

**МЕТОДИКА ОДЕРЖАННЯ АГАРОВОГО СЕРЕДОВИЩА ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ ЗДАТНОСТІ КРІОКОНСЕРВОВАНИХ КЛІТИН ФЕТАЛЬНОЇ ПЕЧІНКИ ДО УТВОРЕННЯ ГРАНУЛОЦИТАРНО-МОНОЦИТАРНИХ КОЛОНІЙ В СИСТЕМІ «АГАРОВА КРАПЛЯ – РІДКЕ СЕРЕДОВИЩЕ»***НІКОЛЬСЬКА К. І.*

ДУ «Інститут генетичної та регенеративної медицині АМН України»,

Для вивчення властивостей гемопоетичних стовбурових клітин (ГСК) і прогеніторів *ex vivo* широко використовуються культури в напіврідкому середовищі [1]. Одним із найбільш чутливих і інформативних є метод дослідження здатності нормальних і кріоконсервованих ГСК і прогеніторів до формування гранулоцитарно-моноцитарних колоній в системі «агарова крапля – рідке середовище» [2]. Оскільки колонії походять із поодиноких ГСК і прогеніторів, їх кількість дорівнює числу колонієутворюючих одиниць (КУО-ГМ).

Однак рекомендовані ефективні методики в той же час мають певні недоліки, що утруднюють їх впровадження. Як один із них дослідники відмічають незручності в способах приготування агарового середовища. Так, відома методика одержання агарового середовища для визначення кількості КУО-ГМ включає змішування безпосередньо перед постановкою реакції 9 частин середовища McCoy's 5A і 1 частини розтопленого 3% розчину агару [3]. Недоліком такого способу є використання незручного в роботі концентрованого (3%) розчину агару.

Відома також методика одержання агарового середовища, що включає на першому етапі приготування із сухого середовища DMEM подвійного концентрату, на другому етапі - приготування середовища, що складається з 60% подвійного концентрату середовища DMEM та 40% ембріональної телячої сироватки (ЕТС), і безпосередньо перед постановкою реакції - змішування рівних об'ємів проміжного середовища та розтопленого 0,6 % розчину агару [4]. Недоліком такого способу є необхідність стерилізації приготовленого із сухого концентрату середовища, а також тривалий процес приготування середовища.

Між тим, у теперішній час зростає запит на тестування функціональної активності стовбурових клітин, особливо тих, які тривало зберігаються у кріобанках.

Це дослідження проведено з метою удосконалення методу одержання агарового середовища для визначення гранулоцитарно-моноцитарного колонієутворення кріоконсервованими клітинами фетальної печінки, що містять велику

кількість ГСК і прогеніторів і часто зберігаються до терміну практичного використання.

**МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ**

Гемопоетичні клітини фетальної печінки 6-7 тижня гестації отримували шляхом механічної дезінтеграції тканини із матеріалу, що одержували по інформованій згоді при плановому перериванні вагітності. Отримані клітини піддавали кріоконсервуванню за стандартним протоколом з використанням програмного заморозувача KRYO-516 (Planer, Англія) з 5 % ДМСО і зберігали до використання в рідкому азоті. Розморожування клітин проводили безпосередньо перед дослідженням на водяній бані при температурі 40°C до утворення рідкої фази, після чого процес завершували на повітрі при кімнатній температурі.

Визначення кількості КУО-ГМ проводили в системі «агарова крапля – рідке середовище» [2]. За стандартними методиками агарове середовище готували а двох варіантах:

За методикою Pike B., Robinson W. [3]: середовище McCoy's 5A (Sigma, США) – 800 мл; ETC (Sigma, США) – 150 мл; піруват Na, 110mM, (Sigma) – 10 мл; 7,5% розчин NaHCO<sub>3</sub> (ТОВ «Укрхімекспо», Україна) – 6 мл; MEM-вітаміни, 100 (Sigma, США) – 4 мл; MEM-амінокислоти, 50 (Sigma, США) – 8 мл; MEM-амінокислоти незамінні, 100 (Sigma, США) – 4 мл; L-глутамін, 200 mM (Sigma, США) – 4 мл. Безпосередньо перед постановкою реакції 9 частин такого середовища змішували з 1 частиною 3% агару, кінцева концентрація агару - 0,3%.

За методикою Metcalf D. [4]: Спочатку готували двукратне середовище DMEM: середовище DMEM (Sigma, США) – 10 г; бідистильована вода – 390 мл; L-аспарагін (Sigma, США) (6,7 мг/мл) – 3 мл; DEAE-декстран (Sigma, США) (50 мг/мл) – 1,5 мл; пеніцилін (105 ОД/мл) – 0,1 мл; стрептоміцин (100 мг/мл) – 0,1 мл. Середовище стерилізували через мембранний фільтр (0,22 мкм). Безпосередньо перед постановкою реакції 3 частини такого середовища змішували з 2 частинами ЕТС і 5 частинами 0,6% агару; кінцева концентрація агару - 0,3%.

В агарове середовище кожного із варіан-

тів додавали клітини фетальної печінки до кінцевої концентрації 105/мл. Суспензію клітин в 0,3% агаровому середовищі, забирали в шприц, голку шприца встановлювали на дно по центру чашки Петрі (35 мм) або 6-лункового планшету і обережно, не піднімаючи голку, наливали на дно чашки по 0,5 мл. При цьому агарове середовище набувало краплеподібної форми. Краплі мали практично однакову форму. Після утворення щільного гелю (5–15 хв) у чашку додавали 2,5 мл рідкого поживного середовища зі стимулюючими клітинами – лейкоцитами периферичної крові здорових людей в концентрації 1 106/мл. Інкубували при 37°C в атмосфері 5% CO<sub>2</sub> та абсолютної вологості. Аналіз культур проводили на 14-ту добу. Для цього агарову краплю переносили в порожню чашку, промивали розчином Хенкса та фіксували 1,0% розчином глютаральдегіду, після чого проводили підрахунок колоній.

#### РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

В основу розробленої методики поставили завдання створення та удосконалення способу одержання агарового середовища для визначення КУО-ГМ шляхом приготування подвійного середовища із 10-кратного концентрату з наступним додаванням безпосередньо перед постановкою реакції рівного об'єму розтопленого 0,6% розчину агару.

Приготування середовища здійснювали таким чином. Для напіврідкої агарової фази, у якій відбувається ріст колоній, із 10-кратного концентрату попередньо готували подвійний концентрат середовища наступного складу: середовище MEM, 10, (Sigma) – 8,50 мл; ETC – 15,03 мл; NaHCO<sub>3</sub>, 7,5 % – 0,60 мл; піруват Na, 110 мМ – 1,0 мл; MEM-вітаміни, 100 – 0,40 мл; MEM-амінокислоти, 50 – 0,80 мл; MEM-амінокислоти незамінні, 100 – 0,40 мл; L-глутамін, 200 мМ – 0,40 мл; HEPES Na-сіль, 1 М – 1,00 мл; H<sub>2</sub>O – 21,80 мл.

Розрахунки вмісту інгредієнтів проводилися, виходячи із складу культуральних середовищ, що запропоновані Pike L. and Robinson W.A. [3].

Безпосередньо перед постановкою реакції до подвійного концентрату середовища додавали рівний об'єм розтопленого при 39°C 0,6% розчину агару, ретельно перемішували та додавали клітини фетальної печінки до кінцевої концентрації 105/мл. На середину чашки Петрі (діаметром 35 мм) поміщали 0,5 мл суспензії клітин в агаровому середовищі, що при застиганні набувало форми краплі.

Для вивчення впливу різних способів приготування агарового середовища на здатність кріоконсервованих клітин фетальної печінки утворювати гранулоцитарно-моноцитарні колонії було використано в якості джерела гемопоетичних клітин 5 зразків кріоконсервованих суспензій клітин фетальної печінки, які досліджували, використовуючи всі 3 варіанти приготування напіврідкої фази.

Для рідкої фази, яка містила лейкоцити периферичної крові здорових людей, що продукують гранулоцитарний та гранулоцитарно-моноцитарний колонієстимулюючі фактори, готували середовище наступного складу: середовище MEM, 10 – 8,50мл; ETC – 15,03 мл; NaHCO<sub>3</sub>, 7,5 % – 0,60 мл; піруват Na, 110 мМ – 1,0 мл; MEM-вітаміни, 100 – 0,40 мл; MEM-амінокислоти, 50 – 0,80 мл; MEM-амінокислоти незамінні, 100 – 0,40 мл; L-глутамін, 200 мМ – 0,40 мл; HEPES Na-сіль, 1 М – 1,00 мл; H<sub>2</sub>O – 71,80 мл.

Безпосередньо перед постановкою в середовище рідкої фази додавали лейкоцити периферичної крові здорових людей в концентрації 1 106/мл і наливали 2,5 мл такої суспензії в чашку з краплею агарового середовища. Через 14 діб інкубації при 37°C і 5% CO<sub>2</sub> за допомогою інвертованого мікроскопа проводили підрахунок колоній, що утворилися і мали кілька структурних видів, характерних для гранулоцитарно-моноцитарних колоній (рисунок).

Результати порівняльних досліджень ефективності колонієутворення з використанням виготовленого різними методами агарового середовища, представлені в таблиці.

Таблиця

Кількість КУО-ГМ у суспензії клітин фетальної печінки

№ зразка	Кількість КУО-ГМ, /105		
	Середовище Pike L., Robinson W.A.	Середовище Metcalf D.	Використане середовище
1.	72	73	74
2.	69	68	76
3.	60	65	58
4.	98	89	106
5.	64	78	74
M±m	77,6±7,8	72,6±6,7	74,6±4,2

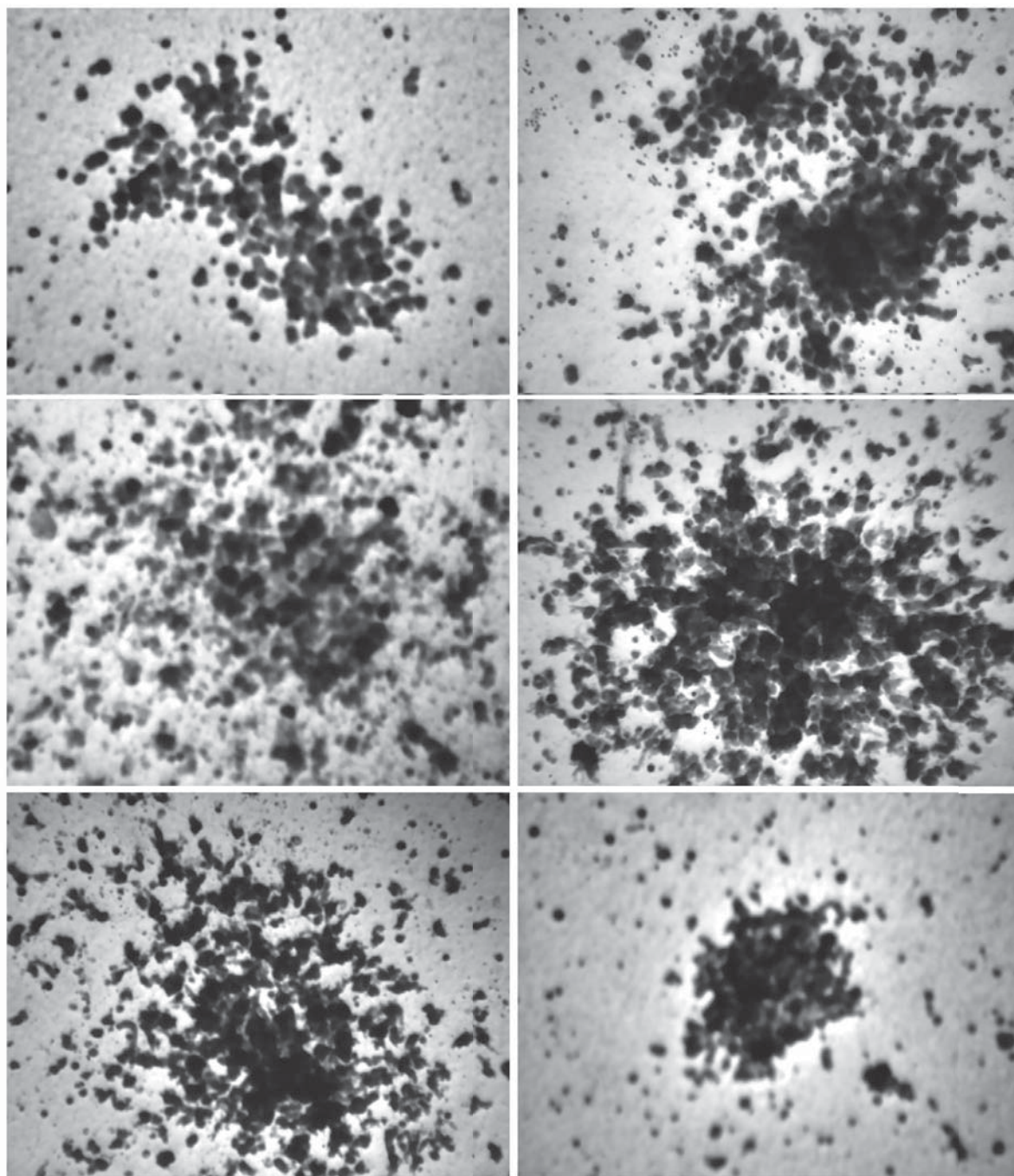


Рисунок . Різні види колоній КУО-ГМ із клітин фетальної печінки людини.  
Забарвлення азурII-еозином. Збільшення у 200 разів.

Як видно, ефективність колонієутворення кріоконсервованими ГСК і прогеніторами фетальної печінки людини в культурах, виготовлених з використанням запропонованої методики одержання агарового середовища, не нижче, ніж у культурах, виготовлених традиційними способами. Перевагою способу є технологія, що передбачає при збереженні ізотонічності розчину солей у кінцевому середовищі і застосуванні всіх необхідних добавок в оптимальній концентрації використання більш зручного в роботі розчину лише подвійної (0,6%) концентрації

агару, здійснення процесу одержання агарового середовища в 2 етапи без необхідності включення в процес підготовки стерилізації середовища.

Методика може бути впроваджена у клініко-імунологічних і гематологічних дослідженнях, а також у науково-дослідних лабораторіях при вивченні колонієутворюючої активності гемопоетичних клітин, їх функціональної активності і контролю впливу кріоконсервування на функціональну активність ГСК і прогеніторів [5].



**ВИСНОВКИ**

1. Кріоконсервовані ГСК і прогенітори фетальної печінки людини ефективно формують гранулоцитарно-моноцитарні колонії із застосуванням розробленого спрощеного підходу для вивчення культури клітин методом «агарова крапля – рідке середовище».
2. Колонії, що формуються кріоконсервованими ГСК і прогеніторами фетальної печінки, утворюються у вигляді кількох морфологічних типів, що відповідає відомим даним про активність нормальних не кріоконсервованих клітин.

**ЛІТЕРАТУРА**

1. Грищенко В.И. Колониеобразующая активность фибробластоподобных клеток-предшественников из эмбриональной печени человека в условиях in vitro / В.И.Грищенко, А.Ю.Петренко, Н.А.Волкова, Н.Г.Скоробогатова // Доповіді НАН України. – 2005. - № 2. – С.128–141.
2. Афанасьев Б.В. Клонирование кроветворных клеток человека в системе агаровая капля - жидкая среда / Б.В.Афанасьев, С.А.Тиранова, Т.Г.Кулибаба [и др.] // Терапевтический архив. - 1983. - № 8. - С. 114-121.
3. Pike B.L. Human bone marrow colony growth in agar-gel / B.L.Pike, W.A.Robinson // J Cell Physiol. – 1970. – Vol.76, № 1. – P.77-84.
4. Metcalf D. Clonal Culture of Hemopoietic Cell: Techniques and Applications / D.Metcalf. - Amsterdam, New York, Oxford, 1984.
5. Никольська К.І. Особливості культивування та контактної взаємодії in vitro кріоконсервованих мультипотентних стромальних клітин тимуса з гемопоетичними клітинами / К.І.Никольська // Проблеми кріобіології і кріомедицини. – 2018. – Т.28, № 1. – С.5-13.

**РЕЗЮМЕ**

**МЕТОДИКА ОДЕРЖАННЯ АГАРОВОГО СЕРЕДОВИЩА ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ ЗДАТНОСТІ КРІОКОНСЕРВОВАНИХ КЛІТИН ФЕТАЛЬНОЇ ПЕЧІНКИ ДО УТВОРЕННЯ ГРАНУЛОЦИТАРНО-МОНОЦИТАРНИХ КОЛОНІЙ В СИСТЕМІ «АГАРОВА КРАПЛЯ – РІДКЕ СЕРЕДОВИЩЕ»**

*Никольська К.І.*

ДУ «Інститут генетичної та регенеративної медицини АМН України», м. Київ

Проведені порівняльні дослідження методик одержання агарового середовища для визначення здатності кріоконсервованих гемопоетичних стовбурових клітин (ГСК) і прогеніторів фетальної печінки до утворення гранулоцитарно-моноцитарних колоній в системі «агарова крапля – рідке середовище»:

двох стандартних і власної розробки. Встановлено, що ефективність колонієутворення в культурах кріоконсервованих ГСК і прогеніторів фетальної печінки, виготовлених з використанням запропонованого способу одержання агарового середовища, не нижче, ніж у культурах, виготовлених традиційними способами. Перевагою способу є технологія, що передбачає при збереженні ізотонічності розчину солей у кінцевому середовищі і застосуванні всіх необхідних добавок в оптимальній концентрації використання більш зручного в роботі розчину лише подвійної (0,6%) концентрації агару, здійснення процесу одержання агарового середовища в 2 етапи без необхідності включення в процес підготовки стерилізації середовища. Здатність кріоконсервованих ГСК і прогеніторів фетальної печінки до утворення гранулоцитарно-моноцитарних колоній у вивчених умовах практично не порушується.

**Ключові слова:** кріоконсервування, гранулоцитарно-моноцитарне колонієутворення, гемопоетичні клітини, фетальна печінка.

**РЕЗЮМЕ**

**МЕТОДИКА ПОЛУЧЕНИЯ АГАРОВОЙ СРЕДЫ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ СПОСОБНОСТИ КРИОКОНСЕРВИРОВАННЫХ КЛЕТОК ФЕТАЛЬНОЙ ПЕЧЕНИ К ОБРАЗОВАНИЮ ГРАНУЛОЦИТАРНО-МОНОЦИТАРНЫХ КОЛОНИЙ В СИСТЕМЕ «АГАРОВОЙ КАПЛЯ - ЖИДКАЯ СРЕДА»**

*Никольская Е.И.*

ГУ «Институт генетической и регенеративной медицине АМН Украины», г. Киев

Проведены сравнительные исследования методики получения агаровой среды для определения способности кріоконсервированных гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) и прогениторов фетальной печени к образованию гранулоцитарно-моноцитарных колоний в системе «агаровой капля - жидкая среда»: два стандартных и собственной разработки. Установлено, что эффективность колониеобразования в культурах кріоконсервированных ГСК и прогениторов фетальной печени, приготовленных с использованием предлагаемого способа получения агаровой среды не ниже, чем в культурах, приготовленных традиционными способами. Преимуществом способа является технология, предусматривающая, при сохранении изотоничности раствора солей в конечной среде и внесении всех необходимых добавок в оптимальной концентрации, использование более удобного в работе раствора только двойной (0,6%) концентрации агара, проведение процесса получения агаровой среды в 2 этапа без необходимости включения стерилизации в процесс подготовки среды. Способность кріоконсервированных ГСК и прогениторов фетальной печени к образованию гранулоцитарно-моноцитарных колоний в изученных условиях практически не нарушается.

**Ключевые слова:** кріоконсервирование, гранулоцитарно-моноцитарное колониеобразование, гемопоэтические клетки, фетальная печень.

**SUMMARY**

**METHOD OF OBTAINING AN AGAR MEDIUM  
FOR THE DETERMINATION THE ABILITY OF  
CRYOCONSERVATED FETAL LIVER CELLS FOR THE  
GRANULOCYTE MONOCYTE COLONY FORMING  
UNITS IN THE SYSTEM «AGAR DROP - LIQUID  
MEDIUM»**

*Nikolska K.I.*

State Institute of Genetic and Regenerative Medicine National  
Academy of Medical Sciences of Ukraine, Kyiv

There were carried out comparative studies of methods for obtaining agar medium for the determination the ability of cryopreserved fetal liver hemopoietic stem cells (HSC) and progenitors to form granulocyte-monocyte colony in the "agar drop - liquid medium" system: two standard and own. It was found that the efficiency of colony formation in cultures cryopreserved fetal liver HSC and progenitors prepared using the proposed method of producing agar medium is not lower than in cultures prepared by traditional methods. Advantage of the method is the technology that provides, with the isotonicity of salts solution of in the final medium, and the use of all the necessary additives in the optimal concentration, the use of a more convenient solution only a double (0.6%) concentration of agar, the process of obtaining the agar medium in 2 steps without the need for inclusion in process of medium sterilization. The ability of cryopreserved fetal liver HSCs and progenitors to form granulocyte-monocyte colonies under the conditions studied is practically unaffected.

**Keywords:** cryopreservation, granulocyte-monocyte colony formation, hematopoietic cells, fetal liver.