

# Морфофункціональні характеристики гемопоетичних клітин-попередників кісткового мозку у гуманізованій культуральній системі *in vivo*

Д.І. Білько<sup>1</sup>, Ю.Б. Чайковський<sup>2</sup>, І.З. Руссу<sup>1</sup>, М.В. Пахаренко<sup>1</sup>,  
І.Ю. Лагоднюк<sup>1</sup>, Н.М. Білько<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Національний університет «Києво-Могилянська академія»;

<sup>2</sup>Національний медичний університет імені О.О. Богомольця, Київ;

e-mail: comraduk@yahoo.co.uk

*Одним із варіантів гуманізованої моделі «людина-тварина» є дифузійні камери, імплантовані у черевну порожнину миші – рециєнта. Метою нашого дослідження було визначення оптимальних параметрів культивування гемопоетичних клітин-попередників у гелевих дифузійних камерах і їх функціональної активності залежно від місця забору кістковомозкових клітин. Використовували метод культивування у гелевих дифузійних камерах *in vivo*, спосіб колонієутворення у напіврідкому агарі, цитологічні методи досліджень, світлоу і інвертовану мікроскопію, статистичні методи досліджень. Встановлено оптимальні умови культивування та кінетичні показники утворення клітинних агрегатів попередниками кісткового мозку пацієнтів без гематологічної патології у напіврідкому середовищі *in vivo* протягом 16 діб. Визначений найбільш придатний термін зняття результатів експериментів – 12-ту добу культивування. Оптимальною для проведення подальших досліджень була кількість клітин  $5 \cdot 10^5$  в 1 мл, або  $1 \cdot 10^5$  клітин на одну камеру. Виявилося, що незалежно від місця забору біологічного матеріалу з кісткової тканини людини колонієутворення в культурі дифузійних камер підтримується на одному рівні: ефективність колонієутворення для стерильного пунктату становила  $36,5 \pm 2,3$ , для кісткового мозку з фрагмента ребра –  $38,5 \pm 4,8$ , для трепанобіоптату з передньої верхньої ділянки гребеня клубової кістки –  $35,5 \pm 6,8$ , з задньої верхньої ділянки гребеня клубової кістки –  $37,3 \pm 5,5$ , що є важливим для використання стовбурових клітин з різних ділянок кісткової тканини в разі трансплантації. Про це свідчать проліферативний потенціал і індекс дозрівання клітин у клонах. Отримані результати поглиблюють уявлення про функціонування гемопоетичних стовбурових клітин в організмі людини в нормі.*

*Ключові слова: гемопоетичні клітини-попередники; колонієутворення; проліферація; диференціювання культура *in vivo*.*

## ВСТУП

Основним джерелом гемопоетичних стовбурових клітин в організмі дорослої людини вважається кістковий мозок [1, 2]. Він розміщений у комірках губчастої речовини плоских і губчастих кісток, епіфізів довгих (трубчастих) кісток; складається з сітки ретикулярних волокон і клітин, в петлях якої знаходяться примітивні, дозріваючі та зрілі гемопоетичні клітини [3, 4]. Дані досліджень кровотворення *in vitro* протягом останніх трьох-чотирьох десятиліть

розширили уявлення про організацію, регулювання та розвиток системи кровотворення людини. Проте через неможливість відповідної безпосередньої оцінки гемопоетичних стовбурових клітин (ГСК) у людини та через недоліки методології *in vitro*, дослідження розвитку гемопоетичних клітин *ex vivo* потребували нових оригінальних підходів. За час вивчення гемопоезу було створено декілька моделей, що імітують фізіологічний стан кровотворної тканини. Культури гемопоетичних клітин людини *in vitro* вважаються

© Д.І. Білько, Ю.Б. Чайковський, І.З. Руссу, М.В. Пахаренко, І.Ю. Лагоднюк, Н.М. Білько

двовимірною моделлю кровотворення. Вона повторює кровотворну нішу [5, 6]. Така модель є простою у створенні, може частково імітувати структуру кісткового мозку та включати у себе декілька варіантів клітин, що взаємодіють. Ще одним типом культур є культивування гемопоетичних клітин у скафолдах, які являють собою відкриту ємність з синтетичного матеріалу з мікропористим фільтром у донці, що нагадує нішу [7, 8]. Така тривимірна модель з використанням мезенхімальних клітин використовується для спільного вирощування з гемопоетичними прогеніторними стовбуровими клітинами [9]. Одним з сучасних підходів є створення завдяки векторній інженерії трансгенної миші, організм якої може синтезувати цитокіни людини і, як наслідок, адекватно взаємодіяти з імплантатом. Завдяки втручанню саме у генном мишей з'явилася можливість виведення спеціальних їх ліній, призначених саме для роботи з імплантатами людини [10, 11]. Існують також математичні моделі кровотворення та комп'ютерна візуалізація проліферації та диференціювання ГСК [12]. Незважаючи на наявність у лабораторіях світу різних культуральних підходів і великого асортименту цитокінів і ростових факторів, ще не знайдені такі способи культивування і такий набір факторів росту, які б створювали оптимальні умови для підтримки гемопоезу поза організмом.

Імплантаційна модель «людина-миша» найбільш наближена до реальної картини кровотворення людини і, по суті, може вважатися гуманізованою моделлю [13]. Вона, в основному, описується в науковій літературі як відкрита система у вигляді скафолдів, у які мігрують трансплантовані гемопоетичні стовбурові клітини [14–16]. Її прототипом стали унікальні експерименти, проведені Чертковим і Фріденштейном [2], які по праву вважаються засновниками теорії гемопоезу, в основі якої знаходиться гемопоетична стовбурова клітина. Їм вперше вдалося після імплантації кістки миші під капсулу нирки отримати гемопоез

завдяки міграції гемопоетичних стовбурових клітин миші-реципієнта до трансплантата [1]. Неможливість такого підходу для культивування гемопоетичних клітин людини стала поштовхом для подальшого розвитку способів культивування у дифузійних камерах, імплантованих у черевну порожнину тварини-реципієнта [17]. На жаль у 90-х роках ХХ сторіччя ця модель не була сприйнята у зв'язку з розширенням індустрії цитокінів і оптимізацією методів культивування *in vitro*. І тільки в останнє десятиріччя вивчення гемопоезу *in vivo* відродилося на новому, більш сучасному рівні. Невдовзі з'ясувалося, що крім стимуляторів росту клітин не меншу роль у підтримці гемопоезу в культурі відіграє жорсткість основи, на якій культивуються клітини [18]. Нами в експериментальних умовах на різних за консистенцією підложках з поліакриламідного гелю вдалося підібрати таку жорсткість покриття (0,6 кПа), яка у повному живильному середовищі забезпечила самопідтримку ембріональних стовбурових клітин. Пояснення цьому факту лежить в основі біофізичних взаємодій, у результаті вивчення яких деякі дослідники показали, що висока сила зчеплення клітинно-матричного комплексу покращує диференціювання, в той час як низькі клітинні сили відповідають за самопідтримку і плюрипотентність взаємодії [19]. З використанням гелю саме такої жорсткості було сформовано гелеві дифузійні камери для довготривалого культивування гемопоетичних клітин.

Доцільність визначення морфологічних і функціональних показників гемопоетичних клітин-попередників з кісткового мозку, вилучених з територіально різних місць їх перебування у кістках людини, зумовлена необхідністю поглиблення знань про особливості їх функціонування, як для вирішення питань регенеративної медицини, так і для прогнозування перебігу онкогематологічних захворювань.

Мета нашої роботи – визначення колонієутворюючої здатності і морфологічних харак-

теристик гемопоетичних клітин-попередників, вилучених з різних ділянок розташування кісткового мозку людини у культуральній системі дифузійних камер *in vivo*.

## МЕТОДИКА

Дослідження кісткового мозку пацієнтів проводили у гуманізованій культурі гелевих дифузійних камер «людина–миша», які занурювали у черевну порожнину мишей-реципієнтів камер лінії СВА. Їх кількість дорівнювала 370 тварин з розрахунку 10 тварин на зразок. Матеріалом для дослідження був кістковий мозок, отриманий у 37 осіб без злоякісних захворювань системи крові. До I групи ввійшли 15 пацієнтів, в яких вилучали кістковий мозок у результаті діагностичної пункції груднини, до II – 13 пацієнтів, яким проводили діагностичну трепанобіопсію. Зразки, отримані у пацієнтів III (6 осіб) і IV груп (7 осіб) отримані з кістковомозкових клітин, виділених з верхньої передньої клубової ості клубової кістки, складової тазової кістки (*spina iliaca anterior superior*) і верхньої задньої клубової ості (*spina iliaca posterior superior*) відповідно. Фрагменти ребра отримували в результаті хірургічних втручань при торакальних операціях у гематологічно здорових пацієнтів (9 осіб). Усі пацієнти дали усвідомлену згоду використовувати їх матеріал для дослідницьких цілей. Діагностичну пункцію груднини кісткового мозку пацієнтів і трепанобіопсію проводили медичні працівники відділення захворювань системи крові ДУ «Інститут гематології та трансфузіології» НАМН України. Процедури з експериментальними тваринами здійснювали відповідно до існуючих норм і вимог, вказаних у Законі України № 3447 IV «Про захист тварин від жорстокого поводження», Європейській Конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових досліджень (Страсбург, 1986), з урахуванням біоетичних стандартів. Тварин утримували у стандартних умовах акредитованого

віварія. Тваринам-реципієнтам за добу до експерименту підшкірно вводили ендоксан («Arterium», Україна) у дозі 200 мг/кг для пригнічення їх імунологічної активності і стимуляції колонієутворення цитокинами, які продукуються в організмі тварини у відповідь на введення цитостатика.

Гемопоетичні клітини з кісткового мозку різної локалізації отримували від медичного персоналу у вигляді пунктату стерильної кістки, фрагмента ребра, трепанобіоптату двох ділянок гребеня клубової кістки і після центрифугування протягом 30 хв з Histopaque-1077 Hybri-Max™ («Sigma-Aldrich», США) тричі відмивали у фосфатно-сольовому розчині. Визначали життєздатність виділених клітин за допомогою забарвлення трипановим-синім і підраховували у камері Горяєва. Повне живильне середовище складалося з середовища RPMI-1640 («Sigma», США), 20% фетальної телячої сироватки («Sigma», США) та антибіотиків: пеніциліну («Київмедпрепарат», Україна) та стрептоміцину («Київмедпрепарат», Україна) по 100 Од/мл. Для отримання напіврідкого середовища використовували бактоагар («Difco», США) з кінцевою концентрацією після розведення 0,33%. Суспензію клітин у визначених концентраціях у повному живильному середовищі з напіврідким агаром вводили через прокол у боковій стінці гелевої камери.

Оперували мишей під тіопенталовим наркозом («Київмедпрепарат», Україна). Дві камери з клітинами занурювали у черевну порожнину миші і зашивали подвійним швом. У визначений термін умертвляли тварин методом цервікальної дислокації спинного мозку у шийному відділі, вилучали камери, та завдяки їх прозорості вивчали під інвертованим мікроскопом («Zeiss», Німеччина); підраховували загальну кількість колоній (агрегати, що складаються більш ніж із 40 клітин). Для оцінки морфологічного складу колоній, їх вилучали автоматичною піпеткою з насадкою і переносили у кювети (кожну

колонию у окрему кювету) і центрифугували на цитоцентрифузі Cytospin-3 («Shandon», Німеччина) при швидкості 250g, предметні скельця вилучали, забарвлювали за методом Паппенгейма та вивчали під світловим мікроскопом («Leica», Велика Британія) із імерсійним збільшенням у 1000 разів. Для аналізу результатів культивування розраховували проліферативний потенціал, як співвідношення колоній до кластерів. Крім того, визначали індекс дозрівання клітин кісткового мозку, як співвідношення суми клітин, які проліферують, до суми дозріваючих клітин, котрі завершили проліферацію і продовжують диференціюватися. До клітин, що проліферують, відносили бластні клітини, промієлоцити, мієлоцити і метамієлоцити, а до дозріваючих – паличкоядерні і сегментоядерні нейтрофіли, а також макрофаги.

Для обробки результатів використовували статистичну програму Microsoft Excel. Достовірність відмінностей середніх значень двох сукупностей визначали із застосуванням критерію t Стьюдента; різницю результатів вважали вірогідною на рівні значущості 95% ( $P < 0,05$ ).

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Для оцінки функціональної активності кровотворних клітин-попередників, вилуче-

них з різних кісток, їх культивували *in vivo* у напіврідкому агарі в гелевих дифузійних камерах. Вивчали кінетику формування колоній–клонів клітинами-попередниками з кісткового мозку осіб без онкогематологічних захворювань. Оскільки ефективність колонієутворення клітин-попередників кісткового мозку може відрізнятися залежно від місця забору кістковомозкових клітин на першому етапі дослідження встановлювали оптимальну кількість клітин, що могла б використовуватися для проведення подальших досліджень. Також визначали, чи є угруповання клітин у культурі колоніями-клонами. Тому культивування суспензії ядровмісних клітин кісткового мозку проводили із використанням кінцевих концентрацій:  $0,5 \cdot 10^5$ ,  $1 \cdot 10^5$ ,  $2 \cdot 10^5$ ,  $4 \cdot 10^5$ ,  $5 \cdot 10^5$  клітин на 1 камеру. Всі інші параметри культивування, такі як склад живильного середовища, а також тривалість та умови інкубації, залишалися незмінними. Культивування проводили у п'яти повторах, а показник колонієутворення для кожної із концентрацій клітин визначали за критерієм t Стьюдента, як середнє значення кількості клітинних агрегатів з урахуванням похибки (рис. 1).

Аналіз отриманих результатів показав, що кількість клітинних агрегатів, утворених під час культивування у напіврідкому агарі, лінійно зростала зі збільшенням концентрації

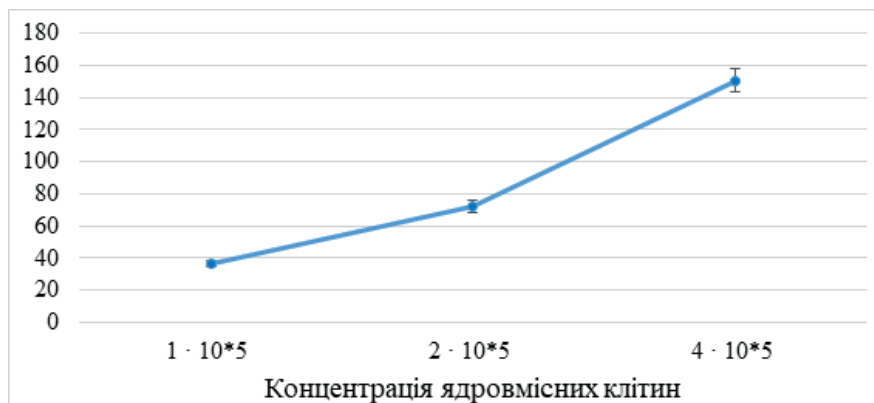


Рис. 1. Залежність кількості колонієутворюючих одиниць гранулоцитарно-макрофагальних, утворених при культивуванні суспензії клітин кісткового мозку пацієнтів без злоякісних гематологічних захворювань, від концентрації ядровмісних клітин, експлантованих у культуру



ядровмісних клітин кісткового мозку, що занурювали у гелеву дифузійну камеру перед культивуванням. У разі застосування найнижчої концентрації моноклеарів кісткового мозку ( $0,5 \cdot 10^5$  клітин на камеру), клітинні агрегати не утворювалися взагалі. Відсутність колоній та кластерів після культивування у напіврідкому агарі протягом 14 діб може бути пов'язана, ймовірно, з відсутністю міжклітинних взаємодій, що є важливими для виживання клітин в умовах культивування *ex vivo*.

Коли ж концентрація ядровмісних клітин кісткового мозку пацієнтів без злоякісних гематологічних захворювань, занурених у дифузійну камеру, була вищою за  $4,0 \cdot 10^5$  клітин на камеру, візуалізація окремих клітинних агрегатів значно ускладнювалася їх надмірною щільністю, демонструючи зливний ріст. Саме тому, для проведення досліджень використовувалася кінцева концентрація  $1,0 \cdot 10^5$  клітин на камеру.

Надалі вивчали кінетику утворення колоній і кластерів клітинами кісткового мозку осіб без злоякісних гематологічних захворювань при культивуванні у напіврідкому середовищі *in vivo* на 3, 7, 9, 12, 14 та 16-ту

добу для визначення особливостей проліферативної активності клітин залежно від місця збору кісткового мозку та встановлення оптимальної тривалості культивування. Підрахунок утворених клітинних агрегатів у зазначені терміни культивування проводили під інвертованим мікроскопом Nikon із використанням збільшення у 100 разів.

Перші агрегати, що склалися із 3–9 клітин виявляли на 3-тю добу культивування. Такі скупчення клітин вважаються кластерами. Спостереження за ними показало, що вони збільшувалися у розмірах із продовженням терміну культивування. Перші колонії з'явилися на 5–7-му добу культивування. Надалі їх кількість збільшувалася з максимумом на 12-ту добу. У всіх наступних дослідженнях розрізняли два основні типи клітинних агрегатів: колонії (колонієутворюючі одиниці) та кластери (кластероутворюючі одиниці), кількість яких підраховували окремо для кожного зразка. Визначали три типи колоній, що виявлялись у культурі: компактні колонії, компактні із вінчиком і дифузні колонії (рис. 2). Виявилося, що колонії є об'ємними, ростуть у агарі як у горизонтальній, так і у вертикальній площині [7].

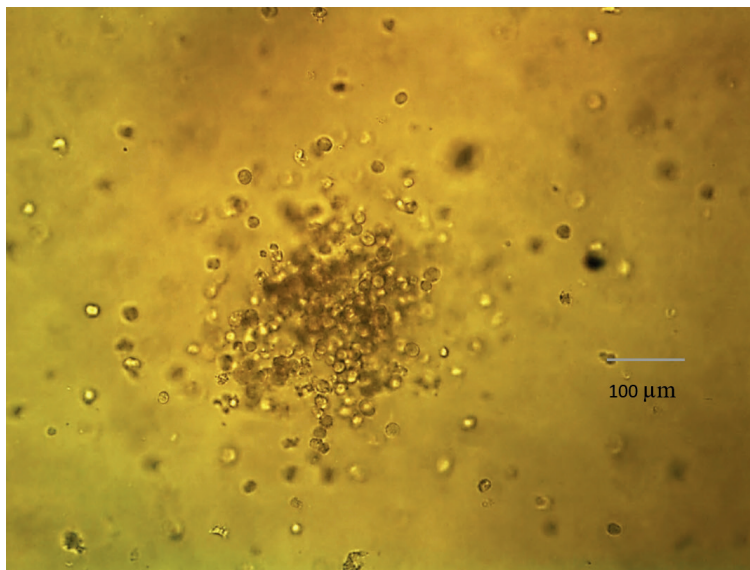


Рис. 2. Компактна колонія з вінчиком, утворена після культивування суспензії клітин-попередників кісткового мозку, вилученого з груднини пацієнта, у напіврідкому агарі протягом 12 діб. Інвертований мікроскоп

Кількість кластерів з першого дня появи колоній зменшувалася. Ймовірно, це пов'язано з тим, що частина клітинних агрегатів, прийнятих за кластери, у результаті проліферації формує колонії, а нові кластери на цей час уже не утворюються. Розмір колоній збільшувався до 12-ї доби, кількість клітин у них коливався від 40 до 500.

З часом (на 14-ту і 16-ту добу) кількість компактних колоній зменшувалась, а дифузних ставало більше, в результаті вони втрачали межі і зливалися. Саме тому обрахунок результатів при проведенні подальших досліджень проводили на 12-й день після початку культивування. Такі експерименти здійснювали з кістковомозковими клітинами, вилученими з грудини, ребер, передньої верхньої секції і задньої верхньої секції клубової кістки. Результати свідчили про те, що достовірної різниці між колонієутворюючою здатністю кістковомозкових клітин, отриманих з різних місць їх перебування, не спостерігалось.

Так, ефективність колонієутворення для стернального пунктату становила  $36,5 \pm 2,3$ , для кісткового мозку з фрагмента ребра –  $38,5 \pm 4,8$ , з передньої верхньої ділянки гребня клубової кістки –  $35,5 \pm 6,8$ , з задньої верхньої ділянки гребня клубової кістки –  $37,3 \pm 5,5$  ( $P > 0,05$ ). Після оцінки кількості колоній і кластерів з розрахунку  $1 \cdot 10^5$  експлантованих клітин з кожного місця забору біологічного

матеріалу визначали проліферативний потенціал, який являє собою співвідношення колоній до кластерів (таблиця). Не виявлено достовірної різниці між проліферативним потенціалом клітин у культурах, вилучених з різних місць їх розташування у кістковій тканині. Відсутність різниці у співвідношенні колоній і кластерів свідчить про те, що не лише кількість ранніх клітин-попередників кісткового мозку збігається у групах, які порівнюються, а й їхніх більш диференційованих нащадків, котрі мають менший потенціал до диференціювання та в напіврідкому середовищі *in vivo* формують кластери.

Аналіз цитологічних препаратів показав, що колонії представлені ядровмісними клітинами округлої форми. Вони склалися з мієлоїдних клітин різного ступеня зрілості. У центрі колоній розміщувалися проліферуючі клітини (бластні, промієлоцити, мієлоцити, метамієлоцити), по периферії – клітини, що втратили здатність проліферувати, а саме паличко- і сегментоядерні лейкоцити (рис. 3). Індекс дозрівання мієлоцитів, що визначався під час аналізу клітинного складу агрегатів, утворених у результаті культивування, визначали як співвідношення між числом незрілих форм мієлокаріоцитів (бласти, промієлоцити, мієлоцити, метамієлоцити) та кількістю більш диференційованих клітин (паличко- та сегментоядерні гранулоцити).

#### Колонієутворення гемопоетичних клітин-попередників кісткового мозку у пацієнтів без онкогематологічних відхилень залежно від місця забору кісткового мозку

Місце забору кістковомозкових клітин	Кількість обстежених	Колонієутворююча активність	Поліферативний потенціал	Індекс дозрівання лейкоцитів
Стернальний пунктат	15	$36,5 \pm 2,3$	$0,9 \pm 0,28$	0,51
Фрагмент ребра	9	$38,5 \pm 4,8$	$0,8 \pm 0,77$	0,59
Трепанобіоптат з клубової кістки ( <i>spina iliaca anterior superior</i> )	6	$35,5 \pm 6,8$	$1,1 \pm 0,18$	0,57
Трепанобіоптат з клубової кістки ( <i>spina iliaca posterior superior</i> )	7	$37,3 \pm 5,5$	$0,9 \pm 0,48$	0,51
Всього	37			

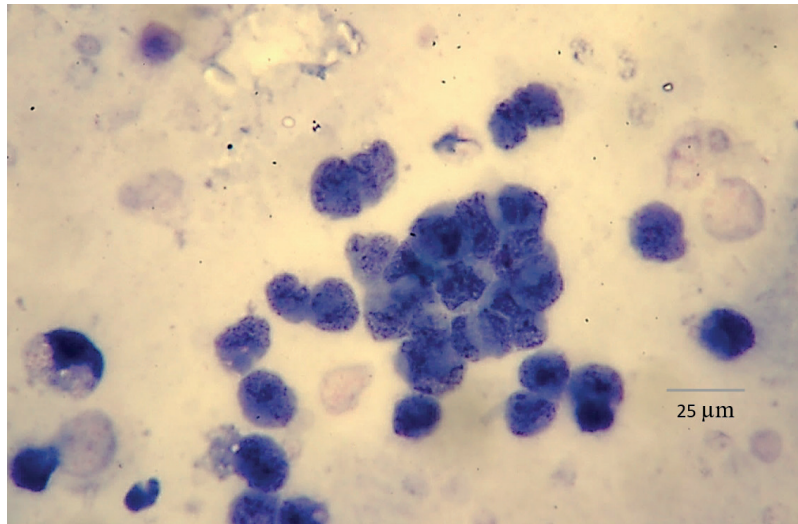


Рис. 3. Фрагмент компактної колонії з вінчиком, утвореної після культивування суспензії клітин-попередників кісткового мозку, у напіврідкому агарі протягом 12 діб. Забарвлення за Паппенгеймом

Кількість макрофагів у клітинних агрегатах, утворених після культивування ядровмісних клітин кісткового мозку пацієнтів не залежала від способу і місця отримання кістковомозкових клітин і не мала статистично достовірної відмінності. Проте вона збільшувалася з подовженням терміну культивування. Так, на 12-й день їх кількість становила 5%, на 14-й день – 10%, а на 16-й – 25%. Збільшення числа макрофагів у культурі на пізніх термінах культивування свідчить про трансформацію частини моноцитів у макрофаги і є підтвердженням думки про те, що 12-й день зняття результатів експерименту є найкращим у культурі *in vivo*. Надалі відбувається макрофагальна експансія. Проте оптимальним терміном зняття результатів експериментів в культурі з напіврідким агаром *in vitro* для кісткового мозку людини визначений 14-й день, а макрофагальна експансія проходить на кілька діб пізніше. Поясненням такої різниці можуть бути різні умови культивування. Процес формування *in vitro* відбувається повільніше, ніж у камері, де клітини знаходяться у фізіологічних умовах і отримують необхідні живильні речовини з перитонеальної порожнини тварин, у той час як *in vitro* можливості росту клітин об-

межені тим ростовим фактором чи кількома ростовими факторами, які додані у культуру.

Аналіз морфологічних особливостей клітин, які формували колонії не виявив достовірної відмінності у якісному складі клітин, що створювали клітинні агрегати залежно від місця забору. Так, кількість бластних клітин у клонах у пацієнтів I групи була  $1,5 \pm 0,4$ , II групи –  $1,3 \pm 0,3$ , III –  $1,2 \pm 0,2$  і IV –  $1,0 \pm 0,3$  відповідно ( $P > 0,05$ ). Кількість міелоцитів знаходилась у межах від 11,1 до 13,1 і сягала  $11,1 \pm 1,3$ ,  $12,5 \pm 1,8$ ,  $13,1 \pm 2$  і  $11,2 \pm 1,5$  відповідно ( $P > 0,05$ ). Більше клітин нараховувалося серед дозріваючих елементів гранулоцитарного ряду. Їх значення становили  $18,0 \pm 3,8$ ,  $20,5 \pm 2,1$ ,  $22,8 \pm 3,5$  і  $19,0 \pm 2,8$  відповідно ( $P > 0,05$ ). Зрілі гранулоцити виявилися у більшості і сягали для I групи –  $34,0 \pm 3,5$ , для II –  $36,5 \pm 4,8$ , для III –  $33,3 \pm 3,9$  і для IV –  $37,5 \pm 5,1$  відповідно ( $P > 0,05$ ). Виходячи з результатів, індекс дозрівання клітин, отриманих з різних місць перебування стовбурових клітин у кістковій тканині, знаходився у межах від 0,51 до 0,59, що свідчило про переважання у колоніях дозріваючих форм порівняно з проліферуючими (рис. 4).

Таким чином, запропоновано модель

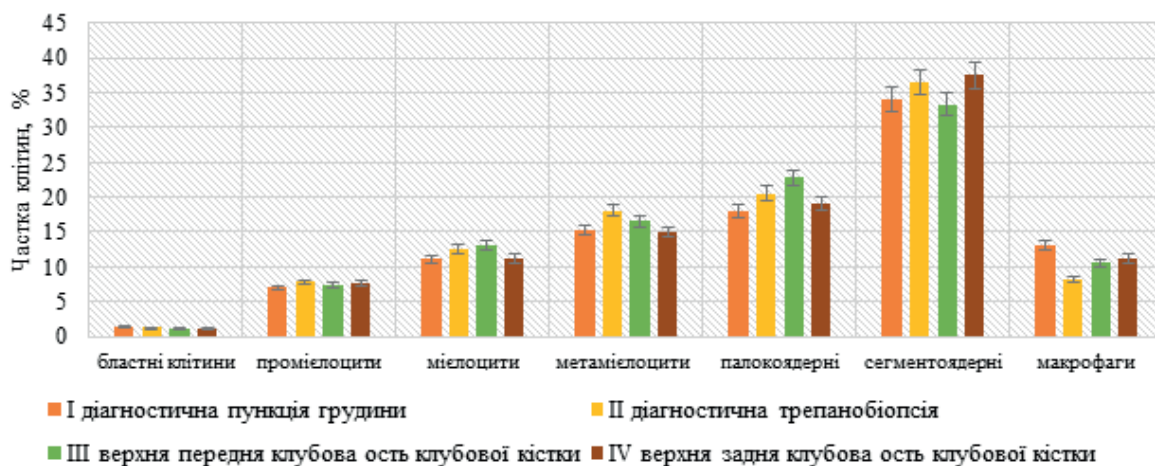


Рис. 4. Клітинний склад колоній клітин кісткового мозку у пацієнтів без онкогематологічних відхилень у залежності від місця забору кісткового мозку на 12-й день культивування: 1 – діагностична пункція груднини; 2 – діагностична трепанобіопсія; 3 – верхня передня клубова ость клубової кістки; 4 – верхня задня клубова ость клубової кістки

культивування у гелевих дифузійних камерах, придатну для вивчення гемопоезу в умовах, наближених до природних. Підхід «гуманізації» тварини за допомогою трансплантації ГСК людини тваринам-реципієнтам є перспективним підходом для оцінки *in vivo* гемопоезу людини.

## ВИСНОВКИ

Пропонована дифузійна камера з поліакриламідного гелю відповідної жорсткості, завдяки прозорості і еластичності, дає змогу культивувати ГСК і клітини-попередники з утворенням колоній у напіврідкому агарі. Кількість колоній відповідає кількості клітин-попередників, які завдяки проліферації формують клони. Кількість клонів з розрахунку  $1 \cdot 10^5$  експлантованих клітин свідчить про функціональну активність біологічного матеріалу для здійснення регенеративних процесів. У роботі було встановлено оптимальні умови культивування та кінетичні показники утворення клітинних агрегатів клітинами-попередниками кісткового мозку пацієнтів без гематологічної патології у напіврідкому середовищі *in vivo*. Визначений найбільш придатний термін зняття результатів експериментів – 12-та

доба культивування. Кількість клітин, що була вибрана, як оптимальна для проведення подальших досліджень, становила  $5 \cdot 10^5$  у 1 мл, або  $1 \cdot 10^5$  клітин на одну камеру. Виявилось, що незалежно від місця забору біологічного матеріалу (кісткового мозку) у людини колонієутворення з розрахунку на  $1 \cdot 10^5$  експлантованих клітин у культурі дифузійних камер підтримується на одному рівні, що є важливим для використання стовбурових клітин з різних ділянок кісткової тканини в разі трансплантації. Про це свідчать проліферативний потенціал колонієутворення і індекс дозрівання клітин у клонах. Отримані результати поглиблюють уявлення про функціонування і кінетику росту стовбурових клітин і їх найближчих нащадків в організмі людини і мають практичний вихід для подальших досліджень кровотворення в нормі і при злоякісних захворюваннях.

*The authors of this study confirm that the research and publication of the results were not associated with any conflicts regarding commercial or financial relations, relations with organizations and/or individuals who may have been related to the study, and interrelations of co-authors of the article.*



**D.I. Bilko<sup>1</sup>, Y.B. Tchaikovsky<sup>2</sup>, I.Z. Russu<sup>1</sup>,  
M.V. Pakharenko<sup>1</sup>, I.Yu. Lahodniuk<sup>1</sup>, N.M. Bilko<sup>1</sup>**

**MORPHOFUNCTIONAL  
CHARACTERISTICS OF HEMATOPOIETIC  
BONE MARROW PROGENITOR CELLS  
IN A HUMANIZED CELL CULTURE  
SYSTEM *IN VIVO***

<sup>1</sup>National University of Kyiv-Mohyla Academy;

<sup>2</sup>National Medical University named O.O. Bogomolets, Kyiv;  
e-mail: comraduk@yahoo.co.uk

Diffusion capsules implanted in the abdominal cavity of the mouse recipient are one of the variants of the humanized model of “human-animal” systems. The aim of our study was to determine the optimal parameters for the cultivation of hematopoietic progenitor cells in gel diffusion chambers and their functional activity of bone marrow cells from different locations. To achieve this goal, the method of cultivation in gel diffusion chambers *in vivo* combined with the method of colony formation in semi-liquid agar, cytological research methods and light microscopy were used. The optimal conditions of cultivation and kinetic indicators of cell aggregate formation by bone marrow precursors of patients without hematological pathology in semi-liquid medium were established *in vivo* in 16 days of cultivation. We determined that the most suitable term for taking the results of experiments is at 12th day of cultivation. The number of cells that was determined to be optimal for further studies was  $5 \cdot 10^5$  cells in 1 ml, or  $1 \cdot 10^5$  cells per chamber. Our results suggest that regardless of the place of collection of biological material in humans, the formation of colony in the culture of diffusion chambers is maintained at nearly the same level. The CFU activity for the sternal puncture was  $36.5 \pm 2.3$ , the CFU activity for bone marrow from the rib fragment was  $38.5 \pm 4.8$ , the CFU activity for trepan biopsy from the anterior upper part of the iliac crest was  $35.5 \pm 6.8$  and the CFU activity from the posterior upper part of the iliac crest was  $37.3 \pm 5.5$ . These observations are important for evaluation of functional activity and further use of stem cells from different parts of bone tissue in the case of transplantation. This is further supported by the proliferative potential of colony formation and the index of cell maturation in clones. The obtained data deepen our understanding of the functioning of the hematopoietic stem cells in the human body under normal conditions.

Key words: hematopoietic progenitor cells; colony formation; proliferation; differentiation; *in vivo* culture.

**REFERENCES**

1. Cheng H, Zheng Z, Cheng T. New paradigms on hematopoietic stem cell differentiation. *Protein Cell*. 2020 Jan;11(1):34-44.
2. Chertkov IL, Friedenstein AY. Cellular basis of hematopoiesis. Moscow: Ed. «Medicine», 1977. [Russian].
3. Dexter TM, Lajtha L. Proliferation of haemopoietic stem cells *in vitro*. *Br J Haematol*. 1974 Dec;28(4):525-30.

4. Tchaikovsky YuB, Deltsova OI, Gerashchenko SB. Stem cells. Ivano-Frankivsk: Misto NV, 2014. [Ukrainian].
5. Lord BI. Myeloid cell kinetics in response to haemopoietic growth factors. *Baillieres Clin Haematol*. 1992 Jul;5(3):533-50.
6. Laurenti E, Göttgens B. From hematopoietic stem cells to complex differentiation landscapes. *Nature*. 2018;553(7689):418-26.
7. Crippa S, Bernardo ME. Mesenchymal stromal cells: Role in the BM niche and in the support of hematopoietic stem cell transplantation. *Hemasphere*. 2018 Nov 16;2(6):e151.
8. Aqmasheh S, Shamsasanjan K, Akbarzadehlaleh P, Pashoutan Sarvar D, Timari H. Effects of mesenchymal stem cell derivatives on hematopoiesis and hematopoietic stem cells. *Adv Pharm Bull*. 2017;7(2):165-77.
9. Congrains A, Bianco J, Rosa RG, Mancuso RI, Saad STO. 3D Scaffolds to Model the Hematopoietic Stem Cell Niche: Applications and Perspectives. *Materials (Basel, Switzerland)*. 2021 Jan;14(3):569.
10. Pearson T, Greiner DL, Shultz LD. Creation of “humanized” mice to study human immunity. *Current Protoc Immunol*. 2008 May;15(15):21.
11. Abarrategi A, Mian SA, Passaro D, Pierre KR, Grey W, Bonnet D. Modeling the human bone marrow niche in mice: From host bone marrow engraftment to bioengineering approaches. *J Exp Med*. 2018;215(3):729-43.
12. Boyko RV, Bilko DI, Russu IZ, Bilko NM. Comparative mathematical analysis of functional properties of mice bone marrow in the phase of recovery of colony-forming units number after sub-lethal and repeated sub-lethal irradiation. *Nucl Phys Energy*. 2020; 21(1):75-8. [Ukrainian].
13. Huang J, Li X, Coelho-dos-Reis JG, Wilson JM, Tsuji M. An AAV vector-mediated gene delivery approach facilitates reconstitution of functional human CD8+ T cells in mice. *PLoS One*. 2014 Feb 6;9(2):e88205.
14. Theocharides A, Ronqvaux A, Fritsch K, Flavell RA, Manz MG. Humanized hemato-lymphoid system mice. *Haematologica*. 2016;101(1):5-19.
15. Sharma MB, Limaye LS, Kale VP. Mimicking the functional hematopoietic stem cell niche *in vitro*: recapitulation of marrow physiology by hydrogel-based three-dimensional cultures of mesenchymal stromal cells. *Haematologica*. 2012;97(5):651-60.
16. Huey DD, Niewiesk S. Production of humanized mice through stem cell transfer. *Current Protoc Mouse Biol*. 2018 Mar 30;8(1):17-27.
17. Gordon MY. Quantitation of haemopoietic cells from normal and leukaemic RfM mice using an *in vivo* colony assay. *Brit J Cancer*. 1974;30(5):421-8.
18. Zhang P, Zhang C, Li J, Han J, Liu X, Yang H. The physical microenvironment of hematopoietic stem cells and its emerging roles in engineering applications. *Stem Cell Res Ther*. 2019 Nov 19;10:327.
19. Bilko DI, Tchaikovsky YuB. The role of substrate stiffness in maintaining pluripotency of embryonic stem cells *in vitro* culture. *Physiol. Zh*. 2021; 67(3):27-34. [Ukrainian].

*Матеріал надійшов  
до редакції 22.12.2021*