

МОРФОФУНКЦІОНАЛЬНІ ОСОБЛИВОСТІ КЛІТИН-ПОПЕРЕДНИКІВ ГЕМОПОЕТИЧНОГО КІСТКОВОГО МОЗКУ У ПАЦІЄНТІВ З ХРОНІЧНОЮ МІЄЛОЇДНОЮ ЛЕЙКЕМІЄЮ ПРИ ТРИВАЛОМУ КУЛЬТИВУВАННІ У ГЕЛЕВИХ ДИФУЗІЙНИХ КАМЕРАХ *IN VIVO*

Д.І. БІЛЬКО*¹, І.С. ДЯГІЛЬ², Ю.Б. ЧАЙКОВСЬКИЙ³

¹ Національний університет «Києво-Могилянська академія», Київ, Україна

² Національний науковий центр радіаційної медицини, Київ, Україна

³ Національний медичний університет імені О.О.Богомольця, Київ, Україна

E-mail: comraduk@yahoo.co.uk*, leuk@ukr.net, yuchaiko@i.ua

*Пошуки шляхів успішного довготривалого культивування гемопоетичних стовбурових клітин, їх експансії, аналізу кінетики росту клітин впродовж тривалого часу та досліджень клітинних взаємодій в нормі і при злоякісному процесі залишаються найважливішими питаннями сьогодення. Вирішення цих проблем є одним з найважливіших завдань клітинної біології, біотехнології та регенеративної медицини. Аналіз особливостей проліферації і диференціювання кісткового мозку пацієнтів з хронічною мієлоїдною лейкемією та у нормі в довготривалій культурі оригінальних гелевих дифузійних камер, імплантованих у черевну порожнину лабораторних тварин. Суспензійна культура в камерах оригінального дизайну *in vivo*, метод визначення гемопоетичних клітин-попередників у напіврідкому агарі *in vitro*, цитологічні, статистичні методи. Результати культивування показали, що клітини кісткового мозку пацієнтів з хронічною мієлоїдною лейкемією, у яких виявлена Ph-хромосома, в культурі демонстрували до 30-го дня значний проліферативний потенціал, що вдвічі перевищував показники у нормі. Далі колонієутворююча активність стрімко знижувалася на відміну від нормального кісткового мозку, де активний гемопоез зберігався впродовж 1,5 місяця. Особливості у диференціюванні клітин у клонах проявлялися у перевазі еритроїдних клітин-попередників при хронічній мієлоїдній лейкемії, тоді як у нормі переважали гранулоцито-макрофагальні попередники. Отже, запропонована культуральна система довготривалої підтримки гемопоезу забезпечує підхід до вивчення кровотворення людини у нормі та відкриває перспективи для подальшого дослідження природи трансформованої популяції клітин при злоякісних захворюваннях кровотворної системи.*

Ключові слова: гемопоетичні стовбурові клітини, хронічна мієлоїдна лейкемія, довготривала культура у гелевих дифузійних камерах *in vivo*, оцінка гемопоетич-

*них клітин-попередників у напіврідкому агарі *in vitro*, цитологічні, статистичні методи дослідження.*

Вступ. Здатність гемопоетичних стовбурових клітин та їх безпосередніх нащадків до проліферації є джерелом постійного поповнення пулу дозріваючих і зрілих клітин у системі кровотворення (Dexter, Laitha, 1974). Метод клітинної культури відіграє значну роль у розумінні єдності та взаємопроникнення структури та функцій, дозволяючи вивчати клітини в їх прижиттєвому стані та їх взаємодію з мікрооточенням (Anthony, Link, 2014; Chaikovsky Yet al, 2014). Методи клітинної культури застосовуються для вивчення біологічних та структурних особливостей клітин, які беруть участь у різних патологічних процесах, оскільки будь-який з них реалізується насамперед на клітинному рівні, що супроводжується змінами у структурі клітин та метаболізмі (Gartner et al, 1980). Саме через клітини, їх взаємозв'язок та взаємодії опосередковується ініціація, розвиток та прояв патологічного процесу.

Минуло більше 100 років з часу відкриття перших культуральних систем, в яких дослідники прагнули створити умови для культивування клітин, оптимально близьких до природних. Описано систему рідких культур для гемопоетичних клітин миші, де проліферація гранулоцитів (G-культур), або мононуклеарних клітин (M-культур) може зберігатися вродовж багатьох тижнів. Існує метод колонієутворення у селезінці опромінених тварин КУОс (колонієутворюючі одиниці) і такі, які утворюють колонії в агарі, що складаються з гранулоцитів на всіх стадіях диференціювання (Dexter et al, 1977). Впровадження системи довготривалого культивування кісткового мозку по Декстеру

in vitro дозволило визначити типи клітин, у яких відбувається хромосомна трансформація, описати ієрархію системи кровотворення у хворих на лейкемію, визначити кілька регуляторних молекул, які беруть участь у експансії лейкемічних стовбурових клітин та клітин-попередників різних типів для розробки систем елімінації злоякісних клітин (Asar et al, 2015). Методи довготривалого культивування *in vitro* відрізняються використанням різних цитокінів, факторів росту та добавок, або наявністю стромального субстрату, який є продуцентом живильних речовин, необхідних для клітин (Abarrategi et al, 2018). Тим не менш, не знайдено такої культуральної системи, яка б забезпечувала оптимальні умови для тривалого кровотворення та запобігала його виснаженню. В даний час використовується для покриття полістиролових або скляних чашок Петрі та флаконів як натуральні, так і синтетичні матеріали з колагену, альгінату, хітозану, желатину, гідроксилapatиту, полімолочної та полігліколевої кислот тощо (Abbonante et al, 2016; Holzapfel et al, 2015). Результати наших попередніх спостережень за ембріональними клітинами, які були культивовані на поліакриламідному субстраті з різною жорсткістю *in vitro*, продемонстрували, що на збереження плюрипотентності може впливати не тільки склад живильного середовища, але й складна взаємодія між фізичними силами матриці та механічними властивостями клітинних агрегатів і доведено, що збереження плюрипотентності залежить від жорсткості субстрату (Chowdhury et al, 2010; Bilko D, Chaikovsky Y, 2021). Отже, опираючись на результати цих дослідів ми створили оригінальну дифузійну камеру з м'якого поліакриламідного гелю для культивування *in vitro*, або *in vivo* (Білько, 2021) Патент № 146819 від 17.03.2021). Техніка дифузійної камери *in vivo* забезпечує систему, яка ізолює імплантовані клітини кісткового мозку від клітин-господаря, забезпечуючи при цьому обмін живильними речовинами (Sroug et al, 1992; Aqmasheh et al, 2017). Створення довготривалих культур у гелевих дифузійних камерах *in vivo* дозволило вивчати кровотворну функцію нормальних і лейкемічних клітин з урахуванням їх обмеженої кількості і особливостей кінетики росту.

Відомо, що традиційні класичні методи цитогенетичного та гематологічного аналізу дозволяють виявляти трансформовані гематопоетичні клітини у їх зрілому стані (Gluzman DF et al, 1998). У той же час функціональні зміни на рівні стовбурових клітин і клітин-попередників кісткового мозку можна виявити шляхом культивування цих клітин (Verfaillie et al, 1992; Holyoake et al, 2002).

Хронічна мієлоїдна лейкемія була першим онкологічним захворюванням, при якому був виявлений чіткий зв'язок між генетичною мутацією та патогенезом. Отже, аналіз гемопоетичних клітин передбачає морфологічне і цитогенетичне дослідження клітин кісткового мозку для визначення частки клітин, що містять Філадельфійську хромосому (Philadelphia, Ph) — мутацію, поява якої пов'язана з розвитком усіх симптомів ХМЛ.

Вважається, що немає статистично значущої різниці між клоногенною здатністю клітин-попередників кісткового мозку у пацієнтів з ХМЛ та пацієнтів без гематологічних розладів, і тому розширення популяції клітин відбувається через збільшення здатності лейкемічних стовбурових клітин до проліферації та зниження їх чутливості до апоптозу (Diachenko M et al, 2013; Sviezhentseva I. et al, 2015).

Вивчення лейкемічних клітин у культурі продовжується більше 50 років. Дослідники, створюючи привабливі умови для клітин *ex vivo*, крок за кроком розкривають механізми, що лежать в основі розвитку та прогресування злоякісних гематологічних захворювань на молекулярному та клітинному рівнях для розробки надійної системи прогнозування перебігу ХМЛ та елімінації трансформованих клітин без пошкодження нормальних клітин крові (Kuznietsova et al, 2019). Однак питання, пов'язані з особливостями проліферації та диференціювання лейкемічних клітин, залишаються повністю невирішеними. Незважаючи на безліч цитокінів та факторів росту, які пропонуються для підтримки культур гемопоетичних клітин *in vitro*, поки що неможливо врахувати всі умови, які могли б забезпечити тривалий гемопоез *ex vivo* і, таким чином, поглибити розуміння біології лейкемічного процесу.

Матеріали и методи. Підготовка суспензії клітин кісткового мозку до культивування. Ма-

теріалом для дослідження був нормальний кістковий мозок, отриманий у осіб без гематологічних захворювань у результаті ортопедичних втручань (15 зразків) і 45 осіб з хронічною мієлоїдною лейкемією (25 жінок та 20 чоловіків), середній вік $45,0 \pm 8,3$ років (від 20 до 60 років). Усі пацієнти дали усвідомлену згоду використовувати їх матеріал для дослідницьких цілей. Діагностичну пункцію грудини та цитогенетичне обстеження кісткового мозку пацієнтів на наявність Ph-хромосоми проводили медичні працівники відділу радіаційної онкогематології та трансплантації стовбурових клітин Національного науково-дослідного центру радіаційної медицини Національної академії медичних наук України. Зразки для клітинних культур відбирали лише у тих пацієнтів, у яких була визначена Ph-хромосома.

Процедура підготовки до вирощування нормального та лейкемічного кісткового мозку була однаковою. Зразки кісткового мозку розбавляли фосфатним буфером PBS («Invitrogen», Німеччина) у співвідношенні 1 : 3. Клітинну суспензію відділяли центрифугуванням (30 хв при 750 g) у градієнті Нустораке («Sigma-Aldrich», США) щільністю 1,077 г/мл. Відмивання клітин у PBS (10 хв 250 g) повторювали тричі. Підрахунок кількості клітин в отриманих суспензіях проводили після додавання трипанового синього у камері Горяєва (ПАО «Склоприлад», Україна) із використанням мікроскопа («Olympus СК-2», Японія) при збільшенні $\times 400$ і $\times 1000$.

Культивування гемопоетичних клітин у гелевих дифузійних камерах *in vivo*. Для одержання суспензійної культури клітини у кінцевій концентрації $2,5 \times 10^5$ в 1 мл (з розрахунку 5×10^4 клітин на камеру) вносили в повне живильне середовище, яке включало: середовище DMEM («Gibco», Німеччина), 10%-ної телячої ембріональної сироватки («Sigma-Aldrich», США), 2 ммоль L-глутаміну («Gibco», Німеччина); антибіотики: 50 ОД/мл пеніциліну та 50 мг/мл стрептоміцину («Gibco», Німеччина). З урахуванням надання гелю відповідної жорсткості дифузійні камери виготовляли шляхом полімеризації компонентів гелю у визначених концентраціях (Bilko D, 2021). Клітинну суспензію поміщали у внутрішню по-

рожнину камери в об'ємі 0,2 мл, що відповідає її розміру, шляхом проколу бічної поверхні камери ін'єкційною голкою зі шприцом.

Надалі камери були імплантовані в черевну порожнину лінійних мишей СВА (2 камери на мишу); операцію проводили під тіопенталовим наркозом. Усі маніпуляції з тваринами здійснювалися відповідно до Закону України № 3447 IV «Про захист тварин від жорстокого поводження» та Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для досліджень та наукових цілей (Страсбург, 1986).

У визначений термін (7-й, 14-й, 21-й, 30-й, 45-й дні) забивали по 2 тварини шляхом дислокації шийних хребців, камери вилучали та, використовуючи їх прозорість, вивчали під інвертованим мікроскопом («Zeiss», Німеччина). Далі видаляли клітинну суспензію, визначали життєздатність клітин за прижиттєвим забарвленням трипановим синім, підраховували їх кількість у камері Горяєва та продовжували культивування в іншій системі – напіврідкому агарі *in vitro* впродовж двох тижнів для оцінки колоноутворюючої активності культивованих клітин.

Культивування клітин *in vitro* в напіврідкому агарі. Формування у культурі з напіврідким агаром *in vitro* колоній-клонів свідчить про наявність гемопоетичних клітин-попередників, найближчих нащадків гемопоетичної стовбурової клітини. Колонієутворюючу активність нормальних і лейкемічних кістково-мозкових клітин, вилучених з камер у процесі довготривалого культивування, на 7-й, 14-й, 21-й, 30-й та 45-й дні субкультивували в напіврідкому агарі *in vitro* у 24-лункових планшетах («Nunc», Німеччина). Суспензію для культивування готували на основі середовища RPMI-1640 («Sigma-Aldrich», США), яке містило 20 % фетальної телячої сироватки («Sigma-Aldrich», США), L-глутаміну («Sigma-Aldrich», США) та антибіотиків пеніциліну та стрептоміцину (АТ «Київмедпрепарат», Україна) при 100 ОД/мл. Крім того, до культурального середовища додавали ГМК-КСФ («Sigma-Aldrich», США), який попередньо розводили стерильним фізіологічним розчином (NaCl 0,9 %) так, щоб його кінцева концентрація становила 50 мкг/мл.

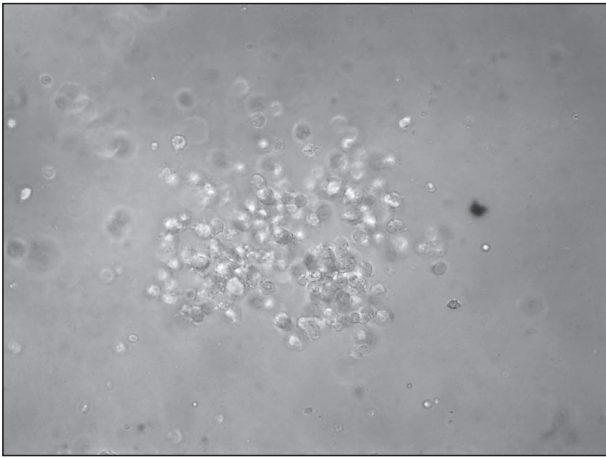


Рис. 1. Колонієутворююча одиниця гранулоцитарно-макрофагальна (КУО-ГМ), отримана у напіврідкому агарі *in vitro* з довготривалих культур дифузійних камер (30 діб). Інвертований мікроскоп. Зб. $\times 200$

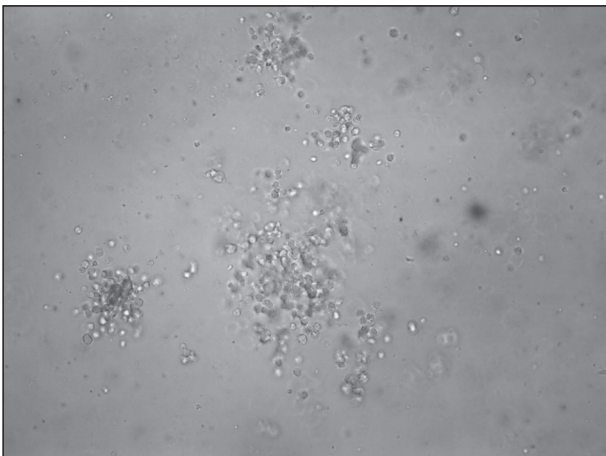


Рис. 2. Бурстутворююча еритроїдна одиниця (БУО-Е), отримана у напіврідкому агарі *in vitro* з довготривалих культур дифузійних камер (30 діб). Інвертований мікроскоп. Зб. $\times 100$

Для отримання напіврідкого середовища з кінцевою концентрацією 0,3 % використовували бактоагар («Difco», США) з початковою концентрацією 3,3 %. Суспензію клітин кісткового мозку додавали таким чином, щоб кінцева їх концентрація відповідала заданій (10^5 мононуклеарних клітин на лунку). Планшети поміщали в CO_2 – інкубатор («LEEC», Великобританія) за умов вологості 100, 5 % концентрації CO_2 і температурі 37 °С.

Результати культивування в напіврідкому агарі підраховували за кількістю колоній-клонів після двотижневого періоду культивування під інвертованим мікроскопом. Агрегати, що склалися з більш ніж 40 клітин, були прийняті за колонії. Клітинні агрегати, що містили від 2 до 40 клітин, вважалися кластерами. Ефективність утворення колоній (ЕКУ) розраховували як кількість одиниць, що утворюють колонії (КУО) на 1×10^5 культивованих мієлокаріоцитів. Для морфологічної оцінки клітин, які склали клон, колонії індивідуально виділяли з шару агару сеплером та ресуспендували у середовищі DMEM («Sigma-Aldrich», США). Результати обраховували на 14-ту добу культивування за допомогою інвертованого мікроскопа («Zeiss», Німеччина) зі збільшенням $\times 100$, $\times 200$. Зразки готували цитоцентри-фугуванням («Shandon», Німеччина) впродовж 1 хв при 360 g і проводили забарвлення методом Паппенгейма. Диференціальний підрахунок та вивчення морфологічних особливостей клітин проводили за допомогою мікроскопа («Leika», Японія) при імерсійному збільшенні $\times 630$ і $\times 1000$.

Результати та їх обговорення. Аналіз колонієутворюючої здатності клітин, видалених з дифузійних камер на етапах довготривалого культивування, показав, що як у нормі, так і

Таблиця. Диференційований облік колоній-клонів (БУО-Е та КУО-ГМ) у культурі гелевих дифузійних камер при ХМЛ та у нормі

Колонієутворення в культурі	7-й день	14-й день	21-й день	30-й день	45-й день
<i>ХМЛ</i>					
БУО-Е	$25.2 \pm 1,8$	$51.1 \pm 2,5$	$11.0 \pm 0,1$	$10,0 \pm 1,0$	–
КУО-ГМ	$11.1 \pm 1,5$	$24.1 \pm 2,0$	$43.3 \pm 1,8$	$85,1 \pm 2,3$	–
<i>У нормі</i>					
БУО-Е	$8.1 \pm 1,2$	$12.3 \pm 2,5$	$11.2 \pm 2,6$	$19,1 \pm 3,4$	$6,3 \pm 1,1$
КУО-ГМ	$20,2 \pm 1,5$	$34.2 \pm 2,8$	$27,0 \pm 2,5$	$47,0 \pm 3,3$	$120,0 \pm 5,6$

при ХМЛ у культурі відбувається генерація клітин-попередників (рис. 1, 2).

Було встановлено, що клітини кісткового мозку пацієнтів з вперше виявленою ХМЛ вже на 7-й день культивування у суспензійній культурі виявляли колонієутворюючу активність при перенесенні у напіврідкий агар ($36,5 \pm 1,5$ та $28,3 \pm 2,1$, відповідно). На 14-й день ці показники становили $75,2 \pm 4,5$ та $46,5 \pm 2,8$, відповідно. Але загальна кількість клітин у суспензії мононуклеарів дещо знижувалась після 14-го дня культивування з подальшим збільшенням після 21-ї доби. На нашу думку, це пов'язано з виснаженням пула клітин-попередників (КУО-14), які утворювали колонії на 14-й день.

На 21-й день активність утворення колоній при ХМЛ становила $54,3 \pm 3,3$, а у нормі цей показник становив $38,2 \pm 2,5$. Виявлена нами особливість кінетики росту була притаманна як клітинам-попередникам пацієнтів із вперше виявленою ХМЛ, так і для суспензійних культур клітин КМ у нормі, хоча проліферативна активність лейкемічних клітин продовжувала переважати протягом цього періоду. Надалі процес генерації клітин-попередників у культурі тривав, що супроводжувалося збільшенням колонієутворюючої активності до 30-го дня. Показник колонієутворюючої здатності сягав у цей період для лейкозних клітин $95,1 \pm 5,4$, а для норми – $65,8 \pm 3,4$. Підвищення проліферативної активності лейкемічних і нормальних клітин у культурі на 4-му тижні культивування може бути пов'язане з включенням у проліферацію клітин-попередників раннього покоління (КУО-21). Подальший період характеризується прогресуючим зростанням кількості лейкемічних клітин. Цей феномен пояснюється аутокринною регуляцією процесу проліферації за рахунок факторів росту, що продукуються злякисними клітинами, та відсутністю відповіді на вплив інгібіторів. Подальше культивування гемопоетичних клітин у гелевих камерах призводило до швидкого зниження колонієутворюючої активності лейкемічних клітин. Так, на 30-й день у культурі з клітинами ХМЛ спостерігали всі ознаки згасання кровотворення (падіння клітинності з переважанням зруйнованих клітин, превалювання макрофагальних елементів). Незважаючи на згасання

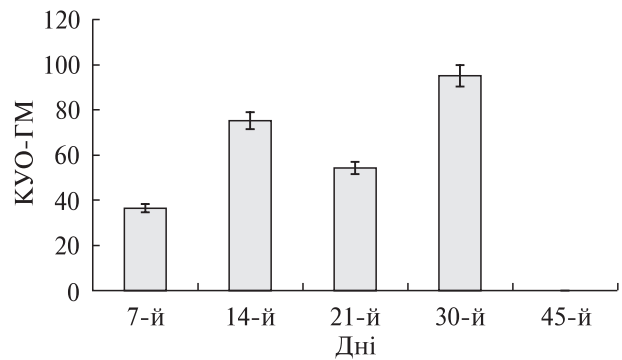


Рис. 3. Колонієутворююча активність гемопоетичних гранулоцитарно-макрофагальних клітин-попередників під час тривалого культивування в гелевих дифузійних камерах при ХМЛ

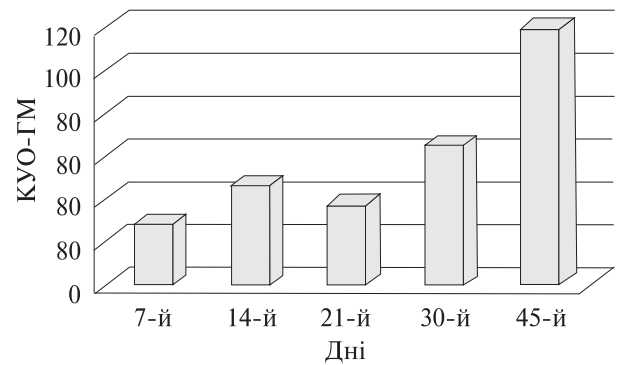


Рис. 4. Колонієутворююча активність гемопоетичних гранулоцитарно-макрофагальних клітин-попередників під час тривалого культивування в гелевих дифузійних камерах у нормі

гемопоезу в культурі лейкемічних клітин, в нормі кровотворення підтримувалося до півтора місяців. У цей період колонієутворення поступово зростало, що вказувало на активну генерацію клітин-попередників і дорівнювало $120,0 \pm 5,6$ на 1×10^5 експлантованих клітин (таблиця). Різниця в проліферативній активності лейкемічних і нормальних клітин у культурі може бути обумовлена неоднорідністю клітин-попередників, які утворюють колонії-клони, і, безперечно, дефектом їх кровотворної функції на рівні клітин-попередників при ХМЛ.

Таким чином, аналіз результатів культивування в черевній порожнині мишей нормального та лейкемічного кісткового мозку показав, що живильних речовин та ростових факторів в середовищі дифузійної камери достатньо для

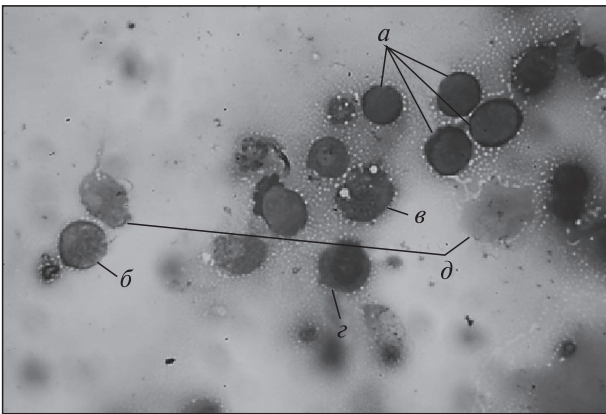


Рис. 5. Фрагмент колонії. *a* – проеритробласти, *б* – мієлоцит, *в* – макрофаги, *г* – мітоз, *д* – зруйновані клітини. Забарвлення за Паппенгеймом. Світловий мікроскоп. $\times 1000$

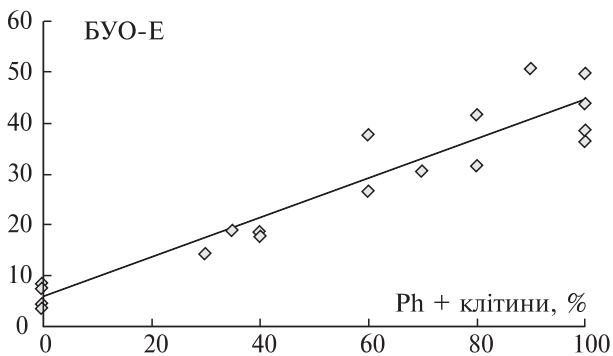


Рис. 6. Кореляційний аналіз залежності між кількістю БУО-Е та кількістю Ph-клітин у пацієнтів із вперше виявленою ХМЛ

підтримки кровотворення. Їх наявність призводить до експансії культивованих клітин у першому та другому випадках. При ХМЛ генерація клітин-попередників до 30-го дня майже вдвічі вища, ніж у нормі. Однак нормальні клітини кісткового мозку зберігають гемопоєз до 1,5 місяців, в той час як лейкемічні клітини у довготривалій культурі (після 30-го дня) демонструють нездатність підтримувати гемопоєз далі, що може бути наслідком дефекту проліферативних процесів при ХМЛ, що не спостерігається на ранніх стадіях культивування, але після 30-го дня починається стрімке зниження як кількості клітин, так і їх колонієутворюючої здатності порівняно з нормою. Різниця статистично достовірна. Наші дані спів-

ставні з результатами досліджень авторів, які культивували збагачену, завдяки негативній селекції, популяцію CD 34+ кісткомозкових клітин *in vitro* в присутності 8 цитокінів, досягаючи більш високих темпів утворення колоній, ніж у наших дослідженнях при культивуванні нативного кісткового мозку в дифузійних камерах. Дослідники спостерігали згасання гемопоєзу при ХМЛ у культурі *in vitro* на 20-й день, хоча це явище було зафіксовано нами на 30-й день культивування. Пояснення більш тривалої підтримки гемопоєзу при ХМЛ у дифузійних камерах може бути обумовлено наявністю в камері живильних речовин і цитокінів, які не були враховані *in vitro*. Однак дефект гемопоєзу при ХМЛ був виявлений, хоча він був більш віддаленим.

Завдяки використанню методу культивування у дифузійних камерах, який забезпечує тривале надходження живильних речовин з черевної порожнини миші, нам вдалося простежити за кінетикою росту клітин у культурі впродовж більш тривалого періоду часу. Виявилось, що кінетика росту клітин у культурі дифузійних камер в нормі і при хронічній мієлоїдній лейкемії співставна з результатами, отриманими дослідниками *in vitro* (Ch'avez-Gonz'alez A et al, 2006), про що свідчить зниження проліферативної активності лейкемічних клітин та згасання кровотворення за місяць, тоді як клітини-попередники нормального кісткового мозку продовжували проліферувати, досягаючи суттєвої експансії до 1,5 місячного терміна і далі без ознак погіршення стану культури, тобто при відсутності превалювання макрофагальної експансії в ній (рис. 3, 4).

Аналіз вмісту колоній, утворених у культурах з напіврідким агаром *in vitro*, показав, що клітини-попередники кісткового мозку в нормі та при ХМЛ мають свої особливості у виборі напрямку диференціювання. Так, у нормі в колоніях переважали гранулоцитарно-макрофагальні попередники (72 % від загальної кількості клітинних агрегатів у культурі), тоді як при ХМЛ більшість колоній складала еритроїдні клітини-попередники (бурстутворюючі (БУО-Е) і колонієутворюючі одиниці еритроїдного ряду (КУО-Е)). Їх відсоток становив 68 % на 7-й та 14-й день культивування. Пізніше кіль-

кість еритроїдних попередників зменшувалась і на 21-й день становила 20 %, а на 30-й – 10 % (рис. 5). Їхнє місце займали колонії гранулоцитарно-макрофагальних клітин-попередників з переважанням макрофагальних елементів.

Порівняння функціональної активності еритроїдних клітин -попередників з культур кісткового мозку пацієнтів, хворих на ХМЛ, з результатами цитогенетичного дослідження клітин кісткового мозку пацієнтів з хромосомою Ph + свідчило про прямий корелятивний зв'язок між кількістю Ph + клітин і кількістю колоній еритроїдних клітин-попередників з розрахунку на 1×10^5 експлантованих в культуру клітин.

Аналіз показав пряму кореляцію ($r = 0,9534$) між кількістю БУО-Е у культурі та кількістю Ph-клітин у кістковому мозку пацієнтів із вперше виявленим захворюванням (рис. 6). Отримані дані свідчили про дефектний характер росту гемопоетичних клітин в еритроїдному напрямку при ХМЛ у культурі і кореляційний зв'язок цього показника з наявністю в кістковому мозку Ph+клітин, завдяки чому підтверджена роль еритроїдної ланки кровотворення разом з гранулоцитарно-макрофагальною у формуванні злоякісного процесу при ХМЛ (Sviezhentseva I et al, 2015).

Результати культивування клітин кісткового мозку в культурі дифузійних камер частково відрізняються від показників *in vitro* і є більш поглибленими завдяки здатності відстежувати поведінку клітин з плином часу та визначати кінетику росту без демонтажу камер. По-перше, КУО-ГМ клітин кісткового мозку при ХМЛ значно перевищує значення цього показника нормальних клітин протягом місяця. Це пояснюється насамперед здатністю лейкемічних клітин реагувати на регуляторні молекули, що надходять з черевної порожнини миші. По-друге, вони мають аутокринні регулятори, які сприяють проліферації клітин-попередників. Однак у довготривалій культурі спостерігається зниження гемопоетичної функції лейкемічних клітин, тоді як нормальні гемопоетичні клітини продовжують підтримувати кровотворення до 1,5 місяців.

Аналіз морфофункціональних особливостей лейкемічних клітин-попередників у про-

цесі їх довготривалого культивування у гелевих дифузійних камерах, імплантованих у черевну порожнину лабораторних тварин *in vivo*, розкриває можливість вивчення на молекулярному та клітинному рівнях механізмів, що лежать в основі розвитку злоякісного процесу, та визначення ролі стовбурових клітин та їх клітин-попередників у злоякісному процесі, оцінки прогресування захворювання та ефективності терапевтичної тактики.

Висновки. Запропонована модель довготривалого культивування гемопоетичних клітин в організмі лабораторної тварини. Показано, що м'які дифузійні камери з поліакриламідного геля органічно сприяють проліферації клітин, завдяки надходженню живильних речовин, і ростових факторів з черевної порожнини миші і дають можливість простежити за кінетикою росту клітин у культурі впродовж тривалого періоду часу. Довготривалій гемопоез у дифузійних камерах відбувається завдяки присутності у культурі гемопоетичних клітин-попередників, які є найближчими нащадками стовбурової клітини. Показано, що проліферація гемопоетичних клітин кісткового мозку пацієнтів з вперше виявленим ХМЛ у культурі *in vivo* значно переважає ріст клітин у нормі. Однак згодом відбувається зниження проліферативної активності лейкемічних клітин та згасання кровотворення, тоді як клітини-попередники нормального кісткового мозку продовжують проліферувати, досягаючи суттєвої експансії до 1,5 місячного терміна. Дефектний характер росту лейкемічних клітин у довготривалій культурі дифузійних камер проявляється не тільки у згасанні гемопоезу, а і у перевазі диференціювання у еритроїдному напрямку. Наявність кореляційного зв'язку між кількістю бурстутворюючих одиниць і числом Ph+клітин у кістковому мозку свідчить про суттєву роль еритроїдної ланки кровотворення поряд з гранулоцитарно-макрофагальною у формуванні злоякісного процесу при ХМЛ.

Дотримання етичних норм. Дослідження схвалено Комісією з етики та біоетики Національного університету «Кієво-Могилянська академія» (протокол № 6 від 11 травня 2017 р.). Усі маніпуляції з тваринами здійснювалися відпо-

відно до Закону України № 3447 IV «Про захист тварин від жорстокого поводження» та Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для досліджень та наукових цілей (Страсбург, 1986).

Конфлікт інтересів. Автори заявляють про відсутність конфлікту інтересів.

Фінансування. Робота виконувалася в рамках фінансування дослідницького проекту у Національному університеті «Києво-Могилянська академія», № держреєстрації 0119U103427.

MORPHOFUNCTIONAL FEATURES OF HEMATOPOIETIC BONE MARROW PROGENITOR CELLS IN PATIENTS WITH CHRONIC MYELOID LEUKEMIA IN LONG-TERM CULTURE OF GEL DIFFUSION CHAMBERS *IN VIVO*

D.I. Bilko, I.S. Dyagil, Y.B. Chaikovsky

National University of Kyiv-Mohyla Academy, Kyiv, Ukraine

National Research Center for Radiation Medicine of the NAMS of Ukraine, Kyiv, Ukraine
Bogomolets National Medical University, Kyiv, Ukraine

E-mail: comraduk@yahoo.co.uk, leuk@ukr.net, yuchaiko@i.ua

The search for ways to support long-term cultivation of hematopoietic stem cells, their expansion, and studies of long-term growth kinetics and interactions of cells in normal and malignant processes remain among some of the most challenging issues of stem cell research. Solving these problems is one of the most important tasks of cell biology, biotechnology, and regenerative medicine. The analysis of features of proliferation and differentiation of the bone marrow derived from the patients with chronic myeloid leukemia and normal bone marrow in long-term culture of the original gel diffusion chambers implanted in the abdominal cavity of laboratory animals was conducted. The suspension culture in chambers of original design *in vivo*, the method of determining hematopoietic progenitor cells in semi-liquid agar *in vitro*, cytological, statistical methods were used. The results of the cultivation showed that the bone marrow cells of chronic myeloid leukemia (CML) patients with detected Ph chromosome had a significant proliferative potential up to the 30th day in the culture, which was twice the normal values. Further on, the colony-forming activity declined rapidly in contrast to normal bone marrow, where active hematopoiesis was maintained for up to 1.5 months. The peculiarities in cell differentiation in clones were manifested in the predominance of erythroid pro-

genitor cells in CML, while granulocyte-macrophage progenitor cells predominated in the norm. Thus, the proposed cultural system of long-term support of hematopoiesis provides an approach to the study of normal human hematopoiesis and opens up prospects for addressing the nature of the transformed population of cells in malignant diseases of the hematopoietic system.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

- Abarrategi A, Mian SA, Passaro D, Rouault-Pierre K, Grey W, Bonnet D. (2018) Modeling the human bone marrow niche in mice: From host bone marrow engraftment to bioengineering approaches. *J Exp Med* 215(3):729–743. doi: 10.1084/jem.20172139
- Abbonante V, Di Buduo CA, Gruppi C, Malara A, Gianelli U, Celesti G, Anselmo A, Laghi L, Vercellino M, Visai L, Iurlo A, Moratti R, Barosi G, Rosti V, Balduini A. (2016) Thrombopoietin/TGF-beta1 loop regulates megakaryocyte extracellular matrix component synthesis. *Stem Cells* 34(4):1123–33. doi:10.1002/stem.2285
- Acar M, Kocherlakota KS, Murphy MM, Peyer JG, Oguro H, Inra CN, Jaiyeola C, Zhao Z, Luby-Phelps K, Morrison SJ. (2015) Deep imaging of bone marrow shows non-dividing stem cells are mainly perisinusoidal. *Nature* 526(7571):126–130. doi: 10.1038/nature15250
- Anthony B, Link D. (2014) Regulation of hematopoietic stem cells by bone marrow stromal cells. *Trends Immunol* 35(1):32–37. doi: 10.1016/j.it.2013.10.002
- Aqmasheh S, Shamsasanjan K, Akbarzadehlaleh P, Pashoutan Sarvar D, Timari H (2017) Effects of Mesenchymal Stem Cell Derivatives on Hematopoiesis and Hematopoietic Stem Cells. *Adv Pharm Bull* 7(2):165–177. doi:10.15171/apb.2017.021
- Bilko D. Patent. № 146819 Ukraine, MPK (2021. 01) inventor (2021) Method of long-term cultivation of hematopoietic stem cells. Applicant and Patent. Bilko D.I. № u 2020 08462; stated 18.03/21; Bjul. 17.03.2021. 6 p. (in Ukrainian)
- Bilko D, Chaikovsky Y. (2021) The role of substrate stiffness in maintaining pluripotency of embryonic stem cells *in vitro* culture. *Fiziol. Zhurn.* 67(3):27–34. (Ukrainian)
- Ch'avez-Gonz'alez A, Ayala-S'anchez M, Sanchez-Valle E, Ruiz-Sanchez E, Arana-Trejo RM, Vela-Ojeda J, Mayani H. (2006) Functional integrity *in vitro* of hematopoietic progenitor cells from patients with chronic myeloid leukemia that have achieved hematological remission after different therapeutic procedures. *Leuk Res* 30(3):286–295. doi: 10.1016/j.leukres.2005.06.028
- Chaikovsky Y., Deltsova O., Gerashchenko S. (2014) Stem cells. Ivano-Frankivsk: Town NV (Ukrainian).

- Chowdhury F, Li Y, Chuin Poh Y, Tamaki T, Wang N, Tanaka T. (2010) Soft substrates promote homogeneous self-renewal of embryonic stem cells via downregulating cell-matrix tractions. *PLoS One* 5(12):e15655. doi: 10.1371/journal.pone.0015655
- Dexter TM, Allen T, Lajtha L. (1977) Conditions controlling the proliferation of haemopoietic stem cells *in vitro*. *J Cell Physiol* 91(3):335–344. doi: 10.1002/jcp.1040910303
- Dexter TM, Lajtha L. (1974) Proliferation of Haemopoietic Stem Cells *in Vitro*. *Br J Haematol* 28(4):525–530. doi: 10.1111/j.1365-2141.1974.tb06671.x
- Diachenko M, Bilko N, Dyagil I. (2013) Alterations in functional properties of bone marrow stem cells in chronic myeloid leukemia patients with different response to tyrosine kinase inhibitors treatment. *Exp Oncol* 35:135
- Gartner S, Kaplan H. (1980) Long term culture of human bone marrow cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 77(8):4756–4759. doi:10.1073/pnas.77.8.4756
- Gluzman DF, Abramenko IV, Sklyarenko LM, Nadgornaya VA. (1998) Laboratory diagnosis of oncohematological diseases. Kiev: Morion, 1998. 336 p. (Ukrainian)
- Holyoake T, Jiang X, Drummond M, Eaves A, Eaves C. (2002) Elucidating critical mechanisms of deregulated stem cell turnover in the chronic phase of chronic myeloid leukemia. *Leukemia* 16(4):549–558. doi: 10.1038/sj.leu.2402444
- Holzapfel B, Hutmacher D, Nowlan B, Barbier V, Thibaudeau L, Theodoropoulos C, Hooper J, Loessner D, Russell C, Pettit A, Winkler I, Levesque J. (2015) Tissue engineered humanized bone supports human hematopoiesis *in vivo*. *Biomaterials* 61:103–114. doi: 10.1016/j.biomaterials.2015.04.057
- Kuznietsova H, Dziubenko N, Byelinska I, Hurmach V, Bychko A, Lynchak O, Milokhov D, Khilya O, Rybalchenko V. (2020) Pyrrole derivatives as potential anti-cancer therapeutics: synthesis, mechanisms of action, safety. *J Drug Targeting* 28(5):547–563. doi: 10.1080/1061186X.2019.1703189
- Srouf E, Hofman R, Zanzan E (1992) Animal Models for Human Hematopoiesis. *J Hematother* 1(2):143–153. doi: 10.1089/scd.1.1992.1.143
- Sviezhentseva I, Perekhrestenko T, Bilko D, Gordienko A, Diachenko M, Dyagil I. (2015) Functional activity of 34-positive cells in chronic myeloid leukemia patients with different response to imatinib therapy. *Exp Oncol* 37(1):70–72
- Verfaillie C, Miller W, Boylan K, McGlave P. (1992) Selection of Benign Primitive Hematopoietic Progenitors in Chronic Myelogenous Leukemia on the Basis of HLA-DR Antigen Expression. *Blood* 79(4):1003–1010

Надійшла в редакцію 30.07.21
Після доопрацювання 11.08.21
Прийнята до друку 18.01.22