF і плейотрофіну здатні до регулювання ГСК. Підвид артеріальних ЕК підтримують ГСК у стані спокою, впливають на їх самовідновлення за рахунок продукування нетрину-1 та фактору стовбурових клітин. Підвид синусоїдних ЕК відповідає головним чином за проліферацію та мобілізацію ГСК. Після трансплантації гемопоетичних стовбурових клітин здатні до відновлення гемопоезу [71].

3. Адипоцити КМ – жирові клітини; сучасні дослідження відзначають, що вони здатні до регулювання процесу кровотворення за допомогою продукції адипонектину [71].

4. Остеолінійні клітини – клітини, які утворюють кісткову тканину та знаходяться на різних стадіях диференціації (остеобласти, остецити). За

допомогою ангіопоетину, CXCL12 або SDF1, SCF (ліганд KИT), тромбопоетину та остеопонтину (OPN) підключаються до регуляції ГСК [71].

5. Нервові волокна – грають важливу роль у проліферації та міграції ГСК [71].

6. Шванівські клітини – гліальні нервові клітини, які продукують багато факторів (IL-1beta, IL-6, IL-8, IL-11, IL-12, IL-15 and TGF-beta) для регуляції активації ГСК. Шванівськими клітинами окрім цього експресується маркерний гліальний фібрилярний кислий білок (GFAP). Завдяки активації клітинами трансформуючого фактора росту  $\beta$  (TGF $\beta$ ) вони здатні підтримувати стан спокою ГСК [72, 73].

7. Периваскулярні клітини – розташовані навколо стінок кровоносних судин та є основою судинної ніші КМ. За допомогою CXCL12 беруть участь у регуляції ГСК [74].

Таблиця 1.2

**Фактори в ніші кісткового мозку, що впливають на HSC ссавців [70]**

Фактор	Клітини, які секретують фактор у природній ніші	Вплив на ГСК
Фактор стовбурових клітин (SCF)	Остеобласти, ендотеліальні клітини, МСК, нестин-позитивні МСК	Індукування проліферації та самовідновлення ГСК за рахунок c-Kit сигналізу
Тромбопоетин (ТРО)	Остеобласти	Покращення самовідновлення ГСК за допомогою рецептора Mpl6
ГМ-КСФ	Остеобласти, ендотеліальні клітини	Індукування утримання та спокій клітин
Фактор стромальних клітин 1 (CXCL-12/SDF1)	Остеобласти, ендотеліальні клітини CAR-клітини, МСК, LepR <sup>+</sup> -периваскулярні клітини	Позитивне регулювання самовідновлення, утримання та функціонування клітин

Тромбоцитарний фактор 4 (CXCL-4)	Мегакаріоцити	Пригнічення самовідновлення та індукування спокою клітин
Плейотрофін	Синусоїдальні ендотеліальні клітини, LepR <sup>+</sup> - периваскулярні клітини КМ	Покращення самовідновлення та збереження КМ
Остеопонтин	Остеобластична лінія клітин	Негативне регулювання ГСК
Ангіопоетин-1	Остеобласти, остеопрогенітори, ендотеліальні клітини, нестин-позитивні МСК	Індукування самовідновлення та виживання клітин
Трансформуючий ростовий фактор бета-1 (TGF- $\beta$ 1)	Нестин-позитивні шванівські клітини, мегакаріоцити	Підтримка спокою ГСК, пригнічення активності клітинного циклу
Notch-ліганд Jagged1 (JAG1)	Остеобласти, ендотеліальні клітини, LepR <sup>+</sup> - периваскулярні клітини КМ	Підтримка самовідновлення і запобігання виснаженню ГСК

Отже, за допомогою аналізу даних вище, можна зробити висновок, що забезпечення певних умов для ГСК, які схожі на природні, дозволяє сконцентрувати стовбурові клітини під час їх підтримки *ex vivo* для подальшого культивування та використання у сучасній медицині.

### 1.5. Експериментальне моделювання умов культивування *ex vivo*

Моделювання специфічних умов для підтримки гемопоетичних стовбурових клітин залежить не тільки від потреб культивування, а також від вибраної стратегії.

Таблиця 1.3

#### Інженерні стратегії та платформи у відповідь на характеристики ніші ГСК [63]

Особливості ніші	Відповідні стратегії	Специфічні платформи
Біохімічне середовище	Регулюючі цитокіни або хімічні речовини	Пряме додавання або блокування факторів росту
Клітини, як живильне середовище	Імітація взаємодії клітини-клітини за допомогою спільної культури.	Система спільної культури на основі мезенхімальних стовбурових клітин (МСК) або ендотеліальних клітин пупкової вени (UVEC)
Середовище екстрацелюлярного матриксу	Симуляція взаємодій клітини та матриці	Платформи з матричними покриттями, наноструктуровані підкладки, децелюляризовані каркаси
Гіпоксичне середовище	Побудова гіпоксичної ніші	Гіпоксичний інкубатор або підтримка низького окислювального стресу



Високоякісне середовище обміну поживними речовинами	Технології мікромасштабів	Мікросфери, мікропориста структура, мікроканали, мікрофлюїдика та біодрук
3D-середовище	Культура на основі скаффолда	Гідрогелеві каркаси

Початкові дослідження Friedenstein A. J. та співавторів показало, що при додаванні клітин кісткового мозку як живильного середовища під час культивування значно збільшувалася колонієутворення. Це дослідження дає змогу зробити висновок, що для оптимальної підтримки культивування необхідне певне середовище та умови, під дією яких, є можливим досягнення ефективної проліферації та диференціювання стовбурових клітин [75].

Головним етапом підтримки ГСК під час культивування є підбір оптимального живильного середовища для клітин. Важливим аспектом є склад живильного середовища та різні додаткові речовини, які входять у склад і за допомогою яких можливо отримати максимальний проліферативний потенціал клітин. Поживні середовища відрізняються в залежності від типу клітин, а отже в осмотичною резистентністю та рН [76].

Культивування ГСК відбувається за допомогою цілого ряду живильних середовищ, наприклад:

1. StemPro-34 SFM (середовище без сироватки та глютаміну для підтримки розвитку гемопоетичних клітин людини в культурі, виділені з кісткового мозку, пуповинної та периферичної крові);
2. StemSpan™ Serum-Free Expansion Medium (SFEM);
3. DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) (містить глюкозу, амінокислоти та вітаміни);
4. PromoCell HPC Expansion Medium DXF (середовище без сироватки);
5. Alpha-MEM;

6. X-Vivo-10;
7. QBSF-60 (середовище без сироватки з L-глутаміном);
8. RPMI;
9. CellGro та інші [76].

Деякі дослідження були направлені на застосування стромальних фідерних шарів під час культивування ГСК пуповинної крові *in vitro*. Розроблені та досліджувані стромальні клітинні лінії експресували певні цитокіни (IL-6, (IL)-1 $\beta$ , GM-CSF, SCF) та ініціювали початок проліферації та подальшого клонального росту гемопоетичних стовбурових клітин [77].

Мезенхімальні стромальні клітини використовуються у підтримці ГСК *in vitro*, оскільки володіють достатньо великою проліферативною активністю. Потрібно відмітити, що з використанням МСК є можливим довготривале підтримання кровотворення *in vitro*. МСК мають ряд переваг: фідерні властивості до ГСК, доступна вартість та легкість у використанні, продукція необхідних для підтримки культур цитокінів [78].

Одним із перспективних методів моделювання умов для підтримки культивування ГСК є дослідження з використанням желеобразних мезенхімальних стовбурових клітин Уортона (WJ-MSC) або ендотеліальних клітин пупкової вени (UVECs) як системи спільної культури без сироватки на основі живильного шару з коктейлем цитокінів SCF, FLT3L і TPO у концентрації 100 нг/мл кожен. Аналіз загальної кількості ЯВК та клоногенний аналіз проводився на 10-й день після культивування. Було доведено, що WJ-MSC та UVECs здатні до ефективною підтримки гемопоетичних клітин кордової крові людини CD34<sup>+</sup> в якості живильної платформи. Сучасні данні вказують на відмінності мікросередовища КМ та пуповини, де знаходяться стовбурові клітини, але експресія мезенхімальними стовбуровими клітинами Уортона G-CSF, GM-CSF та CD117 та виділення ендотеліальними клітинами пупкової вени інших факторів призвела до експансії ГСК з кордової крові *ex vivo* [79].

У дослідженнях Voitano, Anthony та співавторів було описано технологію за допомогою бібліотеки молекул для виявлення речовин, які контролюють ріст та

проліферацію дорослих та ембріональних стовбурових клітин. Для культивування було використано живильне середовище, яке не містило сироватку з додаванням ТНРО, SCF, Flt3L та IL-6. Матеріал дослідження - CD34<sup>+</sup> клітини людини, які були виділені з мобілізованої периферійної крові донорів. У ході експерименту доведено, що додавання похідного пурину (StemRegenin1) викликає збільшення кількості культивованих клітин CD34<sup>+</sup> кордової крові людини через 5-7 днів майже у 50 разів та збільшення кількості ГСК людини. Також доведено, що культура клітин з додаванням похідного пурину (SR1) схильна до довготривалої трансплантації, яка виявилася при експериментах на мишах з введенням CD34<sup>+</sup> клітин людини [80].

Агоністи акрилових вуглеводних рецепторів (AhR) мають певний вплив на культивування гемопоетичних стовбурових клітин кордової крові. Так, під час перевірки бібліотек, було знайдено речовину – похідну піримідоіндолу (UM171), яка продемонструвала позитивний вплив на культивовані CD34<sup>+</sup>CD45RA клітини з мобілізованої периферичної крові [81].

При дослідженні розробки платформ експансії гемопоетичних стовбурових клітин з кордової крові *ex vivo* Branco, André та співавтори встановили, що підвищення ефекту обумовлюють оптимізовані цитокінові комплекси, які були використані у процесі дослідження. За платформи експансії приймали систему культивування рідкої суспензії (CS HSPC) та систему спільного культивування з мезенхімальними стромальними клітинними (BM MSC), які були отримані з кісткового мозку (CS HSPC/MSC). Було використано наступний комплекс цитокінів: фактор стовбурових клітин (SCF), FMS-подібний ліганд тирозинкінази 3 (Flt-3L) і тромбопоетин (ТРО). Результати дослідження було оцінено за допомогою використання клоногенного аналізу із визначенням гранулоцитарно-макрофагальних колонієутворюючих одиниць, еритроїдних бурст-утворюючих одиниць, багатолінійної колонієутворюючої одиниці та загальної кількості ядромісних клітин. У результаті дослідження було визначено, що платформи експансії мали великий потенціал при додаванні

оновлених цитокинових комплексів, які покращили процес вирощування та диференціювання гемопоетичних клітин попередників [82].

У дослідженні Wilkinson та співавторів було сформовано протокол для довготривалої експансії ГСК мишей *ex vivo* (1-2 місяці) з повним видалення сироваткового альбуміну для запобігання забруднення середовища культивування. Під час дослідження було виявлено, що існуючі культуральні системи гальмували експансію ГСК та у результаті було досягнуто 10-кратне збільшення стовбурових клітин за допомогою послідовної оптимізації живильного середовища, зміни концентрації цитокинів та повного виключення сироваткового альбуміну. Було доведено, що 100 нг/мл тромбопоетину (ТРО) та 10 нг/мл фактора стовбурових клітин (SCF) були оптимальними для культивування ГСК миші та індукували проліферацію CD150+CD34-KSL HSC над CD150-CD34-KSL HSC (довгострокові та короткострокові культури) [83].

Сучасні культуральні середовища для експансії ГСК містять сироватковий альбумін у різних формах - фетальна бичача сироватка (FBS), бичачий сироватковий альбумін (BSA) або рекомбінантний сироватковий альбумін (RSA). Ці компоненти живильного середовища є джерелом забруднення культури стовбурових клітин, і в подальшому можуть гальмувати ріст та проліферацію, тому пошук альтернативних варіантів, є актуальним для підтримки культури *ex vivo*. Одним із таких варіантів є використання полівінілового спирту (ПВС), як було використано у дослідженні [83].

Синтетичний полімерний полівініловий спирт (ПВС) не містить біологічних забруднювачів та має ряд переваг (низька вартість, безпека та легка відтворюваність), а отже може бути використан як замітник сироваткового альбуміну для культивування клітин [84].

Дослідження Nishimura, Toshinobu та співавторів за допомогою ІФА показали, що полівініловий спирт стабілізував концентрацію одного з основних цитокинів, які мають вплив на проліферацію клітин – тромбопоетину. У культурах первинної гострої мієлоїдної лейкемії людини (AML) використання полівінілового спирту у комбінації з інсулін-трансферин-селен-етаноламіном

(ITSE, Insulin-Transferrin-Selenium-Ethanolamine) дало змогу збільшити кількість культивованих клітин [84].

В експериментальній роботі, яка засновується на використанні 3D реконструкції штучного кісткового мозку із полідиметилсилоксану (PDMS), який імітує природню нішу для створення оптимального культивування ГСК, було використано покриття за допомогою оксиду кремнію та використання 0,5 і 1 мМ вальпроєвої кислоти (VPA; Sigma Aldrich) або 0,5 і 1 мкМ антагоністу арилвуглеводневого рецептора (StemRegenin1 (SR-1); Stemcell). Було підтверджено, що вальпроєва кислота стимулювала кращу проліферацію CD34+ клітин з мобілізованої периферичної крові під час культивування. Використання SR-1 призвело до незначних змін під час експансії клітин у середовищі. Крім цього використання 3D платформи для підтримання клітин з оксидом кремнію відзначило позитивний вплив на посилення рісту та проліферації CD34+ клітин. Це було обумовлено високою гідрофільністю платформи з оксидом кремнію, яка слугувала як матеріал для зчеплення між клітинами та структурами PDMS. У результаті було досягнуто покращення життєздатності та росту ГСК [85].

Під час розробки тривимірної моделі периваскулярної тканини для детального дослідження процесів в ніші КМ було створено 3D моделі на желатинових гідрогелях, з доповненням у вигляді метакриламиду. Основні клітинні елементи платформи – мезенхімальні стромальні та ендотеліальні клітини пупкової вени людини. Периваскулярна ніша є важливою платформою для підтримки молекулярних сигналів, які впливають на ГСК. Результат дослідження привів до ідентифікації специфічних факторів, які впливають на гемопоетичні стовбурові клітини. Під час дослідження використовували кондиціоновані та звичайні середовища для культивування ГСК *in vitro*. Результат показав, що вплив ковалентних факторів відрізняється та має сильніший вплив на клітини за рахунок збільшення кількості ГСК [86].

У сучасних експериментах існує велика кількість досліджуваних стратегій та методів для оптимальної підтримки гемопоетичних стовбурових клітин *in vitro*, але на сьогоднішній день не існує ідеального способу. Останнім часом

з'явилися публікації про не менше значення у вирощуванні клітин підложки, яка покращує результати культивування. Гелі, які отримані при злитті компонентів майбутнього геля, завжди мають частину непрореагованих токсичних залишків. Як позбавитись їх і як перевірити чистоту і біосумісність очищеного різними способами геля? Ми постаралися відповісти на ці питання у дипломній роботі. Для цього ми використовували МТТ тест, який є сучасним об'єктивним підходом для визначення цитотоксичності геля.

## **ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА**

### **РОЗДІЛ 2**

#### **ОБ'ЄКТИ, МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ**

##### **2.1. Матеріали та методи дослідження**

###### **2.1.1. Матеріали досліджень**

Дослідження були проведені з використанням наступних реактивів:

- Середовище для культивування Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (Sigma, США);
- клітинна лінія MCF-7;
- 50 нг/мл IL-3 (Sigma, США);
- 20 нг/мл IL-6, (Sigma, США);
- 10 нг/мл GM-CSF (Sigma, США);
- етиловий спирт 70% (Сановет, Україна);
- етиловий спирт 95,1 %;
- фізіологічний розчин у фосфатному буфері (PBS) (Sigma, США);
- фетальна теляча сироватка (Sigma, США);
- трипановий синій (Sigma, США);
- ізопропанол (Німеччина);
- Димексид (ДМСО) (ПАТ «Лубнифарм», Україна);
- 0,04 М HCl;

- Сухий 3-(4,5-диметилтіазол-2-іл)-2,5-дифеніл-тетразолію бромід (МТТ) (Sigma, США);
- Трипсин-ЕДТА 1X (Sigma, США);
- Pen-Strep L-glutamine 100X (Sigma, США);
- замінні амінокислоти (50×) і незамінні амінокислоти (100×) (Sigma, США);
- вітаміни (100×);
- піруват натрію (2,2 %);
- L-глутамін (200 мМ/л);
- Нерес-буфер (1 М/л) (Serva, Німеччина);
- бактоагар (Difco, Німеччина);
- амфотерицин;
- пеніцилін;
- стрептоміцин.

У дослідженнях використовувалось наступне обладнання:

- камера Горяєва (МиниМед, Росія);
- ламінарний бокс (AIRFLOW, США);
- CO<sub>2</sub> інкубатор (Joan, Франція);
- інвертований мікроскоп (Olympus, США);
- трансмісійний мікроскоп (Leica DMDL);
- конічні пробірки Eppendorf, стерильні;
- конічні пробірки Falcon 15 мл, стерильні;
- пробірки Falcon 50 мл, стерильні;
- автоматичні мікропіпетки (Gilson, Велика Британія);
- пластикові матраси NUNC, стерильні;
- пластикові 24-лункові планшети NUNC, стерильні;
- пластикові 96-лункові планшети NUNC;
- аналітичні ваги (Cytogenex);
- фотоколориметр (Dynatech MR 4000);

- фільтри з довжинами хвиль: 410 nm і 630 nm;
- принтер (Epson LX – 400);
- центрифуга (Jouan M 14.11; Labofuge 200, Sepatech, Германія);
- Cytospin-3 (Shandon, Great Britain).

Зразки КК від здорових породіль без патології вагітності було отримано в пологових відділеннях медичних установ м. Києва, акредитованих на цю діяльність. Узяття КК проводилося на основі інформованої письмової згоди жінки на надання матеріалу для дослідницьких цілей. Забір крові проводився з дотриманням правил асептики.

Кров збирали у стерильні скляні флакони, об'ємом 100 або 250 мл, що містили натрієву сіль гепарину (Белмедпрепарат, Білорусь), без консервантів у кінцевій концентрації 20 Од/мл. Транспортування матеріалу до місця подальшої обробки проводилося з підтримкою температурного режиму в межах 18-20°C. Час від здійснення забору КК до початку досліджень не перевищував 4-х годин.

Кількість ЯВК у отриманих суспензіях і фракціях визначали за загальноприйнятим методом підрахунку лейкоцитів під мікроскопом з використанням камери Горяєва [3, 8, 18].

**2.1.2. Характеристика клітинної лінії MCF-7 та умов культивування.** Для визначення токсичності гелів використовували клітинну лінію MCF-7.

Клітинну лінію заказували у сартифікованому банку клітинних культур Інституту експериментальної онкології, патології і радіобіології НАНУ. У лабораторії її для адаптації підтримували 2 тижні зі зміною живильного середовища двічі на тиждень. Використовували рідке живильне середовище DMEM з додаванням 10% фетальної телячої сироватки (FBS), 2 мМ L-глютаміну і антибіотиків (пеніциліну і стрептоміцину по 100 од/мл). Концентрація клітин при посадці складала  $1 \times 10^4$  клітин/см<sup>2</sup>. Клітини лінії MCF-7 культивували у 6-луночних планшетах у CO<sub>2</sub> інкубаторі при температурі 37°C і 5% CO<sub>2</sub>.

Кількість культивованих клітин рахували у камері Горяєва. Їх



концентрація досягала  $10^6$ - $10^7$  кл/мл. Вживаність клітин знаходилася у межах 90-96% Оцінювали морфологічні показники культур. В процесі роботи з лінією вона характеризувалася однорідністю, а її морфологічні ознаки відповідали клітинам лінії MCF-7.

**2.1.3. Отримання моноклеарної фракції клітин кордової крові.** З метою отримання фракції моноклеарів КК у роботі використовували 1 – спонтанне відстоювання; 2 – в градієнті Ficoll-Нураque (1,065 г/мл) (Sigma, США); 3 – в градієнті Нустораque (1,077 г/мл) (Sigma, США); 4 – дворазове центрифугування в градієнті Нустораque (1,077 г/мл).

Ефективність застосування методів оцінювали за кількістю виділених ядровмісних клітин (ЯВК) і кількості клоногенних попередників гранулоцитарно-макрофагального ряду (КУО-ГМ) в агаровій культурі [40].

При використанні методів центрифугування клітин у градієнті щільності Нустораque (1,077г/мл), кордову кров, розведену 1:1 PBS, нашаровували на розчин Нустораque, щільністю 1,077 г/мл чи 1,065 г/мл у співвідношенні 2:1 і центрифугували при швидкості 430 G протягом 30 хвилин у стандартних умовах, тричі відмивали і виділяли суспензію ядровмісних клітин. Їх підрахунок проводили в камері Горяєва, як описано вище. Готували цитопрепарати з використанням цитоцентрифуги Cytospin-3 (Shandon, Great Britain) і забарвлювали за Романовським-Гімза.

**2.1.4. Спосіб тривалого культивування гемопоетичних клітин у культурі *in vitro*.** Гемопоетичні клітини КК культивували *in vitro*. Досліджувані фракції моноклеарів КК, виділені методом одноразового центрифугування в градієнті щільності Нустораque 1,077 г/мл, розводили культуральним середовищем (DMEM + 15 % FCS + 1 % l-глутамін + 25 Од/мл канаміцин) до концентрації  $1 \times 10^5$ /мл. Клітинні суспензії переносили в шестилункові пластикові матраци Nunc. Культуральне середовище міняли кожні 72 години шляхом зміни половини супернатанту свіжим середовищем. Культивування проводили в CO<sub>2</sub> - інкубаторі (Joan, Франція) при 5% CO<sub>2</sub>, 37°C і абсолютній вологості, протягом 5 тижнів [3].

### **2.1.5. Додавання комплексу цитокінів у культуральне середовище.**

Оцінювали вплив екзогенних цитокінів, які додавали в культуральну систему, при культивуванні гемопоетичних клітин. Використовували комбінацію цитокінів і факторів росту у наступних концентраціях: 50 нг/мл рекомбінантного інтерлейкіну-3 людини (IL-3, Sigma, США); 20 нг/мл рекомбінантного інтерлейкіну-6 людини (IL-6, Sigma, США); 10 нг/мл рекомбінантного гранулоцитарно-макрофагального колонієстимулюючого фактора людини (GM-CSF, Sigma, США).

У процесі культивування, на 2-му, 3-му і 5-му тижнях оцінювали зміни в середніх кількостях ЯВК і проводили клоногенний аналіз з підрахунком КУО-ГМ у напіврідкому агаровому середовищі.

**2.1.6. Клоногенний спосіб визначення клітин-попередників у одношаровому агаровому середовищі.** Для оцінки клоногенної активності клітин на етапах культивування, використовували клоногенний аналіз із визначенням гранулоцитарно-макрофагальних колонієутворюючих одиниць (КУО-ГМ) за методом Pluznik D.H., Sachs L. і Pike B.L., Robinson W.A., у модифікації, з використанням одношарового агарового середовища (агар Difco 0,33%) [35]. Суть методу культивування у м'якому агарі Difco полягає в тому, що при експлантації суспензії кровотворних клітин у строго визначених умовах, у присутності колонієстимулюючого чинника (ГМ-КСФ), в агарі, протягом 10-14 днів, формуються колонії-клони, кількість яких дозволяє визначити вміст клітин-попередників гранулоцитарно-макрофагального ряду (КУО-ГМ) [37, 57].

Досліджувану суспензію клітин розливали у пеніцилінові флакони в об'ємі 0,1 мл із вмістом ядерних клітин  $3,0 \times 10^5$ /мл для клітин моноклеарної фракції КК, додавали 3 мл підготованого агарового середовища, перемішували за допомогою семплера і переносили по 1 мл на чашку Петрі (Nunc) діаметром 35,0 мм. Таким чином, концентрація клітин для моноклеарної фракції КК складала  $1 \times 10^5$  клітин на чашку. GM-CSF в концентрації 20 нг/мл вносили перед додаванням агарового середовища до клітинної суспензії. Після застигання агару чашки поміщали в CO<sub>2</sub>-інкубатор.

Всі маніпуляції виконувалися із строгим дотриманням правил асептики, у стерильній камері з ламінарним потоком повітря (Jouan, Франція). Культивування проводили в CO<sub>2</sub>-інкубаторі за температури 37°C в умовах 100 % вологості з 5 % CO<sub>2</sub> протягом 14 днів.

**2.1.7. Проведення МТТ-тесту.** МТТ - розчинний аналог барвника нітросинього тетразоліа (диметилгіазоліл - дифенілбромід тетразоліа).

Це колориметричний метод для оцінки метаболічної активності клітин. Суть метода заключається у тому, що МТТ-реагент під дією мітохондріальних дегідрогеназ життєздатних клітин перетворюється у нерозчинний у воді фармазан фіолетого кольору різної інтенсивності, яка розпізнається за допомогою спектрофотометра.

Для отримання розчину МТТ з концентрацією 20 мг/мл 35 мг сухої речовини МТТ розчиняли у 1,75 мл етилового спирту. Далі готували розчин, у якому одна частина концентрованого розчину МТТ розчинялася у 3 частинах PBS для отримання кінцевої концентрації 5 мг/мл.

На першу добу в 24-лунокові планшети з гелевими підкладками різного часу відмивки (6 годин, 12 годин, 24 години) вносили суспензію культивованих клітин MCF-7 у живильному середовищі DMEM загальним об'ємом 1000 мкл. Концентрація клітин в кожній з лунок становила  $4 \times 10^4$ . Планшети утримували у CO<sub>2</sub> інкубаторі 24 години.

На другу добу додавали по 100 мкл фетальної телячої сироватки в кожен лунку. На третю добу оцінювали морфологію культивованих клітин під світловим мікроскопом. Після інкубації перевіряли наявність кристалів формагану під інвертованим мікроскопом. Далі вміст кожної з лунок переносили у конічні мікропробірки Eppendorf, які центрифугували протягом 5 хв. Відбирали надосадову рідину. Осад, що є кристалами формагану, розчиняли в 100 мкл ізопропанолу з 0,04 М HCl. Центрифугували 5 хв при 2160 g [22].

Аналіз на цитотоксичність гелів проводили на спектрофотометрі при довжинах хвиль: 410 нм, 630 нм та 410/630 нм. Результати визначалися як одиниці абсорбції.

Отримані дані перераховували у відсотки життєздатних клітин. Оскільки всі групи даних підпорядковувалися закону нормального розподілу, всі розрахунки з визначення статистичної достовірності проводили за допомогою критерію Ст'юдента (рівень значущості  $p \leq 0,05$ ). Обробку даних здійснювали у програмі Microsoft Excel 2010.

## РОЗДІЛ 3.

### РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

#### 3.1. Результати досліджень

##### 3.1.1. Вибір способу виділення мононуклеарної фракції кордової крові.

Істотні відмінності між джерелами гемопоетичної тканини – КМ і КК, зумовили необхідність пошуку ефективного методу підготовки і сепарації ГСК з КК.

Визначенню оптимальних умов виділення гемопоетичних клітин-попередників присвячена велика кількість досліджень, проте до теперішнього часу думки авторів за оцінкою результатів і ефективності застосування кожного з них не однозначні, а деколи суперечливі [7, 8, 9].

У наших дослідженнях ми порівнювали декілька методів осадження еритроцитів і виділення кровотворних попередників КК:

- метод спонтанного відстоювання КК;
- метод сепарації в градієнті низької щільності Ficoll-Нураque (1,065 г/мл), із збором і відмиванням як інтерфазного кільця, що містить мононуклеари, так і розчину градієнта;
- метод сепарації в градієнті щільності Nystoraque (1,077 г/мл);
- метод дворазового центрифугування в градієнті щільності Nystoraque (1,077 г/мл).

В роботі було використано 18 зразків КК.

Оцінку функціональної активності ГКП КК, отриманих методами спонтанного відстоювання, а також в градієнтах низької і високої щільності,

проводили за результатами культивування клітин у м'якому агарі з підрахунком колоній і кластерів (КУКк і КлУО), утворених клітинами-попередниками гранулоцитарно-макрофагального ряду. За колонію приймали клітинні агрегати, які склали 40 і більше клітин. Оцінювали ефективність колонієутворення за сумою колоній і кластерів (КУО-ГМ) при експлантації в агар  $1 \times 10^5$  ЯВК на чашку. Підраховували проліферативний потенціал (ПП) і абсолютну кількість клітин-попередників грануломоноцитопоезу в 1 мл (КУО-ГМ в 1 мл суспензії ЯВК).

З метою стандартизації умов експерименту весь об'єм КК, отриманої від одного донора, розводили 1:1 розчином PBS і рівні об'єми використовували для виділення моноклеарної фракції. Про ефективність методів судили за кількістю виділених ядровмісних клітин (ЯВК) і результатами клоногенного культивування гемопоетичних клітин-попередників у м'якому агарі.

Метод спонтанного відстоювання дозволив отримати кількість ЯВК рівну  $17,65 \pm 2,84 \times 10^6$ /мл (рис. 3.1).

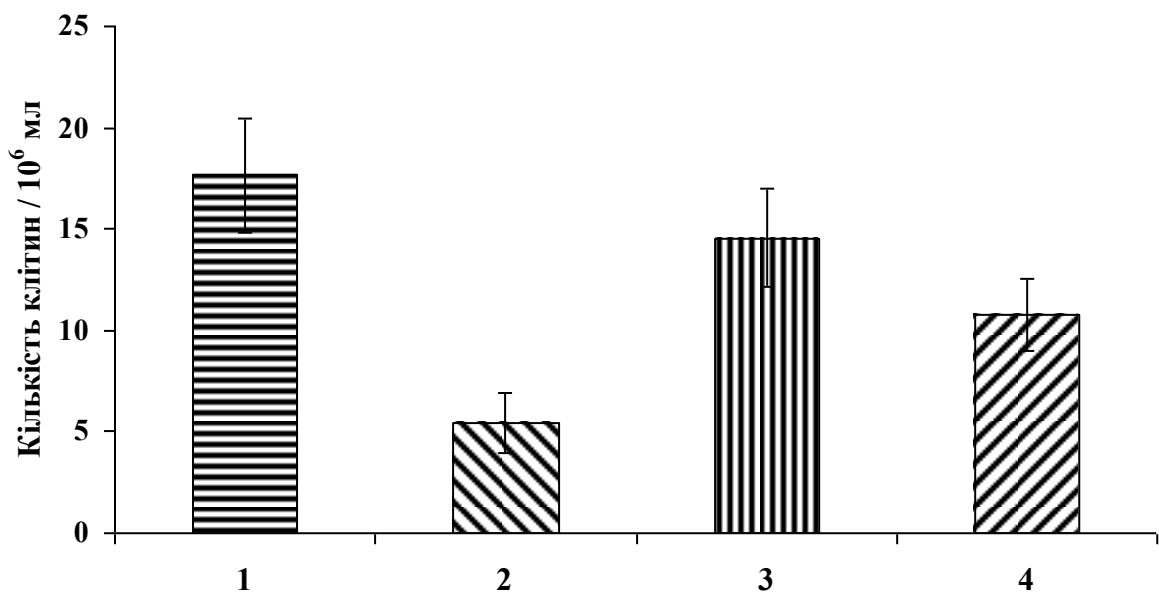


Рис. 3.1. Показники кількості ядровмісних клітин КК, отриманих різними методами: 1 – спонтанне відстоювання; 2 – в градієнті Ficoll-Нупаке (1,065 г/мл); 3 – в градієнті Нупстаке (1,077 г/мл); 4 – дворазове центрифугування в градієнті Нупстаке (1,077 г/мл).

Проте, незважаючи на велику кількість ЯВК, даний метод має істотний недолік – наявність значної кількості зрілих клітинних форм.

Подальший аналіз було спрямовано на оцінку результатів виділення мононуклеарів КК методами центрифугування клітин у градієнтах низької (1,065 г/мл) і високої (1,077 г/мл) щільності порівняно із спонтанним відстоюванням.

При використанні Ficoll-Нураque низької щільності (1,065 г/мл), було відмічено втрату значної кількості ЯВК (рис.3.1). Цей показник складав  $5,43 \pm 1,47$  у порівнянні з їх чисельністю при використанні методу спонтанного відстоювання ( $17,65 \pm 2,84$ ) ( $p < 0,001$ ). Проте популяція була представлена переважно мононуклеарами і позбавлена домішки еритроцитів.

Кращі результати отримано при використанні градієнта щільності Hystoraque (1,077 г/мл). Кількість ЯВК у популяції, отриманій даним методом, складала  $14,56 \pm 2,45 \times 10^5$  експлантованих клітин, що перевищує у 2,7 разу це значення для клітин, отриманих при використанні градієнта Ficoll-Нураque низької щільності і порівнювано з кількістю ЯВК при спонтанному відстоюванні ( $p < 0,01$ ).

Кількість ЯВК при реалізації методу дворазового центрифугування клітинної суспензії з використанням Hystoraque 1,077 г/мл складала  $10,76 \pm 1,81$ , що не дозволило отримати достовірно кращі результати, порівняно з процедурою сепарації шляхом одноразового центрифугування клітин.

Гемопоетичні клітини, отримані методом спонтанного відстоювання, при експлантації в агар  $1 \times 10^5$  клітин, утворювали в культурі всі типи колоній (компактні, компактні з вінчиком і дифузні) і кластерів (великих і малих), властиві клітинам-попередникам грануломоноцитопоезу, проте значення всіх показників були на низькому рівні (табл. 3.1).

Так, кількість колоній I, II, III-го типів складала  $1,0 \pm 1,45$ ;  $1,8 \pm 1,45$  і  $1,2 \pm 1,43$  відповідно, а їх сума дорівнювала  $4,0 \pm 3,85$ . Кількість кластерів складала  $6,9 \pm 4,37$  – великих і  $7,4 \pm 3,37$  – малих відповідно. Їх сума дорівнювала  $14,3 \pm 7,59$ . Сума всіх клітинних агрегатів була  $18,33 \pm 9,84$ , при цьому в культурах переважали кластери над колоніями, що свідчило про присутність у суспензії

великої кількості зрілих клітин, що знаходяться на термінальних стадіях диференціювання.

Таким чином, даний метод дозволяє сконцентрувати ЯВК, але не дозволяє накопичити у великій кількості гемопоетичні клітини-попередники.

Застосування методу сепарації в градієнті щільності Ficoll-Нураque (1,065 г/мл) дозволило отримати вищі показники клоногенної активності клітин-попередників, порівняно з методом спонтанного відстоювання (табл. 3.1). При посадці в агар  $1 \times 10^5$  ЯВК, виділених у градієнті Ficoll-Нураque, достовірних відмінностей у кількості колоній I типу не виявлено. Відмічено збільшення кількості колоній II-го і III-го типів ( $27,77 \pm 7,27$  і  $22,9 \pm 5,41$ , відповідно) ( $p < 0,001$ ), що приводило до збільшення суми колонієутворюючих одиниць до  $56,7 \pm 9,05$  ( $p < 0,001$ ). Зростала кількість малих кластерів  $19,6 \pm 4,05$  ( $p < 0,01$ ) і сумарна кількість КЛУО –  $34,6 \pm 6,09$  ( $p < 0,01$ ). Сумарна кількість всіх клітинних агрегатів (КУО-ГМ) склала  $91,24 \pm 11,02$ , що у 5 разів вище за даний показник при спонтанному відстоюванні ( $p < 0,001$ ).

Таблиця 3.1

**Клоногенні попередники кордової крові в агаровій культурі після виділення різними методами (n=18)**

Показники колонії			Методи отримання фракції мононуклеарів КК			
			1. Спонтанне відстоювання	2. Ficoll-Нураque 1,065 г/мл	3. Histopaque 1,077 г/мл	4. 2x Histopaque 1,077 г/мл
КУОк/1 × 10 <sup>5</sup>	Типи колоній	I	1,0 ± 1,45	6,0 ± 4,24	8,9 ± 5,17	9,0 ± 4,22
		II	1,8 ± 1,45	27,77 ± 7,27 1-2***	42,3 ± 8,69 1-3***	46,9 ± 9,41 1-4***
		III	1,2 ± 1,43	22,9 ± 5,41 1-2***	36,3 ± 6,94 1-3***	49,8 ± 7,55 1-4***
Сума КУОк/1 × 10 <sup>5</sup> кластери			4,0 ± 3,85	56,7 ± 9,05 1-2***	87,5 ± 11,37 1-3 ***, 2-3*	107,1 ± 12,79 1-4***, 2-4*
КЛУО к/1 × 1	Типи клас	великі	6,9 ± 4,37	15,0 ± 3,95	19,8 ± 5,31	17,6 ± 5,64

	малі	$7,4 \pm 3,37$	$19,6 \pm 4,05$ 1-2**	$25,8 \pm 5,88$ 1-3**	$29,6 \pm 7,8$ 1-4**
Сума КЛУО/ $1 \times 10^5$		$14,3 \pm 7,59$	$34,6 \pm 6,09$ 1-2**	$45,6 \pm 9,73$ 1-3**	$47,2 \pm 11,0$ 1-4**
Сума КУО-ГМ/ $1 \times 10^5$		$18,33 \pm 9,84$	$91,24 \pm 11,02$ 1-2***	$133,11 \pm 15,5$ 1-3***, 2-3*	$154,3 \pm 17,54$ 1-4***

Примітка: \* – відмінності достовірно відрізняються (\* –  $p < 0,05$ ; \*\* –  $p < 0,01$ ; \*\*\* –  $p < 0,001$ ).

Таким чином, метод сепарації у градієнті щільності Ficoll-Нураque (1,065 г/мл) дозволив збагатити фракцію клоногенними кровотворними попередниками.

Показники клоногенної активності клітин, виділених у градієнті щільності Nystoraque (1,077 г/мл) при одноразовому центрифугуванні перевищували аналогічні при використанні спонтанного відстоювання і градієнта низької щільності Ficoll-Нураque. Кількість КУОк цієї серії складала  $87,5 \pm 11,37$ , що в 22 рази вище за даний показник при спонтанному відстоюванні ( $4,0 \pm 3,85$ ) ( $p < 0,001$ ) і в 1,5 разу вище, ніж при використанні Ficoll-Нураque (1,065 г/мл) ( $56,7 \pm 0,05$ ) ( $p < 0,05$ ).

Застосування методу дворазового центрифугування у градієнті щільності Nystoraque (1,077 г/мл) не дозволило отримати достовірно кращі результати в показниках клоногенної активності виділених клітин, порівняно з одноразовим центрифугуванням. Сума КУОк становила  $107,1 \pm 12,79$  і складалася з колоній I, II і III-го типів ( $9,0 \pm 4,22$ ,  $46,9 \pm 9,41$  і  $49,8 \pm 7,55$ , відповідно). Сума кластерів складала  $47,2 \pm 11,0$ , при цьому кількість малих була  $29,6 \pm 7,8$ , а великих –  $17,6 \pm 5,64$ . Сумарна кількість всіх клоногенних попередників гранулоцитарно-макрофагального ряду була  $154,3 \pm 17,54$ .

Аналізуючи отримані значення КУОк і КЛУО, обчислювали величину ПП за їх співвідношенням. ПП клоногенних попередників, отриманих при спонтанному відстоюванні, склав  $0,34 \pm 0,25$  (табл. 3.1). Низьке значення даного



показника свідчить про переважання у фракції клітин з обмеженою здатністю до проліферації, тобто кластерів. Крім того, присутність великої домішки еритроцитів, тромбоцитів, а також зрілих гранулоцитів у суспензії також може бути причиною низької проліферативної активності ГКП.

Показники ПП клітин-попередників, виділених у градієнтах низької і високої щільності, значно перевищували аналогічні, отримані методом спонтанного відстоювання. Так, ПП клітин, виділених з використанням Ficoll-Нураque (1,065 г/мл), склав  $1,70 \pm 0,38$ , із застосуванням градієнта Hystoraque (1,077 г/мл) –  $2,01 \pm 0,43$ , а у варіанті подвійного центрифугування –  $2,27 \pm 0,67$ , що вище за даний показник при спонтанному відстоюванні ( $p < 0,01$ ) (табл. 3.1).

Таблиця 3.2

**Проліферативний потенціал гемопоетичних клітин-попередників  
кордової крові після виділення різними методами (n=18)**

Показник	Методи отримання фракції мононуклеарів КК			
	1. Спонтанне відстоювання	2. Ficoll-Нураque 1,065 г/мл	3. Hystoraque 1,077 г/мл	4. 2x Hystoraque 1,065 і 1,077 г/мл
ПП	$0,34 \pm 0,25$	$1,70 \pm 0,38$	$2,01 \pm 0,43$	$2,27 \pm 0,67$

Примітка: \* – відмінності достовірно відрізняються ( $p < 0,01$ ).

Реалізація методу дворазового центрифугування клітинної суспензії з використанням спочатку Hystoraque 1,065 г/мл, потім - Hystoraque 1,077 г/мл не дозволила отримати достовірно кращі результати, порівняно з одноразовою процедурою за чисельністю клоногенних клітин-попередників, їх проліферативному потенціалу. Це пояснюється втратою частини матеріала у процесі восьми процедур (двох - з фіколом при 430 G (1500 об/хв) і двічі по три - в результаті відмивання при 145 G (1000 об/хв).

Таким чином, в роботі нами проведений порівняльний аналіз різних методів виділення гемопоетичних клітин-попередників КК. Показано, що будь-яке

фракціонування приводить до втрати загальної кількості клітин. Метод сепарації в градієнті щільності Ficoll-Нураque 1,065 г/мл дозволяє збагатити фракцію клоногенними кровотворними попередниками, проте при цьому відбувається зменшення їх загальної кількості за рахунок неповного виділення моноклеарної фракції.

Найбільш ефективним, за результатами наших досліджень, є метод сепарації в градієнті щільності Нустораque 1,077 г/мл, який дозволяє виявити, накопичити і сконцентрувати ранні клітини-попередники грануломоноцитопоезу. Крім того, метод одноразового центрифугування має переваги перед методом подвійного центрифугування, при використанні якого збільшується час процедури отримання фракції КК, збагаченої моноклеарами, вірогідність контамінації зразка і значна втрата клітин. Таким чином, метод одноразового центрифугування в градієнті щільності Нустораque 1,077 г/мл є, на наш погляд, є більш технологічним.

**3.1.2. Вивчення токсичності гідрогелів і можливості використовувати їх в якості підложки для культивування ранніх гемопоетичних клітин з кордової крові.** Оскільки перед нами стояло завдання охарактеризувати систему для культивування кровотворних клітин і оцінити потенційні можливості клітин-попередників у ній, у першу чергу, постало питання про вплив матеріалу, з якого виготовлені гелеві підложки, на гемопоез. У разі визначення модулюючого впливу гелю на гемопоез, його застосування в якості основи для культивування навряд чи було б виправданим.

Для реалізації поставленого завдання проведено 3 серії експериментів, в яких клітини MCF7 культивували на підложках з гідрогелів, які перед експериментом відмивали у фізіологічному розчині NaCl 0,85% протягом 6, 12 і 24 години.

Оскільки відомо, що гідрогелі після полімеризації залишаються токсичними у зв'язку з присутністю складових геля, що не прореагували, в першу чергу постало питання про те, як позбутися токсичності геля. Виявилось,

що відмивка гелевих пластин, які виштамповані за розміром чашки Петрі (діаметр 5 см), у флаконі об'ємом 500 мл, дозволяє позбавитися токсичності [1].

В роботі були використані підложки з гідрогелю, які заздалегідь відмивали в фізіологічному розчині 0,85 % NaCl. Термін відмивки становив 6, 12, 24 години. Після відмивки пластини з гідрогелю переносили у чашки Петрі і поверх наносили клітини у повному живильному середовищі. Культивування клітин на підложках проводили у CO<sub>2</sub>-інкубаторії протягом 5 діб.

Визначали наявність цитотоксичних ефектів підложки з гідрогелю з різним терміном відмивки. 6 і 12 годин виявились недостатніми, щоб позбутися токсичності: вони володіли значним цитотоксичним ефектом. Так, при використанні підложки з терміном відмивки 6 годин залишалось живих клітин 20%, відмивка протягом 12 годин впливала на життєздатність клітин, але живих клітин спостерігалось не більше - 40%, і тільки при відмивці протягом 24 годин кількість живих клітин дорівнювала 90% (рис. 3.2.).

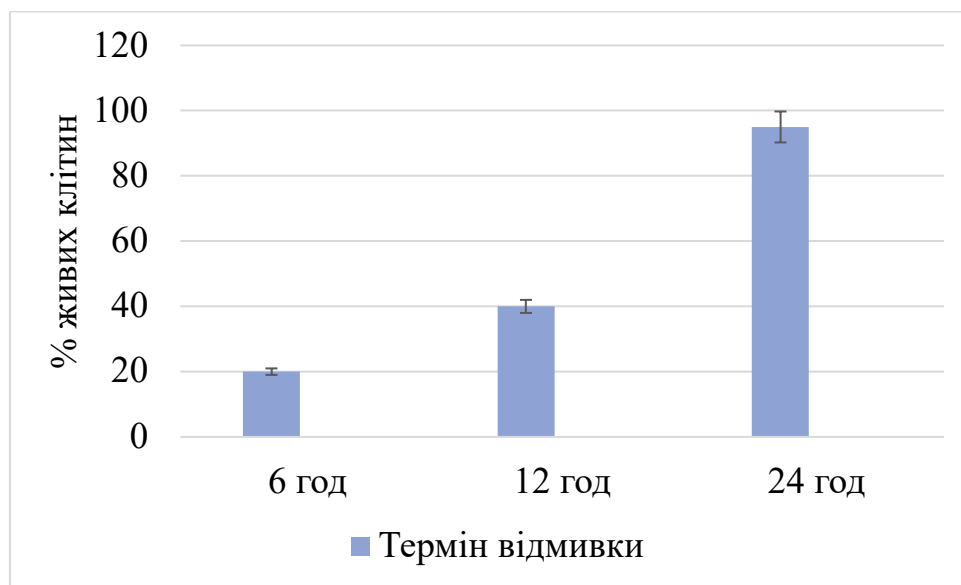


Рис. 3.2. Вплив терміну відмивки гелевих пластин на метаболізм життєздатних культивованих клітин. Оцінка життєздатності клітин за МТТ-тестом.

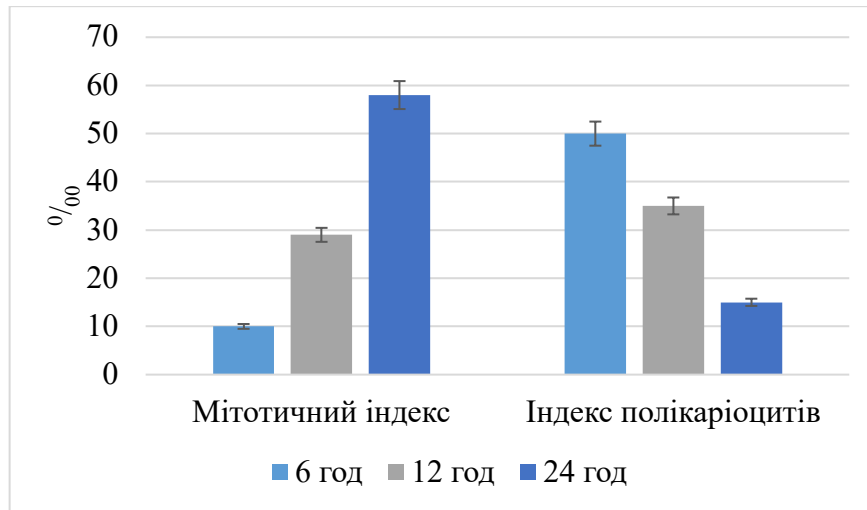


Рис. 3.3. Показники життєздатності в культурі клітин MCF-7 на 5-ту добу культивування в залежності від тривалості відмивки у фізіологічному розчині NaCl 0,85%.



Рис. 3.4. Мікрофотографія культури клітин аденокарциноми молочної залози MCF-7 на 72-гу годину культивування.

Таким чином, дослідження життєздатності клітин лінії MCF-7 (кількість живих клітин, їх проліферативна та мітотична активність, морфофункціональні

особливості клітин) в умовах впливу непрореагованих складових гідрогелю показало, що відмивка протягом 6 і 12 годин була недостатньою і призводила до зменшення щільності клітинної популяції, тобто проліферативна активність клітин зменшувалася. Спостерігалися клітини переважно полігональної форми з овальними ядрами. На препаратах виявлялися атипові багатоядерні клітини (рис. 3.4).

**3.1.3. Проліферативний потенціал гемопоетичних клітин-попередників кордової крові у процесі довготривалого культивування на гідрогелевих підложках.** Гемопоетичні клітини-попередники, виділені з кордової крові в градієнті щільності Nystopaque 1,077 г/мл, культивували у культурі *in vitro* на гідрогелевих підложках у суспензійній культурі. На кожному етапі експерименту, на 2-му, 3-му і 5-му тижнях, оцінювали зміни в середніх кількостях ЯВК у комірках планшетів і визначали їх клоногенну активність у м'якому агарі. Кількості ЯВК і гемопоетичних попередників (КУО-ГМ), отримані на кожному етапі культивування, порівнювали між собою, а також з даними значеннями для вихідної суспензії.

На початку культивування у кожен лунку планшету вносили  $1 \times 10^5$  клітин для суспензійної культури і таку саму кількість клітин для культури з напіврідким агаром. Визначали вихідну колонієутворюючу активність у присутності GM-CSF в концентрації 20 нг/мл, яка дорівнювала  $50,0 \pm 2,5$  на  $1 \times 10^5$  експлантованих клітин. Надалі у кожний зазначений термін (2, 3 і 5 тижнів) визначали КУО-ГМ з додаванням тієї ж самої концентрації.

Так, у зразках клітин, що культивуються за відсутності комплексу цитокінів і підложки, кількість ЯВК після 2 тижнів культивування знижувалася до  $0,50 \times 10^5$ , тобто у половину. Культивуванні цих клітин у напіврідкому гелі дозволило отримати одиничні колонії, їх КУОк дорівнювала  $9,0 \pm 1,2$  на  $1 \times 10^5$  експлантованих клітин. Колонії I, II, III-го типів складали  $0,20 \pm 0,33$ ,  $3,3 \pm 0,6$  і  $5,30 \pm 1,14$ , відповідно). Збільшувалася кількість малих кластерів ( $28,80 \pm 6,47$ ), що є свідченням згасання кровотворення.

У той же час через 2 тижня культивування додавання комплексу факторів дозволило отримати у суспензійній культурі  $1 \times 10^6$  клітин. Клоногенний аналіз клітин суспензійної культури у присутності коктейля факторів IL-3, IL-6, GM-CSF у цей термін культивування дозволив отримати величину КУОк, рівну  $60,00 \pm 3,14$  на  $1 \times 10^5$  експлантованих клітин на тлі збільшення ЯВК, що достовірно вище, ніж у вихідному значенні КУОк. У культурах переважали компактні колонії I типу ( $30,20 \pm 5,58$ ), вони склали приблизно 50 % від загальної кількості всіх колоній. Колонії II і III типу були на рівні  $16,50 \pm 2,59$  і  $14,30 \pm 3,21$ , відповідно.

На наступному етапі ми культивували суспензію клітин кордової крові на гелевій підложці у присутності названого коктейля факторів протягом 2 тижнів. Виявилось, що кількість ЯВК збільшувалася до  $2 \times 10^6$  клітин. У двотижневий термін величина КУОк дорівнювала  $72,0 \pm 2,8$ , що достовірно перевищувало дані, отримані у культурах з цитокінами. Різниця статистично достовірна ( $p < 0,05$ ).

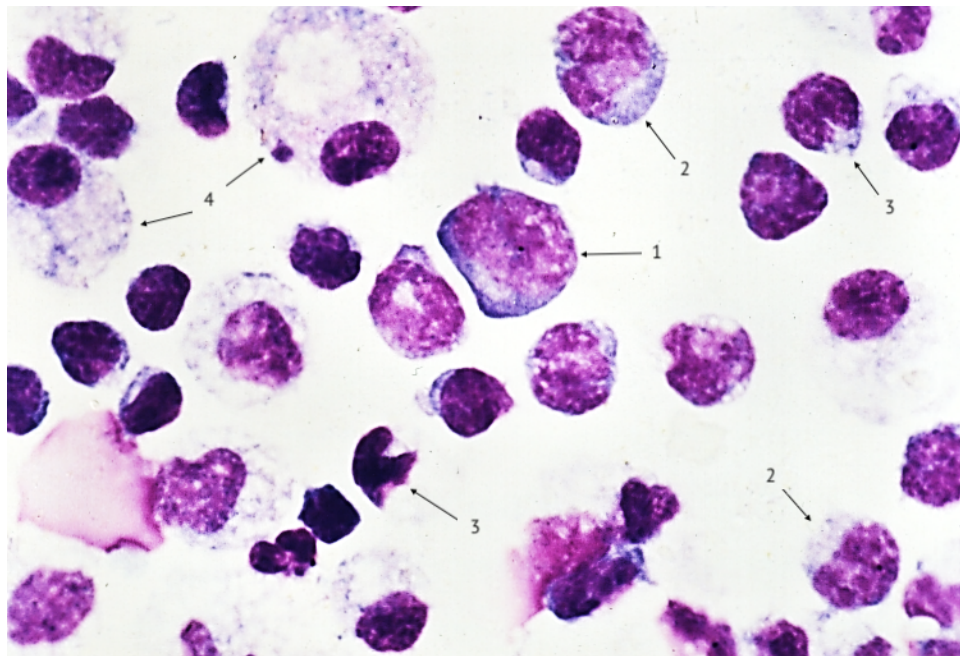


Рис. 3.5. Суспензійна культура кордової крові на 5-й тиждень культивування на гідрогелевій підложці у присутності комплексу цитокінів. 1 – бластна клітина, 2- міелоцити, 3-метаміелоцити, 4-макрофаги. Забарвлення за Паппенгеймом. Зб. 1000.

Через 3 тижні кількість ЯВК у культурі з додаванням комплексу факторів дорівнювала  $2,5 \pm 10^6$  клітин. Морфологічна картина суспензійної культури свідчила про наявність активного гемопоезу (рис.3.5). Субкультивування цих клітин у напіврідкому агарі демонструвало зростанням показників колонієутворення. Показник КУО-ГМ дорівнював для культур з комплексом факторів  $150,0 \pm 10,5$ , а на підложці з гідрогелю у присутності факторів в культурі –  $200,0 \pm 11,8$ . Через 5 тижнів культивування кількість ЯВК у суспензійній культурі з факторами дорівнювала  $3 \times 10^6$  клітин, а кількість колоній з цієї суспензійної культури дорівнювал  $250,0 \pm 5,3$  на  $1 \times 10^5$  експлантованих клітин (табл. 3.3). Натомість культивування на підложці у присутності факторів призводило до росту колонієутворення удвічі ( $521,5 \pm 7,5$ ) на тлі збільшення кількості клітин у суспензійній культурі до  $4 \times 10^6$  клітин, що достовірно вище, ніж при культивуванні з факторами без підложки ( $p < 0,05$ ).

Таблиця 3.3

**Колонієутворююча здатність і кількість ЯВК в культурі *in vitro* впродовж довготривалого культивування гемопоетичних клітин з КК на гідрогелевій основі у присутності комплексу факторів і без них**

Тривалість культивування	Кількість ЯВК впродовж культивування у суспензійній культурі	Кількість КУОк у напіврідкому агарі
Початок культивування без факторів	$1 \times 10^5$	$50,0 \pm 2,5$
2 тижні	$0,5 \times 10^5$	$9,0 \pm 2,1$
3 тижні	0	0
Початок культивування з додаванням комплексу факторів у суспензійну культуру	$1 \times 10^5$	$50,00 \pm 3,14$
2 тижні	$1 \times 10^6$	$60,00 \pm 3,14$
3 тижні	$2,5 \times 10^6$	$150,0 \pm 10,5$
5 тижнів	$3,0 \times 10^6$	$250,0 \pm 5,3$

Початок культивування на підложці з гідрогелю з додаванням комплексу факторів у суспензійну культуру	$1 \times 10^5$	$50,00 \pm 3,14$
2 тижні	$2 \times 10^6$	$72,0 \pm 2,8$
3 тижні	$2,8 \times 10^6$	$200,0 \pm 11,8$
5 тижнів	$4,0 \times 10^6$	$521,5 \pm 7,5$

Отже, використання при довготривалому культивуванні комплексу цитокінів (інтерлейкіну-3, інтерлейкіну-6 і гранулоцитарно-макрофагального фактора) призводило до шостикратного збільшення кількості колонієутворюючих одиниць у культурі клітин *in vitro* у порівнянні з суспензійними культурами, у які не додавали ростових факторів (дані двох тижнів культивування); укладання м'якої гідрогелевої основи на донце посуду збільшувало колонієутворення у порівнянні з культурами з факторами на другий тиждень у 1,2 рази, на 3-й тиждень – у 1,3 рази, на 5-й тиждень – у 2 рази. Тобто ефективність культивування на підложці з поліакриламідного геля з комплексом цитокінів була у 2 рази більша, ніж у разі культивування на жорсткій основі (на донці лунки планшета). Таким чином, у процесі культивування клітин кордової крові *in vitro* на гідрогелевій підложці в присутності комплексу цитокінів, відбувається довготривала підтримка проліферативної активності гемопоетичних клітин, що відображається в їх експансії, а також збереженні високих показників функціональної активності гемопоетичних клітин-попередників.



## УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕНЬ

Насьогодні серед джерел гемопоетичних стовбурових клітин кістковий мозок у якості трансплантату застосовують найбільш широко. Проте у 75 випадків із 100 трансплантація пов'язана із серйозною проблемою сумісності донора і реципієнта. Підбір донора є складним процесом, що потребує великих матеріальних витрат і, на жаль, не завжди виявляється успішним. У зв'язку з цим виникає потреба в пошуку альтернативних джерел гемопоетичних стовбурових клітин, які зможуть забезпечити терапевтичний ефект при трансплантації. При цьому надзвичайно важливим є оцінка функціональної активності клітин з онтогенетично різних джерел, здатних відновлювати кровотворення. Тому було доцільним розробити спосіб експансії стовбурових клітин кордової крові і запропонувати підхід для оцінки проліферативної активності та біологічної принадності стовбурових клітин до трансплантації. Використання у якості підложки поліакриламідного гелю було обумовлено тим, що поліакриламідний гель у відповідній концентрації виявився тією підложкою, що підтримує плюрипотентність клітин. Цей факт було доведено на культурі ембріональної лінії на кафедрі лабораторної діагностики біологічних систем НаУКМА. Культивування ЕСК на різних за консистенцією підложках з поліакриламідного гелю переконливо свідчило про роль жорсткості субстрата у самопідтримці ембріональних стовбурових клітин [2]. Пояснення цьому факту лежить в основі біофізичних взаємодій. Висока сила зчеплення клітинно-матричного комплексу покращує диференціювання, в той час як низькі клітинні сили зчеплення відповідають за самопідтримку і плюрипотентність взаємодії [16, 59]. У результаті проведених досліджень автори прийшли до висновку, що плюрипотентність стовбурових клітин залежить не тільки від комплексу живильного середовища, цитокінів і добавок, а й від ступеня жорсткості субстрату, на якому культивуються клітини. Співробітником кафедри було створено модель довготривалого культивування соматичних клітин на м'якій

підложці з поліакриламідного гелю [2], яка і була використана нами при розробці умов для експансії стовбурових клітин і клітин-попередників з кордової крові.

У роботі було проведено дослідження на прояв цитотоксичної дії непрореагованих складових гелевих підложок для культивування, які залишаються після полімеризації. Характеристику життєдіяльності визначали за трьома параметрами: кількістю живих клітин за МТТ тестом, мітотичним індексом і індексом полікаріоцитів. Аналіз результатів експериментів показав, що більшість живих клітин виявлялася при відмиванні підложок протягом 24 години (90%). Мітотичний індекс у них був найвищим (58%), кількість змінених клітин, а саме полікаріоцитів, була мінімальною (18%).

Отже, відомо, що гемопоетичні клітини-попередники з онтогенетично різних джерел володіють високою проліферативною активністю. Проте для подальшого використання як трансплантату їх часто буває недостатньою. Спосіб збагачення мононуклеарів кордової крові гемопоетичними клітинами-попередниками в результаті довготривалого культивування з урахуванням підложки і комплексу цитокінів, явився таким, що створює оптимальні умови для проліферації клітин у клонах.

## ВИСНОВКИ

У роботі проведено пошуки оптимальних умов підтримки кровотворення *ex vivo* для експансії стовбурових клітин і гемопоетичних клітин-попередників з кордової крові за умов культивування на гідрогелевих підложках у присутності комплексу цитокінів.

1. Показано, що культивування клітин MCF-7 на гелевих підложках, відмитих у розчині NaCl 0,85% протягом 24 годин у планшетах *in vitro*, не містить токсичних речовин і є найбільш придатним для вирощування клітин, що підтверджується, за методом МТТ, збереженням більшості живих клітин (90%), мітотичним індексом, який складав  $58^{0/00}$  і мінімальною кількістю полікаріоцитів ( $18^{0/00}$ ).

2. Показники клоногенної активності клітин, виділених у градієнті щільності Nystoraque (1,077 г/мл) при одноразовому центрифугуванні перевищують аналогічні показники при використанні спонтанного відстоювання і градієнта низької щільності Ficoll-Нураque. Кількість КУОк цієї серії складають  $87,5 \pm 11,37$ , що в 22 рази вище за даний показник при спонтанному відстоюванні ( $4,0 \pm 3,85$ ) ( $p < 0,001$ ) і в 1,5 разу вище, ніж при використанні Ficoll-Нураque (1,065 г/мл) ( $56,7 \pm 0,05$ ) ( $p < 0,05$ ).

3. Комбінація інтерлейкіну-3, інтерлейкіну-6 і гранулоцитарно-макрофагального фактора при додаванні у культуру при довготривалому культивуванні забезпечує отримання значної кількості гемопоетичних клітин із високим ступенем функціональної активності ( $250,0 \pm 5,3 \times 10^5$ ).

4. Завдяки використанню поряд з комплексом цитокінів гідрогелевої підложки досягнута підтримка проліферативної активності гемопоетичних клітин, що відображається в їх експансії протягом довготривалого культивування (5 тижнів), а також збереженні високих показників колонієутворюючої активності ( $521,5 \pm 7,5 \times 10^5$  експлантованих клітин).

5. Культура клітин лінії MCF-7 завдяки доступності, легкості у культивуванні та відтворюваності результатів може бути адекватною моделлю

для експериментальних досліджень показників її життєздатності при дії на неї чинників різної природи.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Білько Д.І. Методи культури клітин і тканин у біології, біотехнології та медицині. – К.: Національний університет «Києво-Могилянська академія», Навчально-методичний посібник, Київ, 2017. – 87с.
2. Білько Д.І., Чайковський Ю.Б Роль жорсткості підложки для підтримки плюрипотентності ембріональних стовбурових клітин у культурі *in vitro* / Д. І. Білько, Ю. Б. Чайковський // Фізіологічний журнал. – 2021. – Т. 67, № 3. – С. 27–34. – <https://doi.org/10.15407/fz67.03.027>.
3. Anderson T.L., Gornstein F., Osteen K.G. Stromal-epithelial cell communication, growth factors, and tissue regulation // *Laboratory investigation*. – 1990. Vol.62. - №5. – P.519-521.
4. Andrews R.G., Singer I.W., Bernstein I.D. Human hematopoietic precursors in long-term cells in humans can be distinguished from colony-forming cells by expression of the CD33 and CD34 antigens and light scatter properties. // *J. Exp. Med.* – 1989. – Vol.169. - №5. – P.1721-1731.
5. Azqueta A., Slyskova J., Langie S.A.S. et al. Comet assay to measure DNA repair: approach and applications // *Frontiers in genetics*. — 2014. — Vol. 5, No. 288. — P. 1-8.
6. Beguin Y., Cornu G., Brichard B. et al. Belgian cord blood banking project: hematological results and practical issues // *Blood*. – 1995. – Vol.86. - №10. – P.116a
7. Broxmeyer H.E. Placental cord blood for clinical bone marrow transplantation // *The 33-rd Annual Meeting of the Society for Criobiology*. – Indianapolis, Indiana, USA, 1996. – P.4.
8. Campos L., Roubi N., Gmyotat D. Definition of optimal conditions for collection and cryopreservation of umbilical cord hematopoietic cells // *Cryobiology*. – 1995. – Vol.32. - №6. – P.511-515.

9. Cardoso A.A., Li M.L., Batard P. et al. Release from quiescence of CD34+CD38+ human umbilical cord blood cells reveals their potentiality to engraft adults. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* – 1993. – Vol.90. - №18. – P.8707-8711.
10. Chowdhury F., Civin C.I. Human monomyeloid cell membrane antigens. // *Exp. Hematol.* – 1990. – №18. – P.461-466.
11. De Lima M., St John L.S., Wieder E.D. et al. Double-chimaerism after transplantation of two human leukocyte antigen mismatched, unrelated cord blood units // *Br. J. Haematol.* – 2002. - №119. – P.773-776.
12. De Wynter E, Ploemacher R. E. Assays for the assessment of human hematopoietic stem cells // *J. Biol. Regul. Homeost. Agents.* – 2001. – Vol.15. - № 1. – P.23-27.
13. Di Giusto D. L., Lee R., Moon J. et al. Hematopoietic potential of cryopreserved and ex vivo manipulated umbilical cord blood progenitor cells evaluated in vitro and in vivo // *Blood.* – 1996. – Vol.87. - №4. – P.1261-1271.
14. Eridani S., Mazza U., Massaro P. et al. Cytokine effect on ex vivo expansion of haemopoietic stem cells from different human sources // *Biotherapy.* – 1998. – Vol.11. – № 4. – P. 291–296.
15. Fisher D., Francis G.E., Rickwood D. *Cell separation.* Oxford University Press, - 1998. - 288p.
16. Fliender T.M., Calvo W. *Hematopoietic Stem-cell seeding of a cellular matrix; a principle of initiation and regeneration of hemopoiesis* (Cold Spring Harbor Laboratory). – Cold Spring Harbor. – 1978.
17. Gerardo H, Lima A, Carvalho J, Ramos JRD, Couceiro S, Travasso RDM, Pires das Neves R, Graos M. Soft culture substrates favor stem-like cellular phenotype and facilitate reprogramming of human mesenchymal stem/stromal cells (hMSCs) through mechanotransduction. *Sci Rep.* 2019 Jun 24;9(1):9086.
18. Gluckman E., Broxmeyer H.E., Friedman H.S., Auerbach A.D. Hematopoietic reconstitution in a patient with Fanconi's anemia by means of umbilical cord blood from an HLA- identical sibling // *New Engl. J. Med. (USA).* – 1989. – Vol.321. - №7. – P. 1174-1189.

19. Gluckman E., Devergie A., Thierry D. et al. Clinical application of stem cells transfusion from cord blood and rationale for cord blood banking // *Bone Marrow Transplant.* – 1992. – Vol.9. - №1. – P.114-117.
20. Goetzke R, Sechi A, De Laporte L, Neuss S, Wagner W. Why the impact of mechanical stimuli on stem cells remains a challenge. *Cell Mol Life Sci.* 2018 Sep;75(18):3297-3312.
21. Gyori B. M., Venkatachalam G., Thiagarajan P. S. et al. Opencomet: an automated tool for comet assay image analysis // *Redox Biology.* — 2014. — Vol. 2, No. 1. — P. 457–465.
22. Haylock D.N., Horsfall M.J., Dowse T.L. et al. Increased recruitment of hematopoietic progenitor cells underlies the ex vivo expansion potential of FLT3 ligand // *Blood.* – 1997. – Vol.90. - №6. – P.2260-2272.
23. Holdsworth S. R., Gan P. Y. Cytokines: Names and Numbers You Should Care About // *Clin J Am Soc Nephrol.* – 2015. – Vol. 10. – No. 12. – P. 2243-54.
24. Holyoake T.L., Alcorn M.J. CD34+ positive haemopoietic cells: biology and clinical applications. [Review ] // *Blood Rev.* – 1994. – Vol.6. - № 2. – P.113-124.
25. Hrdý J., Novotná O., Kocourková I., Prokešová L. The effect of the colostrum cells on gene expression of cytokines in cord blood cells // *Folia Microbiol (Praha).*- 2017. – Vol. 62. – No. 6. – P. 479-483.
26. Huang H., Miao D., Bielich J., Auerbach R. In vitro studies of early embryonic hematopoietic stem cells of the mouse: isolation and response of yolk sac cells to differentiation factors // *J. Cell. Biochem.* – 1993. – Suppl.17 B. – P.63.
27. Kaushansky K. Thrombopoiesis // *Semin Hematol.* – 2015. – Vol. 52. – No. 1. – p. 4-11.
28. Kletzel M., HautP., Atlas M. et al. Red cell depletion of umbilical cord blood (UCB): comparison between unmanipulated and red cell-depleted UCB by Ficoll-Paque density gradient separation // *J. Hematother.* – 1997. – Vol.6. - №3. – P. 269-272.

29. Kobari L., Giarratana M.C., Pflumio F. et al. CD133+ cell selection is an alternative to CD34+ cell selection for ex vivo expansion of hematopoietic stem cells // *J. Hematother. Stem Cell Res.* – 2001. – Vol. 10. – № 2. – P.273 – 81.
30. Lansdorp P.M., Dragowska W., Mayani H. Ontogeny-related changes in proliferative potential of human hematopoietic cells // *J. Exp. Med.* – 1993. – №178. – P.3787-3791.
31. Lotz M. Interleukin-6: a comprehensive review // *Cancer Treat. Res.* – 1995. – №80. – P.209-233.
32. Lu L., Xiao M., Shen R.-N. et al. Enrichment, characterization, and responsiveness of single primitive CD34+++ human umbilical cord blood hematopoietic progenitors with high proliferative and replating potential. // *Blood.* – 1993. – Vol.81. - №1. – P.41-48.
33. Madlambayan G.J., Rogers I., Casper R.F., Zandstra P.W. Controlling Culture Dynamics for the Expansion of Hematopoietic Stem Cells // *Journal of hemotherapy & stem cell research.* – 2001. – № 10. – P. 481– 492.
34. Mathe G., Amiel J.L., Schwarzenberg L. et al. Bone marrow transplantation in man // *Transplant. Proc.* – 1969. - №1. – P.16-24.
35. Mayani H., Dragowska W., Lansdorp P.M. Characterization of functionally distinct subpopulations of CD34+ cord blood cells in serum free long-term cultures supplemented with hematopoietic cytokines // *Blood.* – 1993. – Vol.82. - №9. – P.2664-2672.
36. 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.
37. Moore M.A.S., Hoskins I. Ex vivo expansion of cord blood cells as targets for gene transfer: potential use in gene therapies of severe combined immunodeficiency disease. // *J. Exp. Med.* – 1993. N. 178(2). – P. 529-536.
38. Morrison S.J., Shan N.M., Anderson D.J. Regulatory mechanisms in stem cell biology // *Cell.* – 1997. - Vol.82. - №3. - P.287-298.



39. Nagler A., Peacock M., Tantoco M. et al. Separation of hemopoietic progenitor cells from human umbilical cord blood // *J. Hematother.* – 1993. Vol.2. - P.243-246.
40. Nakahata T., Ogawa M. Hemopoietic colony forming cells in umbilical cord blood with extensive capability to generate mono- and multipotential hemopoietic progenitors // *Clin. Invest.* – 1982. - №.70.- P.1324-1328
41. Nishimoto N., Kishimoto T. Interleukin 6: from bench to bedside // *Nat. Clin. Pract. Rheumatol.* – 2006. – Vol.2. - № 11. – P.619-626.
42. Ogawa M. Differentiation and proliferation of hemopoietic stem cells. // *Blood.* – 1993. – №.81. – P.2844-2858.
43. Ohwada C., Nakaseko C., Ozawa S. et al. Second cord blood transplantation (CBT) with reduced-intensity conditioning for graft failure after the first CBT for AML // *Bone Marrow Transplant.* – 2004. – Vol.34. - №11. – P.999-1000.
44. Olive P. L., Banath J. P. The comet assay: a method to measure DNA damage in individual cells // *Nat. Protocols.* — 2006. - Vol. 1, No. 1. — P. 23–29.
45. Park Y. B., Ha C. W., Kim J. A., Park Y. G. Comparison of Undifferentiated Versus Chondrogenic Predifferentiated Mesenchymal Stem Cells Derived From Human Umbilical Cord Blood for Cartilage Repair in a Rat Model // *Am J Sports Med.* – 2019. doi: 10.1177/0363546518815151.
46. Pettengell R., Luft T., Henschler R. et al. Direct comparison by limiting dilution analysis of long-term culture-initiating cells in human bone marrow, umbilical cord blood, and blood stem cells // *Blood.* – 1994. – Vol.84. - №11. – P.3653-3659.
47. Qian-Lin Hao, Shah A.J., Thiemann F.T. et al. A functional comparison of CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup> cells in cord blood and bone marrow // *Blood.* – 1995. – Vol.86. - №10. – P.3745-3753.
48. Recktenwald D., Radbruch A. *Cell Separation Methods and Applications*, Marcel Dekker Inc. - 1998. – 331 p.

49. Rogers J.A., Berman J.W. Tumor necrosis factor – responsive long – term – culture – initiating cell is associated with the stromal layer of mouse long – term bone marrow cultures // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. – 1993. – Vol.10. - №12. – P.5777-5780.
50. Rubinstein P., Rosenfield R.E., Adamson J.W., Stevens C.E. Stored placental blood for unrelated bone marrow reconstitution // Blood. – 1993. – Vol.81. - №7. – P.1679-1690.
51. Summers Y. J., Clare M. H., Erika A. et al. AC133+G0 cells from cord blood show a high incidence of long-term culture-initiating cells and capacity for more than 100 million-fold amplification of colony-forming cells in vitro // Stem Cells. – 2004. - №22. – P.704-715.
52. Tangprasittipap A., Kaewprommal P., Sripichai O. et al. Comparison of gene expression profiles between human erythroid cells derived from fetal liver and adult peripheral blood // PeerJ. – 2018. doi: 10.7717/peerj.5527. eCollection 2018.
53. Tavassoli M. Embryonic and fetal hemopoiesis: An overview // Blood Cells. – 1991. – Vol.17. - №2. – P.269-281.
54. Thoma S.J., Lamping C.P., Ziegler B.L. Phenotype analysis of hematopoietic CD34+ cell populations derived from human umbilical cord blood using flow cytometry and cDNA-polymerase chain reaction // Blood. – 1994. – Vol.83. - №8. – P.2103-2114.
55. Tosato G, Pike SE. Interferon-beta 2/interleukin 6 is a co-stimulant for human T lymphocytes // J. Immunol. – 1988. – Vol.141. - № 5. – P.1556-1562.
56. Traycoff C.M., Abboud M.R., Laver J. et al. Rapid Exit from G0/G1 phases of cell cycle in response to stem cell factor confers on umbilical cord blood CD34+ cells an enhanced ex vivo expansion potential // Exp. Hematol. – 1994. – Vol.22. – №13. – P.1264-1272.
57. Yahata T., Ando K., Miyatake H. et al. Competitive repopulation assay of two gene-marked cord blood units in NOD/SCID/gammac(null) mice // Mol. Ther. – 2004. – Vol.10. - № 5. – P.882-891.

58. Yu Z., Liu W., Liu D., Fan L. The regulatory role of Hyper-IL-6 in the differentiation of myeloid and erythroid progenitors derived from human cord blood. *Cell Immunol* // 2006. – Vol.241. - № 1. – P.32-37.
59. Zhang J., Yang C., Chen M. et al. Umbilical cord mesenchymal stem cells and umbilical cord blood mononuclear cells improve neonatal rat memory after hypoxia-ischemia // *Behav Brain Res.* – 2019. doi: 10.1016/j.bbr.2019.01.012. [Epub ahead of print]
60. Wang B, Tu X, Wei J, Wang L, Chen Y. Substrate elasticity dependent colony formation and cardiac differentiation of human induced pluripotent stem cells. *Biofabrication.* 2018 Oct 30;11(1):015005.
61. Singh, Gyanesh and Hasan Korkaya. “Cytokine regulation of stem cells.” (2016).
62. Zhang, Cheng C, and Harvey F Lodish. “Cytokines regulating hematopoietic stem cell function.” *Current opinion in hematology* vol. 15,4 (2008): 307-11. doi:10.1097/MOH.0b013e3283007db5
63. Bangheng Liu, Chao Tao, Zhonglian Wu, Hang Yao and Dong-An Wang. Engineering strategies to achieve efficient in vitro expansion of haematopoietic stem cells: development and improvement. DOI: 10.1039/D1TB02706A (Review Article) *J. Mater. Chem. B*, 2022, 10, 1734-1753
64. Essers, M., Offner, S., Blanco-Bose, W. et al. IFN $\alpha$  activates dormant haematopoietic stem cells in vivo. *Nature* 458, 904–908 (2009). <https://doi.org/10.1038/nature07815>
65. Matsuzawa, Shigeyuki et al. “IL-9 enhances the growth of human mast cell progenitors under stimulation with stem cell factor.” *Journal of immunology* (Baltimore, Md. : 1950) vol. 170,7 (2003): 3461-7. doi:10.4049/jimmunol.170.7.3461
66. Knudtson, S. In vitro growth of granulocytic colonies from circulating cells in human cord blood. *Blood* 43(3): 357–361; 1974.
67. Koestenbauer S, Zisch A, Dohr G, Zech NH. Protocols for hematopoietic stem cell expansion from umbilical cord blood. *Cell Transplant.* 2009;18(10):1059-68.
68. Robert M. Kliegman, Joseph W. St Geme III, Nathan J. Blum, Samir S.

Shah, Robert C. Tasker, and Karen M. Wilson. "Development of the Hematopoietic System." Nelson Textbook of Pediatrics, 2020.

69. Birbrair, Alexander, and Paul S Frenette. "Niche heterogeneity in the bone marrow." *Annals of the New York Academy of Sciences* vol. 1370,1 (2016): 82-96. doi:10.1111/nyas.13016

70. Kumar, Sachin, and Hartmut Geiger. "HSC Niche Biology and HSC Expansion Ex Vivo." *Trends in molecular medicine* vol. 23,9 (2017): 799-819. doi:10.1016/j.molmed.2017.07.003

71. Peci, Flavia et al. "The cellular composition and function of the bone marrow niche after allogeneic hematopoietic cell transplantation." *Bone marrow transplantation*, 10.1038/s41409-022-01728-0. 11 Jun. 2022, doi:10.1038/s41409-022-01728-0

72. Ozaki, Akihiko et al. "Expression of cytokines and cytokine receptors in human Schwann cells." *Neuroreport* vol. 19,1 (2008): 31-5. doi:10.1097/WNR.0b013e3282f27e60

73. Pinho, Sandra, and Paul S Frenette. "Haematopoietic stem cell activity and interactions with the niche." *Nature reviews. Molecular cell biology* vol. 20,5 (2019): 303-320. doi:10.1038/s41580-019-0103-9

74. Morrison, Sean J, and David T Scadden. "The bone marrow niche for haematopoietic stem cells." *Nature* vol. 505,7483 (2014): 327-34. doi:10.1038/nature12984

75. Friedenstein, A J et al. "Stromal cells responsible for transferring the microenvironment of the hemopoietic tissues. Cloning in vitro and retransplantation in vivo." *Transplantation* vol. 17,4 (1974): 331-40. doi:10.1097/00007890-197404000-00001.

76. Т.В. Шаманская, Е.Ю. Осипова, С.А. Румянцев. Ex vivo экспансия гемопоэтических стволовых клеток пуповинной крови (обзор литературы).

77. De Angeli, Sergio et al. "New immortalized human stromal cell lines enhancing in vitro expansion of cord blood hematopoietic stem cells." *International journal of molecular medicine* vol. 13,3 (2004): 363-71.

78. Е. В. Сотнезова, Е. Р. Андреева, А. И. Григорьев, Л. Б. Буравкова. Экспансия гемопоэтических стволовых и прогениторных клеток пуповинной крови *ex vivo*.
79. Li, Qiuyang et al. “Wharton's jelly mesenchymal stem cell-based or umbilical vein endothelial cell-based serum-free coculture with cytokines supports the *ex vivo* expansion/maintenance of cord blood hematopoietic stem/progenitor cells.” *Stem cell research & therapy* vol. 10,1 376. 5 Dec. 2019, doi:10.1186/s13287-019-1502-8
80. Boitano, Anthony E et al. “Aryl hydrocarbon receptor antagonists promote the expansion of human hematopoietic stem cells.” *Science (New York, N.Y.)* vol. 329,5997 (2010): 1345-8. doi:10.1126/science.1191536
81. Fares, Iman et al. “Cord blood expansion. Pyrimidoindole derivatives are agonists of human hematopoietic stem cell self-renewal.” *Science (New York, N.Y.)* vol. 345,6203 (2014): 1509-12. doi:10.1126/science.1256337
82. Branco, André et al. “Tailored Cytokine Optimization for *ex vivo* Culture Platforms Targeting the Expansion of Human Hematopoietic Stem/Progenitor Cells.” *Frontiers in bioengineering and biotechnology* vol. 8 573282. 25 Sep. 2020, doi:10.3389/fbioe.2020.573282
83. Wilkinson, Adam C et al. “Long-term *ex vivo* expansion of mouse hematopoietic stem cells.” *Nature protocols* vol. 15,2 (2020): 628-648. doi:10.1038/s41596-019-0263-2
84. Nishimura, Toshinobu et al. “Use of polyvinyl alcohol for chimeric antigen receptor T-cell expansion.” *Experimental hematology* vol. 80 (2019): 16-20. doi:10.1016/j.exphem.2019.11.007.
85. Marx-Blümel, L et al. “Biomimetic reconstruction of the hematopoietic stem cell niche for *in vitro* amplification of human hematopoietic stem cells.” *PloS one* vol. 15,6 e0234638. 22 Jun. 2020, doi:10.1371/journal.pone.0234638.
86. Barnhouse, Victoria et al. “Perivascular Secretome Influences Hematopoietic Stem Cell Maintenance in a Gelatin Hydrogel.” *Annals of biomedical engineering* vol. 49,2 (2021): 780-792. doi:10.1007/s10439-020-02602-0