

УДК 539.16.04+612.119

Д. І. Білько, І. З. Руссу, Р. В. Бойко, Н. М. Білько✉

Національний університет «Києво-Могилянська академія», вул. Г. Сковороди, 2, Київ, 04070, Україна

ГУМАНІЗОВАНА МОДЕЛЬ КУЛЬТИВУВАННЯ ІЗОЛЬОВАНОЇ СУСПЕНЗІЇ ГЕМОПОЕТИЧНИХ КЛІТИН-ПОПЕРЕДНИЦЬ ДЛЯ ВИВЧЕННЯ ВПЛИВУ ІОНІЗУЮЧОЇ РАДІАЦІЇ *IN VIVO*

Мета дослідження – створення гуманізованої системи культивування клітин поза організмом людини (людина–миша) і дослідження в ній впливу іонізуючої радіації у зростаючих дозах на колонієутворюючу здатність гемопоетичних клітин-попередниць.

Матеріали і методи. Зразки кісткового мозку осіб без захворювань системи крові культивували у гелевих дифузійних камерах із напіврідким агаром у черевній порожнині мишей лінії СВА, підданих дії іонізуючої радіації. Проводили підрахунок клітинних агрегатів, отриманих у культурі дифузійних камер *in vivo*, та визначали ефективність колонієутворення клітин кісткового мозку.

Результати. Виявлено стимуляцію колонієутворення під дією іонізуючої радіації у зростаючих дозах на тварин-реципієнтів камер, що свідчить опосередковано про синтез колонієстимулюючого фактора в організмі мишей і проникнення його у дифузійні камери з клітинами кісткового мозку людини. Вивчено дію на організм мишей цитостатиків, які в експериментально підібраній дозі викликають стимуляцію колонієутворення у культурах клітин, як через 24 години, так і через 2 години після введення.

Висновки. У роботі оцінено здатність гемопоетичних клітин-попередниць кісткового мозку до утворення колоній і кластерів при культивуванні в напіврідкому агарі у гелевих дифузійних камерах *in vivo* та встановлено зв'язок з дозою опромінення у відповідних межах, що свідчить про клональний характер росту клітинних агрегатів у культурі. Показано, що оброблення тварин за добу до експерименту введенням цитостатиків зіставне з дією іонізуючої радіації і може використовуватись для вивчення гемопоезу в системі «людина–миша».

Ключові слова: гемопоетичні клітини-попередниці, зовнішнє рентгенівське опромінення, цитостатики, культура клітин у гелевих дифузійних камерах у системі «людина–миша».

Проблеми радіаційної медицини та радіобіології. 2021. Вип. 26. С. 235–247. doi: 10.33145/2304-8336-2021-26-235-247

✉ Білько Надія Михайлівна, e-mail: nadia.bilko@gmail.com

D. I. Bilko, I. Z. Russu, R. V. Boiko, N. M. Bilko✉

National University of Kyiv-Mohyla Academy, G. Skovorody Str. 2, Kyiv, 04070, Ukraine

HUMANIZED MODEL OF ISOLATED SUSPENSION CULTIVATION OF HEMATOPOIETIC PROGENITOR CELLS FOR THE INVESTIGATION OF IONIZING RADIATION INFLUENCE *IN VIVO*

Objective: development of the humanized system for cells cultivation outside the human organism (human–mouse) and investigation of the influence of ionizing radiation in increasing doses on the colony-forming ability of hematopoietic progenitor cells.

Materials and methods. Bone marrow samples of individuals without blood system diseases were cultivated in gel diffusion chambers with semi-solid agar in the abdominal cavity of CBA mice exposed to ionizing radiation action. Cell aggregates, which were obtained in the culture of diffusion chambers *in vivo*, were counted and colony-forming efficiency of bone marrow cells was determined.

Results. We revealed the stimulation of colony forming under the action of ionizing radiation in increasing doses on the animals-recipients of the chambers, which indirectly indicates the synthesis of colony-stimulating factor in the mice organism and its permeation into the diffusion chambers with human bone marrow cells. The effect of cytostatics action on the mice organism was investigated, which in experimentally selected dose cause stimulation of colony forming in cell cultures, both 24 hours and 2 hours after administration.

Conclusions. The ability of hematopoietic progenitor cells of bone marrow to form colonies and clusters was evaluated during the cultivation in semi-solid agar in gel diffusion chambers *in vivo*, as well as the association with the number of explanted cells in the appropriate range was established, which indicates the clonal nature of cell aggregates growth in culture. It was shown that the treatment of animals the day prior to experiment with administration of cytostatics is comparable to the action of ionizing radiation and can be used to study hematopoiesis in «human–mouse» system.

Key words: hematopoietic progenitor cells, internal roentgen radiation, cytostatics, cell culture in gel diffusion chambers in «human–mouse» system.

Problems of Radiation Medicine and Radiobiology. 2021;26:235-247. doi: 10.33145/2304-8336-2021-26-235-247

ВСТУП

Вплив іонізуючої радіації на біологічні системи може спричинити дуже широкий спектр наслідків, зокрема, й серйозні патологічні стани. Імовірність контакту з джерелом випромінювання на сьогодні доволі висока у зв'язку з професійною діяльністю людини та наявністю джерел іонізуючої радіації у довкіллі. Тому важливим є подальше вивчення закономірностей впливу іонізуючого опромінення на біологічні системи, як на молекулярному рівні, так і на рівні органів та систем. Однією з таких систем, що володіє високою радіочутливістю, є кровотворна система. Радіаційна інактивація стовбурових кровотворних клітин і клітин, що діляться, компенсується істотним зростанням відносної частки проліферуючих клітин. Цей процес охоплює каскад подій на клітинному і молекулярному рівнях, які, на жаль, не враховуються в системі *in vitro*.

INTRODUCTION

The influence of ionizing radiation on biological systems can cause a very wide range of consequences, including serious pathological conditions. The probability of contact with the radiation source is rather high today due to human professional activities and the presence of ionizing radiation sources in the environment. Therefore, it is important to study further the patterns of ionizing radiation influence on the biological systems, both at molecular level and at the level of organs and systems. One of these systems which possess high radiosensitivity is hematopoietic system. Radiation inactivation of hematopoietic stem cells and dividing cells is compensated by significant increase in the relative fraction of proliferating cells. This process involves cascade of events at the cellular and molecular levels, which, unfortunately, are not taken into account in the *in vitro* system.

✉ Nadiia M. Bilko, e-mail: nadia.bilko@gmail.com

Основна мета реалізації клітинних технологій полягає у створенні поза організмом оптимальних умов, у яких могли б розвиватися, проліферувати і диференціюватися будь-які клітини. Розробка новітніх підходів для вивчення дії іонізуючої радіації *ex vivo* залишається безумовно важливим напрямком у сфері радіобіологічних досліджень. Серед таких підходів – культивування клітин поза організмом у культурі *in vivo*.

Кровотворна тканина була, як відомо, першим об'єктом для культивування *in vitro*. Минуло понад 100 років, але й дотепер продовжуються пошуки таких прийомів культивування, які б дозволили впродовж тривалого часу підтримувати проліферацію і диференціювання гемопоетичних клітин [1, 2]. Разом з природними створено безліч рекомбінантних цитокінів і живильних середовищ. Проте підтримка гемопоезу *ex vivo* цим не обмежується. Вагомий внесок в успішне культивування клітин привнесли результати дослідження мікрооточення і жорсткості субстрату. На це вказує аналіз кінетики проліферації ембріональних стовбурових клітин на м'якій основі з поліакриламідного гелю [3–5]. За час вивчення гемопоезу створено декілька моделей, що імітують фізіологічний стан кровотворної тканини. Гуманізована модель «людина–миша» представляє спосіб культивування клітин людини в організмі мишей.

Існує кілька варіантів того, як саме гемопоетичні клітини з кісткового мозку людини будуть імплантовані до організму мишей. Дослідники пропонують варіант, коли суспензія клітин спочатку культивується *in vitro*. У цей час частково відбувається процес диференціювання гемопоетичних стовбурових клітин (ГСК). Далі у спеціальному скаффолді (ємності з органічного скла чи полістиролу з фільтрами) культивовані ГСК разом з їхніми нащадками імплантують до організму мишей. У іншому підході в організм мишей спочатку занурюють скаффолд, після чого переносять культивовану заздалегідь суспензію ГСК чи вводять у хвостову вену мишей кісткомозкові клітини, які мігрують у штучно створену для них нішу [6, 7]. Існує спосіб введення фрагмента кісточки під капсулу нирки мишей, до якої мігрують гемопоетичні клітини миші-хазяїна, створюючи осередок кровотворення. Такий підхід називається гетеротопною трансплантацією [8]. Всі ці моделі представляють відкриті системи, у яких ГСК заселяють пропоновану територію [9, 10, 11].

Дифузійні камери є закритими системами, у які вводяться гемопоетичні клітини людини у суспензії

The main goal of the realization of cell technologies is to create optimal conditions outside the organism, in which any cells could develop, proliferate and differentiate. Development of the novel approaches to study ionizing radiation action *ex vivo* remains certainly an important area in the field of radiobiological research. Among such approaches is the cultivation of cells outside the organism in the *in vivo* culture.

Hematopoietic tissue was known to be the first object for cultivation *in vitro*. More than 100 years have passed, but the search is still ongoing for such cultivation techniques which would allow maintaining the proliferation and differentiation of hematopoietic cells for a long time [1, 2]. Along with natural ones, many recombinant cytokines and nutrient media have been developed. However, support of hematopoiesis *ex vivo* is not limited to this. Significant contribution into successful cultivation of the cells was made by the results of investigation of microenvironment, as well as the stiffness of substrate. This is indicated by the analysis of proliferation kinetics of embryonic stem cells on a soft substrate of polyacrylamide gel [3–5]. During the study of hematopoiesis, several models were developed which imitate the physiological state of hematopoietic tissue. Humanized «human–mouse» model is a method of cultivation of human cells in the mice organism.

There are several variants for how exactly hematopoietic cells from human bone marrow will be implanted into mice organism. The researchers suggest an option in which cell suspension is firstly cultivated *in vitro*. At this period the process of differentiation of hematopoietic stem cells (HSC) partially occurs. Then in a special scaffold (container of plexiglass or polystyrol with filters) cultivated HSCs together with their descendants are implanted into the mice organism. In another approach, firstly the scaffold is implanted into the mice organism, and after that previously cultivated HSC suspension is inserted or bone marrow cells are injected into the tail vein of the mice, which migrate into the artificially created for them niche [6, 7]. There is a method of introducing the bone fragment under the capsule of mice kidney, to which hematopoietic cells of the host mouse migrate, creating hematopoietic compartment. This approach is called heterotopic transplantation [8]. All these models represent open systems in which HSCs repopulate the proposed area [9, 10, 11].

Diffusion chambers are closed systems into which human hematopoietic cells are injected in suspen-

перед тим, як бути імплантованими в організм мишей-реципієнтів. Методика культивування клітин кісткового мозку ссавців у дифузійних камерах *in vivo* запропонована ще в 1960-х роках [12, 13]. Доведено, що тварина-реципієнт камер забезпечує культуру живильними речовинами, цитокінами і ростовими факторами. Гемопоез неможливий без регулюючого впливу доменів структури кісткового мозку. Механізми проліферації та диференціювання ГСК є багатокомпонентними. Частина цього механізму управління утворюють функціональний блок – нішу ГСК. Мезенхімальна тканина визначена як основний регулюючий компонент ніш ГСК, і кровотворення у кістковому мозку є продуктом взаємодії компонентів ніші. Дослідження гемопоетичних клітин, занурених у дифузійних камерах в черевну порожнину мишей, є кроком для поглибленого вивчення взаємодії між гемопоетичними клітинами та мікрооточенням.

Для створення камер для культивування кісткового мозку можуть використовуватись різні матеріали. Вони не повинні викликати у реципієнта і трансплантату імунної реакції, при цьому створюючи сприятливе середовище для фізіологічного функціонування ГСК та їхніх похідних. Причому камера є не просто місцем розташування клітин. Це територія, на якій будується осередок кровотворення. Клітини не покидають камеру і не мігрують ззовні.

Невдовзі з'ясувалося, що не тільки сам матеріал, з якого побудована камера, але і його жорсткість впливають на самопідтримку клітин у камері. Їм необхідна визначена м'якість носія, що забезпечує механічну взаємодію структур, які будують нову територію. Так, нами були запропоновані камери з поліакриламідного гелю. Завдяки гнучкості та оптичній прозорості їх зручно використовувати для аналізу кінетики розвитку клітин, не порушуючи взаєморозташування клітин. В експериментальних умовах, за рахунок удосконалення способу виготовлення гелевої дифузійної камери, вдалось отримати таку жорсткість гелю (0,6 кПа), яка в умовах, найбільш наближених до фізіологічних, забезпечує підтримку гемопоезу в культурі клітин [14].

МЕТА ДОСЛІДЖЕННЯ

Метою роботи було створення гуманізованої системи культивування клітин поза організмом людини (людина–миша), яка б дозволила вивчати дію іонізуючої радіації на гемопоез людини в умовах найбільш наближених до природних, а також дослідження у ній впливу на колонієутворюючу

сion before being implanted into recipient mice. The method of cultivation of mammalian bone marrow cells in diffusion chambers *in vivo* was proposed in the 1960s [12, 13]. It is proved that animals-recipient of the chambers provide the culture with nutrients, cytokines and growth factors. Hematopoiesis is impossible without the regulatory influence of the domains of bone marrow structure. The mechanisms of HSC proliferation and differentiation are multi-component. Parts of this managing mechanism form a functional block – the niche of HSC. Mesenchymal tissue is defined as the main regulatory component of HSC niches, and hematopoiesis in the bone marrow is a product of niche components interaction. Investigation of hematopoietic cells inserted in diffusion chambers in the abdominal cavity of the mice is a step towards profound study of the interaction between the hematopoietic cells and microenvironment.

Various materials can be used to develop the chambers for bone marrow cultivation. They should not cause immune response in the recipient and transplant, at the same time creating the favorable environment for the physiological functioning of HSCs and their derivatives. Besides, chamber is not just the location area for the cells. This is the territory on which hematopoietic site is built. Cells do not leave the chamber and do not migrate from the outside.

It soon became clear that not only the material itself from which the chamber is made, but also its stiffness affect self-maintenance of the cells in chamber. They need a certain softness of the matrix, which provides mechanical interaction of the structures building new territory. Thus, we have proposed polyacrylamide gel chambers. Due to their flexibility and optical transparency, it is convenient to use them to analyze the kinetics of cell development, without the disarranging of cells collocation. Under experimental conditions, based on the improvement of gel diffusion chamber manufacturing method, it was possible to obtain such gel stiffness (0.6 kPa), which in the conditions closest to physiological provides the support for hematopoiesis in cell culture [14].

OBJECTIVE

The aim of the work was developing the humanized system of cell cultivation outside the human organism (human–mouse), which would allow studying the ionizing radiation action on human hematopoiesis in the conditions closest to natural, as well as the investigation of the influence of cytostat-

здатність гемопоетичних клітин-попередниць цитостатиків та іонізуючої радіації у зростаючих дозах.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

Дослідження було проведено з використанням мишей СВА як реципієнтів камер, що містили суспензію гемопоетичних клітин-попередниць людини у напіврідкому агарі. Матеріалом для культивування слугували зразки кісткового мозку, отримані з фрагментів ребер, вилучених при хірургічних втручаннях у пацієнтів без гематологічних захворювань (15 осіб). Пацієнти дали усвідомлену згоду використовувати їхній матеріал для дослідницьких цілей.

Мишей-реципієнтів заздалегідь піддавали дії іонізуючої радіації з метою вивільнення колонієстимулюючих факторів у відповідь на опромінення. Так, 150 тварин (миші-самці лінії СВА) були розподілені на 5 груп по 5 тварин у кожній групі. Опромінення здійснювали у різних дозах на установці РУМ-17 з приставкою для ротації об'єкта, що опромінюється, зі швидкістю обертання 2 об./хв. Дозове навантаження складало 2 Гр, 4 Гр, 6 Гр, 8 Гр і 9 Гр. Шоста група була не опромінена і вважалася контрольною. Експерименти проводили у п'яти повторах. Всі маніпуляції з тваринами здійснювали відповідно до вимог біоетики та міжнародних принципів Європейської конвенції про захист тварин і національного законодавства з гуманного поводження з тваринами, що використовуються для експериментальних та інших наукових цілей.

До зразків кісткового мозку додавали фосфатний буферний розчин PBS (Invitrogen, Німеччина) у співвідношенні 1 : 3. Клітинну суспензію відділяли центрифугуванням (30 хв при 750 g) у градієнті Histopaque (Sigma-Aldrich, США) щільністю 1,077 г/мл. Виділені клітини тричі відмивали у PBS (10 хв 250 g), підраховували кількість клітин у камері Горяєва і в кількості 1×10^5 клітин у напіврідкому агарі вносили у повне живильне середовище, яке включало середовище DMEM (Gibco, Німеччина), 2 ммоль L-глютаміну (Gibco, Німеччина), антибіотики: 50 ОД/мл пеніциліну та 50 мг/мл стрептоміцину (Gibco, Німеччина), 10 % фетальної телячої сироватки (Sigma-Aldrich, США) і 0,33 % агар (Difco, США). Дифузійні камери визначеної жорсткості виготовляли з поліакриламідного гелю [14]. Суспензію клітин у напіврідкому агарі вводили шляхом проколу бокової стінки камери голкою з шприцом.

Надалі камери були імплантовані в черевну порожнину лінійних мишей СВА (2 камери на ми-

шес and ionizing radiation in increasing doses on the colony-forming ability of hematopoietic progenitor cells in it.

MATERIALS AND METHODS

The study was performed using CBA mice as the recipients of chambers containing the suspension of human hematopoietic progenitor cells in semi-solid agar. The material for cultivation were bone marrow samples obtained from fragments of ribs, removed during surgical interventions in patients without hematological diseases (15 individuals). Patients have given their informed consent to use their material for research purposes.

Recipient mice were previously exposed to ionizing radiation action in order to release colony-stimulating factors in response to irradiation. Thus, 150 animals (male CBA mice) were divided into 5 groups of 5 animals in each group. Irradiation was carried out in different doses on the RUM-17 unit with an attachment for the rotation of irradiated object with a rotation speed of 2 rpm. The dose load was 2 Gy, 4 Gy, 6 Gy, 8 Gy, and 9 Gy. The sixth group was not irradiated and was considered as a control one. The experiments were performed in five repeats. All the manipulations with animals were carried out in accordance with the requirements of bioethics and international principles of European Convention for the Protection of Animals and national legislation on the humane treatment of animals used for experimental and other scientific purposes.

PBS phosphate buffer solution (Invitrogen, Germany) was added to bone marrow samples in the ratio of 1:3. The cell suspension was separated by centrifugation (30 min at 750 g) in the Histopaque gradient (Sigma-Aldrich, USA) at the density of 1.077 g/ml. Selected cells were washed three times in PBS (10 min at 250 g), the number of cells was counted in the Goryaev chamber, and the cells in the amount of 1×10^5 in semi-solid agar were placed in complete nutrient medium, which included DMEM medium (Gibco, Germany), 2 mmol L-glutamine (Gibco, Germany), antibiotics: 50 U/ml penicillin and 50 mg/ml streptomycin (Gibco, Germany), 10 % fetal calf serum (Sigma-Aldrich, USA) and 0.33 % agar (Difco, USA). Diffusion chambers of determined stiffness were made of polyacrylamide gel [14]. The cell suspension in semi-solid agar was injected by puncturing the side wall of the chamber with needle and syringe.

Subsequently, the chambers were implanted in the abdominal cavity of linear CBA mice (2 chambers per

шу); операцію проводили під тіопенталовою анестезією (Київмедпрепарат, Україна). У двотижневий термін мишей забивали методом цервікальної дислокації спинного мозку, вилучали камери і завдяки їхній прозорості вивчали під інвертованим мікроскопом (Zeiss, Німеччина).

Підраховували загальну кількість колоній (агрегати, що складаються більш ніж з 40 клітин) та кластерів (до 40 клітин), що утворилися в процесі культивування. Визначали середнє значення цих показників і стандартне відхилення, а також порівнювали їх за допомогою t-критерію Стьюдента для незалежних вибірок; відмінності вважали статистично значущими при $p < 0,05$. Отримані дані аналізували за допомогою інструментів Microsoft Excel.

У наступній серії експериментів опромінення тварин замінили на оброблення цитостатиками, діючою речовиною яких є циклофосфамід моногідрат. Циклофосфамід – це антинеопластичний засіб класу оксазафосфоринів. Він неактивний *in vitro*. Циклофосфамід активується *in vivo*, головним чином, за допомогою мікросомальних ензимів у печінці. Цитотоксична дія циклофосфаміду базується на взаємодії між його алкілувальними метаболітами і ДНК. Це алкілування призводить до розриву та перехресного з'єднання ниток ДНК, а також ДНК і білків [8]. Тваринам-реципієнтам за добу до експерименту вводили циклофосфамід (Sandoz, Австрія), циклофосфан (Arterium, Україна) чи ендоксан (Baxter, Німеччина) у дозах, підібраних емпірично. У всіх трьох випадках доза 200 мг/кг маси тварин була оптимальною і відповідала опроміненню тварин у сублетальній дозі. Наступні етапи культивування клітин були такі ж самі, як і після дії іонізуючої радіації.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

Відомо, що в процесі культивування *in vitro* у напіврідкому агарі гемопоетичні клітини-попередниці проліферують та утворюють колонії і кластери в культурі. Чи можна вважати колоніями клітинні агрегати, які формуються у подібних умовах у гелевих дифузійних камерах, імплантованих у черевну порожнину лабораторних тварин? Для відповіді на це запитання необхідно було знайти межі клітинних концентрацій, у зоні яких існує лінійна залежність між кількістю експлантованих клітин та кількістю утворених в агарі колоній. Для цього клітини кісткового мозку обстежених осіб вводили у напіврідкому агарі в гелеві дифузійні камери у концентраціях $0,25 \times 10^5$, $0,55 \times 10^5$, $1,65 \times 10^5$, $5,0 \times$

mouse); the operation was performed under thiopental anesthesia (Kyivmedpreparat, Ukraine). Within two weeks, the mice were killed by cervical dislocation of spinal cord, the chambers were removed and due to their transparency they were examined under the inverted microscope (Zeiss, Germany).

The total number of colonies (aggregates consisting of more than 40 cells) and clusters (up to 40 cells) formed during cultivation was counted. The mean of these indices and standard deviation were determined and compared using Student's t-test for independent samples; differences were considered statistically significant at $p < 0.05$. The obtained data were analyzed using Microsoft Excel tools.

In the next series of experiments the irradiation of animals was replaced by treatment with cytostatics, the active substance of which is cyclophosphamide monohydrate. Cyclophosphamide is an antineoplastic agent of the oxazaphosphorine class. It is inactive *in vitro*. Cyclophosphamide is activated *in vivo*, mainly by microsomal enzymes in the liver. The cytotoxic action of cyclophosphamide is based on the interaction between its alkylating metabolites and DNA. This alkylation leads to the break and cross-linking of DNA strands, as well as of DNA and proteins [8]. Recipient animals the day prior to experiment were administered to cyclophosphamide (Sandoz, Austria), cyclophosphan (Arterium, Ukraine) or endoxan (Baxter, Germany) in empirically selected doses. In all three cases, the dose of 200 mg/kg of animal weight was optimal and corresponded to the irradiation of animals in sublethal dose. Subsequent stages of cell cultivation were the same as after ionizing radiation action.

RESULTS AND DISCUSSION

It is known that in the process of *in vitro* cultivation in semi-solid agar hematopoietic progenitor cells proliferate and form colonies and clusters in culture. Can we consider as colonies the cell aggregates which are formed under similar conditions in gel diffusion chambers implanted in the abdominal cavity of laboratory animals? To answer this question, it was necessary to find the limits of cell concentrations, in the area of which there is a linear relationship between the number of explanted cells and the number of colonies formed in agar. For this purpose, bone marrow cells of the examined individuals were injected in semi-solid agar into gel diffusion chambers in the concentrations of 0.25×10^5 ; 0.55×10^5 ; 1.65×10^5 ; 5.0×10^5 ; 10.0×10^5 ; 20.0×10^5 , and

10^5 , $10,0 \times 10^5$, $20,0 \times 10^5$ та $40,0 \times 10^5$ на 1 мл суспензії. Клітини кісткового мозку кожної концентрації культивували у 8–10 камерах. Облік утворення колоній та кластерів проводили на 14-й день культивування.

Отримані результати наведено в табл. 1. Підраховували кількість гранулоцитарно-макрофагальних колонієутворюючих одиниць (КУО-ГМ). У наших дослідженнях зона лінійної залежності знаходилася в інтервалі від $1,65 \times 10^5$ до $20,0 \times 10^5$ клітин в 1 мл суспензії.

Наявність прямої лінійної залежності між кількостями експлантованих клітин і колоній, які сформувались у результаті їх культивування в дифузійних камерах, свідчить про клональний характер росту клітинних агрегатів та доводить, що вони і є клонами, які створені однією клітиною-попередницею.

За ефективність колонієутворення було прийнято кількість колоній, які формуються в результаті експлантації 1×10^5 клітин. Іноді вдається отримати від донора менше 1×10^5 клітин. Яку б концентрацію клітин не було експлантовано в камери, їх можна перерахувати на 1×10^5 , якщо кількість клітин знаходиться в межах виявленої лінійної залежності.

У результаті аналізу культур виявилось, що при експлантації $0,05 \times 10^5$ і $0,11 \times 10^5$ клітин на камеру у першому випадку колонії через 2 тижні не формувалися, а в другому в цей термін було отримано $2,6 \pm 0,7$ колоній на 1×10^5 посаджених клітин. Збільшення кількості експлантованих клітин у три рази призвело до утворення всього лише $12,1 \pm 1,2$ колоній. Відсутність лінійної залежності в цих культурах є свідченням того, що такої концентрації клітин недостатньо для формування колоній; для них необхідна визначена концентрація клітин, яка створює

$40,0 \times 10^5$ per 1 ml of suspension. Bone marrow cells of each concentration were cultivated in 8–10 cameras. The assessment of colonies and clusters forming was carried out on the 14th day of cultivation.

The obtained results are shown in Table 1. The number of granulocyte-macrophage colony-forming units (CFU-GM) was estimated. In our studies, the linear dependence zone was in the range from 1.65×10^5 to 20.0×10^5 cells in 1 ml of suspension.

The presence of direct linear dependence between the quantities of explanted cells and colonies formed as a result of their cultivation in diffusion chambers indicates the clonal character of cell aggregates growth and proves that they are clones created by one progenitor cell.

As the efficiency of colony forming we accepted the number of colonies formed as a result of the explantation of 1×10^5 cells. Sometimes less than 1×10^5 cells can be obtained from the donor. Whatever cell concentration was explanted in the chambers, they can be re-estimated to 1×10^5 if the cell number is within the detected linear dependence.

As a result of cultures analysis it turned out that during explantation of 0.05×10^5 and 0.11×10^5 cells per chamber in the first case colonies did not form within 2 weeks, and in the second case we obtained 2.6 ± 0.7 colonies per 1×10^5 explanted cells in this period. Three times increase in the number of explanted cells led to the forming of only 12.1 ± 1.2 colonies. The absence of linear dependence in these cultures is the evidence that such concentration of the cells is not enough for colony forming; they need a determined concentration of cells,

Таблиця 1

Залежність колонієутворення у гелевих дифузійних камерах *in vivo* від кількості експлантованих гемопоетичних клітин

Table 1

Dependence of colony forming in gel diffusion chambers *in vivo* from the number of explanted hematopoietic cells

Кількість клітин на 1 мл суспензії Number of cells per 1 ml of suspension	Кількість клітин на 1 камеру об'ємом 0,2 мл Number of cells per 1 chamber with the volume of 0.2 ml	Кількість колоній на 1 камеру (КУО-ГМ) Number of colonies per 1 chamber (CFU-GM)	Кількість колоній на 1 мл суспензії Number of colonies per 1 ml of suspension
$0,25 \times 10^5$	$0,05 \times 10^5$	Немає росту / No growth	Немає росту / No growth
$0,55 \times 10^5$	$0,11 \times 10^5$	$2,6 \pm 0,7$	$13,6 \pm 2,5$
$1,65 \times 10^5$	$0,33 \times 10^5$	$12,1 \pm 1,2$	$62,1 \pm 6,5$
$5,0 \times 10^5$	$1,0 \times 10^5$	$36,8 \pm 2,3$	$187,3 \pm 12,0$
$10,0 \times 10^5$	$2,0 \times 10^5$	$72,4 \pm 8,4$	$360,5 \pm 17,1$
$20,0 \times 10^5$	$4,0 \times 10^5$	$144,0 \pm 18,2$	$712,7 \pm 31,6$
$40,0 \times 10^5$	$8,0 \times 10^5$	Зливний ріст / Merged growth	Зливний ріст / Merged growth

таке їх взаєморозташування, що відповідає оптимальному їхньому стану для проліферації клітин у клонах. Наявність лінійної залежності між концентрацією клітин, яка зростала від $0,33 \times 10^5$ до $4,0 \times 10^5$ на камеру, і кількістю колоній, свідчить про вірогідність такого припущення. Кількість колоній збільшувалася лінійно та дорівнювала відповідно $36,8 \pm 2,3$; $72,4 \pm 8,4$; $144,0 \pm 18,2$ колоній-клонів (табл. 1). Збільшення концентрації клітин призводило до зливного росту колоній, що унеможливлювало їх підрахунок. У подальших дослідженнях було обрано таку концентрацію клітин для експлантації, яка дорівнює 1×10^5 клітин.

Тварин-реципієнтів за добу до експерименту опромінювали в дозі 2 Гр, 4 Гр, 6 Гр, 8 Гр і 9 Гр. Було з'ясовано, що підвищення ефективності колонієутворення кісткового мозку в культурі клітин відбувалося при збільшенні дози опромінення від 2 Гр і вище (табл. 2). Максимальна ефективність колонієутворення гемопоетичними клітинами-попередницями спостерігалася після опромінення в дозах 8 Гр і 9 Гр та дорівнювала, відповідно, $54,0 \pm 8,6$ і $58,5 \pm 8,2$, що обумовлено підвищенням виробленням колонієстимулюючого фактора і супресією імунної реактивності реципієнта. Однак, при цих дозах опромінення втрачалася лінійна залежність і спостерігалася висока радіаційна загибель мишей до дня завершення експерименту – 45 % і 70 %, відповідно. Доза 6 Гр забезпечувала достатньо високу ефективність колонієутворення $38,0 \pm 4,3$ поруч з мінімальною загибеллю мишей від радіації (5 %).

Ми зосередились на аналізі утворення колоній, а не кластерів, оскільки кластери є результатом пролі-

which creates such their collocation that corresponds to the optimal state for cell proliferation in clones. Presence of the linear dependence between the concentration of cells growing from 0.33×10^5 to 4.0×10^5 per chamber, and the number of colonies, indicates the probability of such an assumption. The number of colonies grew linearly and equaled, respectively, 36.8 ± 2.3 , 72.4 ± 8.4 , and 144.0 ± 18.2 colonies-clones (Table 1). Increase in cell concentration led to the merge growth of colonies, which made their counting impossible. In subsequent studies, we have chosen such concentration of the cells for explantation, which equals to 1×10^5 cells.

Recipient animals were irradiated the day prior to experiment at a dose of 2 Gy, 4 Gy, 6 Gy, 8 Gy, and 9 Gy. It was determined that the growth in the colony-forming efficiency of bone marrow in cell culture occurred with an increase in radiation dose from 2 Gy and above (Table 2). Maximal colony-forming efficiency of hematopoietic progenitor cells was observed after irradiation in doses of 8 Gy and 9 Gy and equaled, respectively, 54.0 ± 8.6 and 58.5 ± 8.2 , which is due to the increased release of colony-stimulating factor and the suppression of recipient immune reactivity. However, with these doses of irradiation the linear dependence was lost, as well as high radiation death of mice to the final day of the experiment was observed – 45 % and 70 %, respectively. Dose of 6 Gy provided rather high colony-forming efficiency of 38.0 ± 4.3 along with minimal death of mice from radiation (5 %).

We have focused on the analysis of colony forming, not clusters, since clusters are the result of prolifera-

Таблиця 2

Вплив зростаючої дози опромінення мишей-реципієнтів на ефективність колонієутворення клітин кісткового мозку в культурі гелевих дифузійних камер *in vivo*

Table 2

Influence of the growing dose of irradiation of recipient mice on the colony-forming efficiency of bone marrow cells in the culture of gel diffusion chambers *in vivo*

Доза опромінення, Гр Dose of irradiation, Gy	Кількість клітин на 1 мл суспензії Number of cells per 1 ml of suspension	Кількість клітин на 1 камеру об'ємом 0,2 мл Number of cells per 1 chamber with 0.2 ml volume	Кількість колоній на камеру (КУО-ГМ) Number of colonies per 1 chamber (CFU-GM)	Кількість колоній на 1 мл суспензії Number of colonies per 1 ml of suspension	Відсоток мишей, що загинули, % Percentage of mice dead, %
0	5×10^5	1×10^5	$2,5 \pm 0,4$	$5,0 \pm 0,2$	0
2,0	5×10^5	1×10^5	$10,7 \pm 1,5$	$48,2 \pm 2,5$	0
4,0	5×10^5	1×10^5	$27,0 \pm 2,1$	$135,3 \pm 5,6$	0
6,0	5×10^5	1×10^5	$38,0 \pm 4,3$	$188,7 \pm 11,8$	5
8,0	5×10^5	1×10^5	$54,0 \pm 8,6$	$270,5 \pm 17,6$	45
9,0	5×10^5	1×10^5	$58,5 \pm 8,2$	$295,7 \pm 20,0$	70

ферації клітин-попередниць, які вже зробили кілька поділів до внесення в культуральне середовище, тож кількість клітин у них поступалася кількості клітин у колоніях. Тому кластероутворення не відображає стану кровотворення в культурі [15].

Нами не було виявлено статистично достовірної різниці між отриманими кількостями КУО-ГМ кісткового мозку, поміщеного в організм тварин-реципієнтів, після опромінення за 2 години та за 24 години до початку експерименту. Значення ефективності колонієутворення відповідно дорівнювали $36,5 \pm 3,8$ і $35,1 \pm 7,5$. Цей факт свідчить про те, що посилення утворення колонієстимулюючого фактора в організмі опроміненої тварини починається вже в перші години після опромінення.

Дія іонізуючої радіації на організм тварини зумовлює зростання в сироватці крові рівня колонієстимулюючого фактора, який сприяє підвищенню кількості гранулоцитів у периферійній крові. Це узгоджується з даними, отриманими нами при дослідженні наслідків опромінення щурів стронцієм-90. Зокрема, вивчення гематологічних показників лабораторних тварин дозволило виявити гіперпроліферативну реакцію кровотворних клітин кісткового мозку у ранній термін після початку внутрішнього опромінення. У периферійній крові опромінених тварин виявляли підвищену кількість гранулоцитів [15, 16]. Таким чином, опромінений реципієнт забезпечує культуру не тільки живильними речовинами, але й відносно стандартним (для даних умов) джерелом колонієстимулюючого фактора.

Так, після імплантації дифузійних камер у неопромінені мишей спостерігали незначний рівень колонієутворення (1–3 колонії на 1×10^5 експлантованих клітин). Опромінення мишей призводило до збільшення кількості колоній у камерах. У літературі є дані, які вказують на підвищення ефективності утворення колоній клітинами кісткового мозку мишей і собак при їх внесенні в агарових дифузійних камерах в організм опромінених мишей. Автори опромінювали тварин γ -променями ^{137}Cs . Дослідники вказують на дозу 850 рад, яка виявилася найбільш ефективною [8].

Доза опромінення рентгенівськими променями, яка забезпечувала б максимальну ефективність клонування у цій системі, нижча, ніж при опроміненні γ -променями ^{137}Cs , а радіаційна загибель мишей при збільшенні дози опромінення більша. Цей факт може бути пов'язаний з використанням різних типів радіації, тим більше, що рентгенівські промені володіють вищою відносною біологічною

tion of progenitor cells, which have already made several divisions before entering the cultural medium, so the number of cells in them is lower than the number of cells in colonies. Therefore, cluster forming does not reflect the state of hematopoiesis in culture [15].

We did not reveal statistically significant difference between the obtained quantities of CFU-GM of bone marrow, placed in the organism of recipient animals, after the irradiation 2 hours and 24 hours prior to the experiment. The values of colony-forming efficiency were equal to 36.5 ± 3.8 and 35.1 ± 7.5 , respectively. This fact suggests that the enhancement of the generation of colony-stimulating factor in the organism of irradiated animal begins in the first hours after irradiation.

The action of ionizing radiation on the animal's organism leads to the increase of the level of colony-stimulating factor in blood serum, which contributes to the raise in the number of granulocytes in peripheral blood. This is consistent with the data obtained during the investigation of the consequences of rats' irradiation with Strontium-90. In particular, the study of hematological indices of laboratory animals allowed detecting the hyperproliferative reaction of bone marrow hematopoietic cells in an early period after the beginning of internal irradiation. Elevated number of granulocytes was detected in the peripheral blood of irradiated animals [15, 16]. Thus, the irradiated recipient provides the culture with not only nutrients, but also with relatively standard (for these conditions) source of colony-stimulating factor.

Consequently, after the implantation of diffusion chambers into non-irradiated mice we observed low level of colony forming (1–3 colonies per 1×10^5 explanted cells). The irradiation of mice caused the growth in the number of colonies in chambers. There are data in the literature which indicate the increase in the colony-forming efficiency of bone marrow cells of mice and dogs when introduced in agar diffusion chambers in the organism of irradiated mice. The authors have irradiated the animals with γ -rays of ^{137}Cs . Researchers indicate the dose of 850 rad, which turned out to be the most effective [8].

The dose of X-rays, which would provide the maximal cloning efficiency in this system, is lower than during the irradiation with γ -rays of ^{137}Cs , and the radiation death of mice is higher with the increasing of radiation dose. This fact may be associated with the usage of different radiation types, especially since X-rays have higher relative biological efficiency of irradiation, compared to γ -rays [17].

ефективністю опромінення порівняно з γ -променями [17].

Так, при опроміненні тварин в дозі 2 Гр кількість колоній у камерах становила $10,7 \pm 1,5$, а в дозі 4 Гр – $135,3 \pm 11,8$. Збільшення колонієутворення спостерігалось при подальшому зростанні дози опромінення до 6 Гр, якій відповідало $188,7 \pm 11,8$ колоній на 1 мл і $38,0 \pm 4,3$ – на камеру з розрахунку, що внутрішній об'єм камери містить 0,2 мл суспензії. Дози опромінення 8 Гр і 9 Гр супроводжувались активним колонієутворенням; його ефективність дорівнювала $270,5 \pm 17,6$ і $295,7 \pm 20,0$ на 1 мл суспензії, відповідно. Проте ці дози опромінення спричиняли значну загибель мишей. Доза 6 Гр виявилася такою, що забезпечувала високий рівень колонієутворення при мінімальній загибелі тварин. Тому для подальших досліджень була обрана саме ця доза опромінення.

На наступному етапі експериментальних досліджень порівнювали вплив цитостатиків на здатність кістковомозкових клітин утворювати колонії в культурі гелевих дифузійних камер *in vivo*. Метою цього етапу було емпірично підібрати такі дози цитостатиків, які стимулювали б колонієутворення в культурі та не призводили до загибелі тварин, підданих дії цих препаратів за добу до експерименту. Зважаючи на те, що всі три препарати створені на основі циклофосфаміду, ми припустили, що результати повинні бути зіставними. Аналіз отриманих даних свідчив, що препарати можуть слугувати стимулом для колонієутворення в культурі *in vivo* і їхня дія є зіставною з результатом впливу сублетальної дози радіації (рис. 1).

Так, кількість отриманих КУО-ГМ при обробці тварин-реципієнтів циклофосфамідом, циклофосфаном чи ендоксаном у порівнянні з дією іонізуючої радіації в сублетальній дозі суттєво не відрізнялася ($36,9 \pm 2,6$; $36,5 \pm 3,8$; $37,2 \pm 3,3$; $38,0 \pm 4,3$, відповідно). Водночас у контрольній групі без наявності стимулів, коли вони були замінені на фосфатно-буферний розчин, колонієутворення зовсім не спостерігалось, а в культурі клітин виявляли лише 3–5 кластерів.

Відомо, що при застосуванні препаратів з діючою речовиною циклофосфамідом виникають явища пригнічення функції кісткового мозку, що викликає цитопенію. В організмі опроміненої тварини у відповідь на цитопенію, спричинену опроміненням чи введенням цитостатиків, відбувається активний синтез цитокінів, і серед них колонієстимулюючого фактора, який проникає

Thus, when animals were irradiated with the dose of 2 Gy, the number of colonies in the chambers amounted to 10.7 ± 1.5 , and at the dose of 4 Gy – to 135.3 ± 11.8 . The increase in colony forming was observed with further growth of irradiation dose to 6 Gy, which corresponded to 188.7 ± 11.8 colonies per 1 ml and 38.0 ± 4.3 per chamber based on the estimation that the internal volume of the chamber contains 0.2 ml of suspension. Irradiation doses of 8 Gy and 9 Gy were accompanied by active colony forming; its efficiency equaled to 270.5 ± 17.6 and 295.7 ± 20.0 per 1 ml of suspension, respectively. However, these radiation doses caused significant death of mice. The dose of 6 Gy appeared to be the one that provided a high level of colony forming with the minimal death of animals. Therefore, this dose of irradiation was chosen for further investigations.

At the next stage of experimental studies we compared the influence of cytostatics on the ability of bone marrow cells to form colonies in the culture of gel diffusion chambers *in vivo*. The purpose of this stage was empirically determining of such doses of cytostatics, which would stimulate colony forming in culture and would not lead to the death of animals treated with these preparations the day prior to experiment. Taking into account that all three preparations are developed on the basis of cyclophosphamide, we assumed that the results should be comparable. Analysis of the obtained data showed that preparations can serve as stimulus for colony forming in the *in vivo* culture and their action is comparable to the result of the influence of sublethal radiation dose (Fig. 1).

Thus, the number of obtained CFU-GM did not differ significantly in case of the treatment of recipient animals with cyclophosphamide, cyclophosphan or endoxan comparing to the action of ionizing radiation in a sublethal dose (36.9 ± 2.6 ; 36.5 ± 3.8 ; 37.2 ± 3.3 ; 38.0 ± 4.3 , respectively). At the same time, in the control group without the presence of stimuli, when they were replaced by phosphate-buffer solution, colony forming was not observed at all, and only 3–5 clusters were detected in cell culture.

It is known that when using preparations with cyclophosphamide as an active ingredient, the phenomena of inhibition of bone marrow function appear, which causes cytopenia. In the organism of the irradiated animals in response to cytopenia, caused by irradiation or cytostatics administration, the active synthesis of cytokines occurs, and among

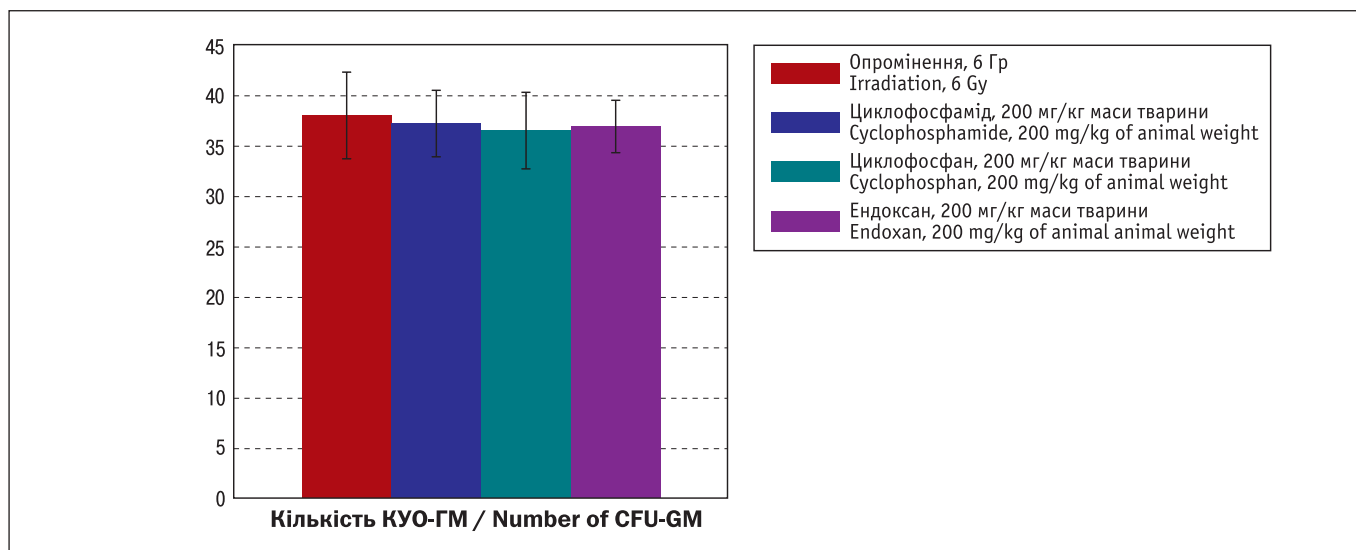


Рисунок 1. Порівняльний аналіз стимулів кісткового мозку пацієнтів без гематологічних захворювань до колонієутворення в культурі гелевих дифузійних камер *in vivo*

Figure 1. Comparative analysis of the stimuli of bone marrow of the patients without hematological diseases to colony forming in the culture of gel diffusion chambers *in vivo*

через пористу стінку камери та стимулює колонієутворення.

Отже, внаслідок проведених досліджень було виявлено, що дія іонізуючої радіації, а також дія цитостатиків сприяли вивільненню колонієстимулюючого фактора в організмі мишей-реципієнтів.

ВИСНОВКИ

У даній роботі нами було оцінено здатність гемопоетичних клітин-попередниць кісткового мозку осіб без гематологічних захворювань до утворення колоній і кластерів при культивуванні у напіврідкому агарі в гелевих дифузійних камерах, а також встановлено зв'язок із кількістю експлантованих клітин у відповідних межах, що свідчить про клональний характер росту клітинних агрегатів у культурі. Виявлено стимуляцію колонієутворення під дією іонізуючої радіації у зростаючих дозах на тварину-реципієнта камер, що свідчить опосередковано про синтез колонієстимулюючого фактора в організмі мишей і проникнення його у дифузійні камери з клітинами кісткового мозку людини.

Вивчено дію на організм мишей цитостатиків, які в експериментально підібраній дозі викликають стимуляцію колонієутворення в культурах клітин, як через 24 години, так і через 2 години після їх введення. Показано, що оброблення тварин за добу до експерименту введенням цитостатиків зіставне з дією іонізуючої радіації і може використовуватись для вивчення гемопоезу в системі «людина—миша».

them the colony-stimulating factor, which permeates porous chamber wall and stimulates colony forming.

Thus, as a result of investigations performed it was determined that the action of ionizing radiation, as well as the action of cytostatics contributed to the release of colony-stimulating factor in the organism of recipient mice.

CONCLUSIONS

In the current work, we have evaluated the ability of bone marrow hematopoietic progenitor cells of the individuals without hematological diseases to form colonies and clusters under the cultivation in semi-solid agar in gel diffusion chambers, and established the association with the number of explanted cells in the appropriate range, which indicates the clonal nature of the growth of cell aggregates in culture. We have revealed the stimulation of colony forming under the action of ionizing radiation in increasing doses on the animals-recipient of the chambers, indicating indirectly the synthesis of colony-stimulating factor in the mice organism and its permeation into the diffusion chambers with human bone marrow cells.

The effect of cytostatics on the mice organism was investigated, which in the experimentally selected dose cause stimulation of colony forming in cell cultures, both 24 hours and 2 hours after their introduction. It was shown that the treatment of animals the day prior to experiment with administration of cytostatics is comparable to the action of ionizing radiation and can be used to study hematopoiesis in «human—mouse» system.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

- Dexter T. M., Allen T., Lajtha L. Conditions controlling the proliferation of haemopoietic stem cells in vitro. *J. Cell Physiol.* 1977. Vol. 91, no. 3. P. 335–344. doi:10.1002/jcp.1040910303.
- Lord B. I. Myeloid cell kinetics in response to haemopoietic growth factors. *Baillieres Clin. Haematol.* 1992. Vol. 5, no. 3. P. 533–550. doi:10.1016/s0950-3536(11)80006-5.
- Білько Д. І., Чайковський Ю. Б. Роль жорсткості підложки для підтримки плюрипотентності ембріональних стовбурових клітин у культурі in vitro. *Фізіологічний журнал.* 2021. Т. 67, № 3. С. 27–34.
- Чайковський Ю. Б., Дельцова О. І., Геращенко С. Б. *Стовбурові клітини. Івано-Франківськ : Місто НВ, 2014. 497 с.*
- Sharma M. B., Limaye L. S., Kale V. P. 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. Vol. 97, no. 5. P. 651–660. doi:10.3324/haematol.2011.050500.
- Modeling the human bone marrow niche in mice: From host bone marrow engraftment to bioengineering approaches / A. Abarrategi, S. A. Mian, D. Passaro et al. *J. Exp. Med.* 2018. Vol. 215, no. 3. P. 729–743. doi:10.1084/jem.20172139.
- 3D Scaffolds to model the hematopoietic stem cell niche: applications and perspectives / A. Congrains, J. Bianco, R. G. Rosa et al. *Materials (Basel).* 2021. Vol. 14, no. 3. P. 569. doi: 10.3390/ma14030569.
- Long-term maintenance of hematopoiesis in irradiated mice by retrovirally transduced peripheral blood stem cells / N. Drize, J. Chertkov, E. Sadovnikova et al. *Blood.* 1997. Vol. 89, no. 5. P. 1811–1817.
- 3D co-culture of hematopoietic stem and progenitor cells and mesenchymal stem cells in collagen scaffolds as a model of the hematopoietic niche / I. Leisten, R. Kramann, M. S. Ventura Ferreira et al. *Biomaterials.* 2012. Vol. 33, no. 6. P. 1736–1747. doi:10.1016/j.biomaterials.2011.11.034.
- Pearson T., Greiner D. L., Shultz L. D. Creation of «humanized» mice to study human immunity. *Curr. Protoc. Immunol.* 2008 May. Chapter 15. Unit 15.21. doi: 10.1002/0471142735.im1521s81.
- Huey D. D., Niewiesk S. Production of humanized mice through stem cell transfer. *Curr Protoc. Mouse Biol.* 2018. Vol. 8, no. 1. P. 17–27. doi: 10.1002/cpmo.38.
- Niskanen E., Cline M. J. Growth of mouse and human bone marrow in diffusion chambers in mice. Development of myeloid and erythroid colonies and proliferation of myeloid stem cells in cyclophosphamide- and erythropoietin-treated mice. *Cell Tissue Kinet.* 1979. Vol. 12, no. 1. P. 59–70. doi:10.1111/j.1365-2184.
- Srouf E. F., Hoffman R., Zanjani E. D. Animal models for human hematopoiesis. *J. Hematotherapy.* 1992. Vol. 1, no. 2. P. 143–153. doi:10.1089/scd.1.1992.1.143.
- Білько Д. І. Спосіб довготривалого культивування гемопоетичних стовбурових клітин із використанням гелевих камер. Патент на корисну модель. *Промислова власність.* 2021; 13.

REFERENCES

- Dexter TM, Allen T, Lajtha L. Conditions controlling the proliferation of haemopoietic stem cells in vitro. *J Cell Physiol.* 1977; 91(3):335-44. doi:10.1002/jcp.1040910303.
- Lord BI. Myeloid cell kinetics in response to haemopoietic growth factors. *Baillieres Clin Haematol.* 1992 Jul; 5(3):533–550. doi:10.1016/s0950-3536(11)80006-5.
- Bilko DI, Chaikovsky YB. [The role of substrate stiffness in maintaining pluripotency of embryonic stem cells in vitro culture]. *Fiziologichniy Zhurnal.* 2021; 67(3):27-34. Ukrainian.
- Chaikovsky Y, Deltsova O, Gerashchenko S. [Stem Cells]. *Ivano-Frankivsk: Misto NV; 2014. 497 p.* Ukrainian.
- 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):651-660. doi:10.3324/haematol.2011.050500.
- Abarrategi A, Mian SA, Passaro D, Rouault-Pierre K, Grey W, Bonnet D. Modeling the human bone marrow niche in mice: From host bone marrow engraftment to bioengineering approaches. *The Journal of experimental medicine.* 2018 Mar; 215(3):729-743. doi:10.1084/jem.20172139.
- Congrains A, Bianco J, Rosa RG, Mancuso RI, Saad STO. 3D Scaffolds to model the hematopoietic stem cell niche: applications and perspectives. *Materials (Basel).* 2021 Jan 26; 14(3):569. doi: 10.3390/ma14030569.
- Drize N, Chertkov J, Sadovnikova E, Tiessen S, Zander A. Long-term maintenance of hematopoiesis in irradiated mice by retrovirally transduced peripheral blood stem cells. *Blood.* 1997 Mar 1; 89(5): 1811–1817.
- Leisten I, Kramann R, Ventura Ferreira MS, Bovi M, Neuss S, Ziegler P, et al. 3D co-culture of hematopoietic stem and progenitor cells and mesenchymal stem cells in collagen scaffolds as a model of the hematopoietic niche. *Biomaterials.* 2012 Feb; 33(6):1736-1747. doi:10.1016/j.biomaterials.2011.11.034.
- Pearson T, Greiner DL, Shultz LD. Creation of «humanized» mice to study human immunity. *Curr Protoc Immunol.* 2008 May; Chapter 15:Unit 15.21. doi: 10.1002/0471142735.im1521s81.
- Huey DD, Niewiesk S. Production of humanized mice through stem cell transfer. *Curr Protoc Mouse Biol.* 2018 Mar; 8(1):17-27. doi: 10.1002/cpmo.38.
- Niskanen E, Cline MJ. Growth of mouse and human bone marrow in diffusion chambers in mice. Development of myeloid and erythroid colonies and proliferation of myeloid stem cells in cyclophosphamide- and erythropoietin-treated mice. *Cell Tissue Kinet.* 1979 Jan; 12(1):59-70. doi:10.1111/j.1365-2184.
- Srouf EF, Hoffman R, Zanjani ED. Animal models for human hematopoiesis. *Journal of Hematotherapy.* 1992; 1(2):143-153. doi:10.1089/scd.1.1992.1.143.
- Bilko D. [Method of long-term cultivation of hematopoietic stem cells using gel chambers]. Patent for utility model. *Promyslova vlasnist.* 2021; 13. Ukrainian.

15. Борбуляк І. З., Родіонова Н. К., Магомедов С., Білко Н. М. Особливості кістково-мозкового кровотворення у тварин, опромінених ^{90}Sr , за його одноразового та тривалого надходження. *Проблеми радіаційної медицини та радіобіології*. 2010. Вип. 15. С. 317–322.
16. Руссу І. З., Родіонова Н. К., Білко Н. М. Зміни функціональної активності кісткомозкових клітин-попередників при внутрішньому опроміненні стронцієм-90. *Наукові праці ЧДУ ім. Петра Могили*. 2014. № 233(221). С. 92–95.
17. Joiner M. C., Cogel A. J. Basic Clinical Radiobiology. Boca Raton, FL : CRC Press/Taylor & Francis Group, 2019. 349 p.
15. Borbulyak IZ, Rodionova NK, Magomedov S, Bilko NM. [Bone marrow hematopoiesis of animals irradiated by internal ^{90}Sr at single and protracted intake]. *Problems of Radiation Medicine and Radiobiology*. 2010; 15:317-322. Ukrainian.
16. Russu IZ, Rodionova NK, Bilko NM. [Alterations in functional activity of bone marrow progenitor cells under internal irradiation with Strontium-90]. *Naukovi pratsi CDU im. Petra Mohyly*. 2014; 233(221):92-95. Ukrainian.
17. Joiner MC, Cogel AJ. Basic Clinical Radiobiology. Boca Raton, FL: CRC Press/Taylor & Francis Group; 2019. 349 p.

ІНФОРМАЦІЯ ПРО АВТОРІВ

Білько Денис Іванович, кандидат біологічних наук, доцент, доцент кафедри лабораторної діагностики біологічних систем Національного університету «Києво-Могилянська академія», м. Київ, ORCID: 0000-0001-6801-401X

Руссу Ірина Зіновіївна, кандидат біологічних наук, доцент, доцент кафедри лабораторної діагностики біологічних систем Національного університету «Києво-Могилянська академія», м. Київ, ORCID: 0000-0001-9676-2859

Бойко Роман Володимирович, доктор фізико-математичних наук, професор, провідний науковий співробітник Центру молекулярних і клітинних досліджень Національного університету «Києво-Могилянська академія», м. Київ, ORCID: 0000-0001-6021-5642

Білько Надія Михайлівна, доктор медичних наук, професор, завідувач кафедри лабораторної діагностики біологічних систем Національного університету «Києво-Могилянська академія», м. Київ, ORCID: 0000-0002-3213-0032

INFORMATION ABOUT AUTHORS

Denys I. Bilko, Candidate of Biological Sciences, Associate Professor, Associate Professor of the Department of Laboratory Diagnostics of Biological Systems, National University of Kyiv-Mohyla Academy, Kyiv, Ukraine, ORCID: 0000-0001-6801-401X

Iryna Z. Russu, Candidate of Biological Sciences, Associate Professor, Associate Professor of the Department of Laboratory Diagnostics of Biological Systems, National University of Kyiv-Mohyla Academy, Kyiv, Ukraine, ORCID: 0000-0001-9676-2859

Roman V. Boiko, Doctor of Physical and Mathematical Sciences, Professor, Leading Researcher of the Center for Molecular and Cellular Research, National University of Kyiv-Mohyla Academy, Kyiv, Ukraine, ORCID: 0000-0001-6021-5642

Nadiia M. Bilko, Doctor of Biological Sciences, Professor, Head of the Department of Laboratory Diagnostics of Biological Systems, National University of Kyiv-Mohyla Academy, Kyiv, Ukraine, ORCID: 0000-0002-3213-0032

Стаття надійшла до редакції 26.08.2021

Received: 26.08.2021