

## Получение и характеристика клеток ранних этапов гемопоэза человека с применением методов культивирования *in vitro*

С. В. Васильовская, И. А. Вотякова, Л. Л. Лукаш<sup>1</sup>, Г. Х. Мацука<sup>1</sup>

Медицинский центр тканевой и клеточной терапии «Эмбриотек»  
Ул. Верхняя, 5, Киев, 01133, Украина

<sup>1</sup> Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины  
Ул. Академика Заболотного, 150, Киев, 03143, Украина

---

*В работе приведены количественные и качественные характеристики популяций гемопоэтических клеток 5–12 недель гестации и данные об их изменении после криоконсервирования. Получены результаты относительно содержания гранулоцитарных предшественников, которые в этот период эмбриогенеза практически не функционируют в организме эмбриона, однако включают рецепторы, способные отвечать на колониобразующие факторы и вступать в пролиферацию и дифференцировку при культивировании *in vitro*.*

---

**Введение.** К настоящему времени сложилось представление о том, что в основе гемопоэза как постоянно обновляющейся системы лежит единая полипотентная стволовая клетка крови, способная к длительному самоподдержанию [1, 2]. В процессе ее деления в определенных условиях микроокружения происходит дифференцировка и формирование клонов клеток, различающихся по цитоморфологическим, иммунофенотипическим и дифференцировочным признакам. Вначале образуются примитивные полипотентные, а затем коммитированные клетки-предшественники; последние дают начало морфологически распознаваемым родоначальным клеткам всех ростков кроветворения [3].

Кроветворение представляет собой сложный многостадийный процесс, завершающийся выходом в периферическую кровь зрелых форменных элементов: эритроцитов, лейкоцитов, тромбоцитов и лимфоцитов. В процессе эмбрионального развития млекопитающих происходит естественная смена локализации кроветворения, которое вначале осуществляется в желточном мешке, а затем последовательно перемещается в печень, селезенку и, наконец, в костный мозг [4]. Это осуществляется путем миграции и внедрения в новое микроокружение полипотентных стволовых клеток [5].

Известно, что печеночный гемопоэз является основным источником крови зародыша человека, начиная с конца 1-го месяца и вплоть до 5–6-месячного возраста [6]. В эмбриональной печени образуются все форменные элементы крови, но наиболее развит эритропоэз, что, вероятно, связано с обеспечением дыхательной функции растущего зародыша [7]. Так, в печени 10–12 недель гестации присутствует от 70 до 98 % эритроидных клеток. Первые дифференцированные клетки крови, макрофаги, обнаруживаются в эмбриональной печени на 4-й неделе развития зародыша. Их содержание существенно изменяется в процессе развития, а с 8-й по 10-ю неделю не превышает 1–3 % [8].

Относительно невелико содержание гранулоцитарных элементов: 8 % всей популяции гемопоэтических клеток эмбриональной печени 5–6 недель гестации. Совсем незначительную часть (1–4 %) составляют лимфоидные клетки [3].

Значительный вклад в понимание ранних этапов гемопоэза внесли исследования, проведенные на клетках млекопитающих *in vitro* [9]. При использовании различных модельных систем получены и частично охарактеризованы примитивные полипотентные клетки крови млекопитающих. В разных работах они получили следующие назва-

ния: колониеобразующие клетки с высоким пролиферативным потенциалом (КОК-ВПП), колониеобразующие единицы бластов (КОЕ-Бл) и клетки, инициирующие долговременные культуры костного мозга [10—11].

Клонирование в полутвердых агаровых средах позволяет дать количественную и качественную оценку гранулоцитарным элементам крови [12]. Как отмечено нами выше, в настоящее время общепризнано, что все популяции гемопоэтических клеток являются продуктом пролиферации и дифференцировки единой полипотентной стволовой кроветворной клетки [22]. Более четкие данные о том, что одна клетка может быть источником клеток всех ростков кроветворения, получены в результате анализа клеточных популяций, содержащих уникальный хромосомный маркер [23]. После введения метода селезеночных колоний получено более реальное доказательство того, что все гемопоэтические клетки могут произойти от одного полипотентного предшественника [14, 17]. Эксперименты на животных с использованием метода селезеночных колоний дали большое количество информации о полипотентных клетках — колониеобразующих единицах селезенки (КОЕс) в обычных и экстремальных ситуациях. Однако особенности исследований *in vivo* и отсутствие данных о начальных изменениях, происходящих во время развития селезеночного клона, ограничивают анализ факторов, способствующих пролиферации и дифференцировке КОЕс [22, 24]. Необходимость тотального облучения тела и неспособность человеческих клеток образовывать селезеночные колонии у грызунов исключают возможность исследования полипотентных клеток человека.

Все это явилось предпосылкой к созданию методов клонирования кроветворных клеток *in vitro*, позволивших изучить потомство отдельной колониеобразующей клетки и непосредственно выявить кроветворные клетки-предшественники различных классов, оценить их дифференцировочные и пролиферативные возможности. Принцип клонирования кроветворных клеток *in vitro* заключается в создании культуральной среды с полутвердой или вязкой консистенцией, препятствующей удалению клеток друг от друга при их делении. Наибольшее распространение получили методы клонирования *in vitro* в агаровой среде, метилцеллюлозе, в плазменном или фибриногеновом сгустке. Однако в метилцеллюлозе зачастую происходит слияние отдельных клонов и оседание их на дно культурального сосуда, что затрудняет точный подсчет количества клоногенных единиц. Особенно это касается клеток, образующих маленькие агрегаты (кластеры).

Исходя из этого для изучения содержания клеток — предшественников грануломоноцитопоэза (КОЕ-ГМ) мы использовали полутвердую агаровую среду. Подобные исследования имеют важное значение для понимания механизмов становления гемопоэза в эмбриональной печени, [22, 24, 25].

Целью данной работы было получение гемопоэтических клеток из эмбриональной печени человека и сравнение клеточного состава до и после низкотемпературного консервирования, а также оценка пролиферативного потенциала гранулоцитарных и макрофагальных предшественников нативной печени человека при культивировании *in vitro*. Это необходимый этап при разработке технологии получения клеток — предшественников гемопоэза *in vitro* с последующей перспективой их применения для исследовательских и медицинских задач.

**Материалы и методы.** Материалом для исследования служили нативные и криоконсервированные клеточные суспензии, приготовленные из печени эмбрионов 5—12 недель гестации. Это определяется доступностью abortивного клинического материала именно этих сроков для проведения исследований. В условиях с соблюдением правил асептики готовили клеточные суспензии, каждая из которых получена из целой печени. Выделенную печень промывали в двух сменах раствора Хенкса с гентамицином (50 ед/мл), затем в гомогенизаторе Поттера готовили клеточную суспензию с добавлением 1—2 мл раствора Хенкса. Полученную взвесь клеток пропускали через фильтр системы для переливания кровезаменителей (ПР-11-01). Непосредственно перед криоконсервированием к полученной суспензии добавляли равный объем криопротектора (ДМСО на растворе Хенкса в концентрации 1,4 м/л). Криоконсервирование осуществляли на программном замораживателе производства СКТБсОП ИПКиК НАН Украины (до —196 °С) в полиэтиленовых контейнерах объемом 1 мл по специально разработанной программе [13].

Клеточный состав до и после криоконсервирования изучали на мазках, фиксированных метанолом и окрашенных азур-эозином по Романовскому [14]. Количество ядросодержащих клеток в суспензии подсчитывали в камере Горяева после предварительного лизиса эритроцитов 3 %-м раствором уксусной кислоты с 1 %-м раствором генцианвиолета [14].

Для оценки функционального состояния гемопоэтических клеток в нашей работе использовали метод культивирования в двухслойной агаровой среде [15, 16]. В качестве источника колониестимулирующего фактора (КСФ) использовали фидер

Таблица 1  
Клеточный состав эмбриональной печени человека разных сроков развития до и после криоконсервирования

Тип клеток	Возраст эмбрионов, недели			
	5—6 (n=5)	7—8 (n=8)	9—10 (n=6)	11—12 (n=5)
Недифференцируемые бластные клетки	17,0±1,5	14,0±0,9	6,0±1,0*	6,0±0,6
	22,0±2,1	22,0±1,7*	9,0±0,8	7,0±0,4
Лимфоцитоподобные клетки	4,0±0,6	6,0±0,6	3,0±0,4*	2,0±0,2
	7,0±0,4*	10,0±0,4*	5,0±0,4*	4,0±0,8
Примитивные эритробласты	45,0±3,3	32,0±1,6*	29,0±3,9	30,0±1,7
	58,0±2,1*	40,0±2,2*	46,0±2,1*	42,0±7,1
Дефинитивные эритробласты	14,0±1,3	21,0±1,8*	57,0±1,8*	52,0±5,0
	11,0±2,1*	22,0±2,6	40,0±2,1*	43,0±9,2
Моноциты	7,0±0,6	7,0±1,4	2,0±0,5*	2,0±0,4
	4,0±1,3	4,0±0,8	1,0±0,8	0,7±0,4
Макрофаги	13,0±0,7	16,0±0,7	3,0±0,7*	6,0±1,7
	4,0±0,4*	3,0±1,0*	0,7±0,4	2,0±1,7
Мегакариоциты	0,2±0,04	0,8±0,2	0,5±0,2	0,8±0,4
	0	0	0,3±0,03	0
Лимфоциты	0	0	0	1,2±0,4
	0	0	0	1,3±0,8
Миелобласты	0	3,0±0,6	0,2±0,01*	0,6±0,2
	0	0,1±0,8*	0,3±0,04	0
Гранулоциты	0,2±0,04	1,0±0,1	0,7±0,2	1,2±0,4
	0	0	0,3±0,04	0

Примечание. В числителе — процентное содержание нативных клеток; в знаменателе — после замораживания—оттаивания. Различия статистически достоверны ( $p < 0,05$ ) (\*в числителе — относительно предыдущей возрастной группы; \*в знаменателе — относительно значения до криоконсервирования в данной группе); n — количество исследуемых клеточных суспензий.

из лейкоцитов периферической крови здоровых доноров. Культивирование проводили на модифицированной среде RPMI-1640 («Serva», ФРГ), содержащей 1,25 мМ раствор пирувата натрия, 0,005 %-е витамины MEM, 2 мМ L-глутамин, 0,005 %-е незаменимые аминокислоты MEM, 0,02 %-е заменимые аминокислоты, 15 %-я эмбриональная телячья сыворотка, 25 мМ Нерес-буфер. Для приготовления фидера и верхнего слоя использовали растворы бактоагара («Difco», США) на тридистиллированной воде (5 и 3,3 % соответственно). Все применяемые в работе компоненты производства фирмы «Serva». Плотность посева исследуемых клеток в агаровой среде составила  $(1,0—2,0) \cdot 10^5$  на чашку диаметром 3,5—4,0 см. Снятие культуры и ее исследование проводили на 9-е сут культивирования. Подсчет числа клеток — предшественников грануломоноцитопоза производили на постоянных препаратах, приготовленных по методу [17] в модификации [18].

Эффективность клонирования оценивали по количеству колоний и кластеров на  $1 \cdot 10^5$  эксплан-

тированных в агар клеток. Для культивирования использовали только нативные гемопоэтические клетки эмбрионов 5—12 недель развития.

Результаты и обсуждение. Морфологические исследования нативных и криоконсервированных клеточных суспензий в различные сроки внутриутробного развития эмбриона показали большое разнообразие клеток: от недифференцируемых бластов и лимфоцитоподобных клеток до зрелых макрофагов и нейтрофилов. Количественный состав клеточных популяций до и после криоконсервирования представлен в табл. 1.

Для удобства анализа нами выделены четыре возрастные группы. Показано большое разнообразие клеток в исследуемых суспензиях. Но наиболее развит эритропоэз, что, вероятно, связано с необходимостью обеспечения дыхательной функции растущего эмбриона. В образцах печени 5—6 недель отмечается большое количество примитивных эритробластов — 45 % (рис. 1). В ранней печени эритропоэз происходит эритропоэтиннезависимо по мегалобластическому типу. По сравнению с дефи-

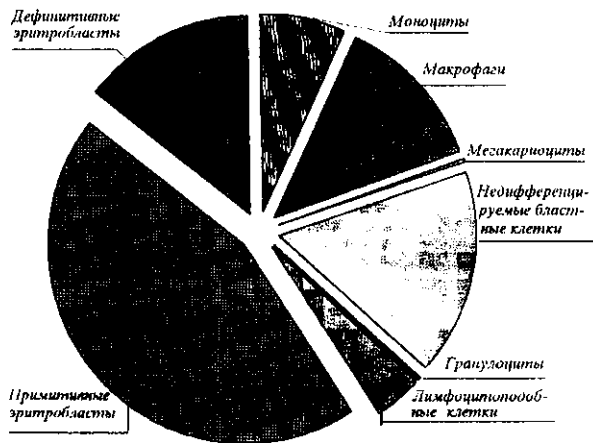


Рис. 1. Процентное содержание клеток разного типа в эмбриональной печени человека 5—6 недель развития до криоконсервирования

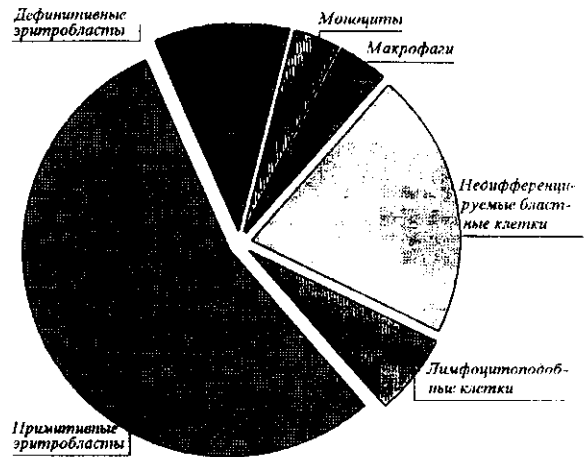


Рис. 2. Процентное содержание клеток разного типа в эмбриональной печени человека 5—6 недель развития после криоконсервирования

нитивными, примитивные эритробласты крупнее по размеру, содержат ядра и синтезируют fetal hemoglobin. После 7—8 недель генерация клеток примитивного эритропоэза заменяется клетками дефинитивного эритропоэза, т. е. происходит переключение с мегало- на нормобластический тип кроветворения. Об этом свидетельствует увеличение количества дефинитивных эритробластов.

В мазках печени ранних сроков развития обнаружено  $17,0 \pm 1,5$  % недифференцируемых бластных клеток. Снижение их количества отмечается на 9—10-й неделе.

Лимфоцитоподобные клетки составляют 4—6 % в первых возрастных группах. С увеличением возраста их количество снижается. Около 20 % всей клеточной популяции печени 5—6-недельного возраста составляют моноциты и макрофаги (рис. 1). На 7—8-й неделе их количество сохранялось, а к 9—10-й неделе происходило снижение, поддерживаемое далее на неизменном уровне. В мазках клеточных суспензий всех возрастных групп встречаются единичные мегакариоциты, миелобласты и гранулоциты. Лимфоциты появляются на 11—12-й неделе развития и составляют 1,2—2,0 %.

Криоконсервирование не оказывало существенного влияния на соотношение клеточных элементов эритро-, моно- и миелопоэза. Однако процедура замораживания—оттаивания приводила к перераспределению клеточных элементов в суспензиях, а именно — к увеличению количества недифференцируемых бластных и лимфоцитоподобных клеток и снижению числа макрофагов (рис. 2). По-видимому, зрелые элементы более чувствительны к процедуре замораживания—оттаивания, что обеспечивало селекцию бластных клеток и уменьшение

процентного содержания клеток, находящихся на более поздних стадиях дифференцировки. Изменений в количестве моноцитов не замечено. Различным образом реагировали на замораживание—оттаивание клетки мегалобластического и нормобластического эритропоэза: содержание дефинитивных эритроидных клеток в основном снижалось, а примитивных — увеличивалось.

Несмотря на то, что в эмбриональной печени исследуемых нами возрастных групп содержится малое количество зрелых гранулоцитов, колониеобразующая способность популяций клеток — предшественников грануломоноцитопоэза составляет от  $63,6 \pm 7,8$  до  $125,6 \pm 15,9$  в разных возрастных группах (табл. 2), что согласуется с данными других авторов [19]. Вероятно, они находятся в популяциях бластных и лимфоцитоподобных клеток. Многие авторы объясняют это явление пониженной потребностью в дифференцировке клеток этого типа на ранних стадиях развития эмбриона в свободном от микробов окружении организма матери. Другие авторы считают, что низкая активность гранулопоэза может быть связана с отсутствием специфического микроокружения и/или с наличием в печени ингибиторов гемопоэза [6, 12]. В частности, известно, что клетки эмбриональной печени могут вырабатывать фактор, задерживающий колониеобразование у мышей *in vivo* и *in vitro* [4]. В работах [4, 20] авторы пытались объяснить почти полное отсутствие гранулопоэза *in vivo* существенными различиями в регулировании миелопоэза со стороны стромы кроветворного органа зародыша и костного мозга взрослого человека. Они также предполагают, что отсутствие гранулопоэза в эмбриональной печени не связано с дефектом диффе-

Таблица 2

Количество ядросодержащих клеток и содержание клеток — предшественников грануломоноцитопоза (КОЕ-ГМ) в эмбриональной печени человека в разные сроки эмбрионального развития

Тип клеток	Возраст эмбрионов, недели			
	5—6 (n = 7)	7—8 (n = 6)	9—10 (n = 10)	11—12 (n = 7)
	Группа 1	Группа 2	Группа 3	Группа 4
Ядросодержащие, $10^6$	26,5±3,1	71,4±3,1 <sup>*1,2</sup>	150,4±8,9 <sup>*2,3</sup>	319,5±33,4 <sup>*3,4</sup>
КОЕ-ГМ, $10^5$	63,6±7,8	77,2±9,9	78,6±10,4	125,6±15,9 <sup>*1,4</sup>

Примечание. \*<sup>1,2</sup>; \*<sup>2,3</sup>; \*<sup>3,4</sup>; \*<sup>1,4</sup> Различия статистически достоверны между соответствующими исследуемыми группами; n — количество исследуемых суспензий каждой возрастной группы.

ренцировки, и рассматривают этот процесс как проявление действия регуляторных механизмов [12, 21].

Из всего изложенного можно сделать вывод о том, что причинами отсутствия выраженного грануломоноцитопоза могут быть: с одной стороны, отсутствие потребности в развитии данной клеточной популяции, а, с другой, — отсутствие необходимого микроокружения для регуляции и запуска стволовой клетки в дифференцировку по данному направлению.

Как видно из представленных в табл. 2 данных, количество ядросодержащих клеток в образцах печени 5—6 недель гестации составило  $(26,5 \pm 3,1) \cdot 10^6$ . В дальнейшем, на 7—8-й неделе, отмечено увеличение в 2,5 раза (до  $71,4 \pm 3,1 \cdot 10^6$ ) ( $p < 0,05$ ) ядерных элементов. Суспензии печени 9—10 недель содержали в 2 раза больше ядросодержащих клеток ( $150,4 \pm 8,9$ ) ( $p < 0,05$ ) по сравнению с предыдущей возрастной группой. Максимальное их количество отмечено на 11—12-й неделе, что примерно в 10 раз выше, чем в образцах печени 5—6 недель гестации и в 2 раза выше, чем в суспензиях, полученных из печени 9—10-недельных эмбрионов.

При эксплантации в агар  $1 \cdot 10^5$  ядросодержащих клеток суммарное количество клеточных клонов, выросших в культуре на 9-е сут культивирования, в первых трех возрастных группах существенно не различалось и составило  $63,6 \pm 7,8$  на 5—6-й неделе,  $77,2 \pm 9,9$  на 7—8-й и  $78,6 \pm 10,4$  на 9—10-й неделе эмбрионального развития. Максимальное количество КОЕ-ГМ на  $10^5$  ядросодержащих клеток отмечено на 11—12-й неделе развития ( $125,6 \pm 15,9$ ), что в 2 раза выше, чем в образцах печени 5—6 недель гестации. Гранулоцитарно-моноцитарную направленность дифференцировки клеток в культуре подтверждали с использованием цитохимической реакции для выявления активности пероксидазы [26].

Таким образом, нами установлено, что по мере увеличения возраста эмбриона от 5 до 12 недель развития значительно повышается как общее количество ядросодержащих клеток, так и содержание КОЕ-ГМ на  $10^5$  эксплантационных в агар клеток.

По данным других авторов, исследовавших зависимость частоты КОЕ-ГМ от возраста эмбриона 6—12 недель, существенных различий в количестве клеток — предшественников грануломоноцитопоза не выявлено, хотя эффективность клонирования была аналогична нашей [6, 12, 26]. Наличие пика в содержании КОЕ-ГМ на 8—9-й неделе, отмеченное в работе [27], в наших исследованиях не подтвердилось, но увеличение КОЕ-ГМ в печени 11—12 недель развития статистически достоверно. Возможно, эти различия в полученных результатах, отмеченные в указанных работах, объясняются особенностями методических подходов и/или использованием разных источников колониестимулирующего фактора (КСФ) и разной их активностью. Несмотря на то, что эмбриональный грануломоноцитопоз не обнаруживается, относительное количество клеток — предшественников белого ростка кроветворения достаточно велико. Отсутствие раннего грануломоноцитопоза может быть связано либо с дефицитом эмбрионального КСФ, либо с присутствием ингибиторов, выделяемых тканями эмбриона.

Таким образом можно сделать следующие выводы. Популяция гемопоэтических клеток, выделенных из эмбриональной печени 5—12-недельных эмбрионов, представлена клетками всех ростков кроветворения, находящихся на разных стадиях дифференцировки с большим количеством недифференцируемых бластных и лимфоцитоподобных клеток. Клеточный состав популяции гемопоэтических клеток после криоконсервирования незначительно изменяется за счет снижения количества клеток моноцитарно-макрофагального ростка и увеличения недифференцируемых бластных и лим-

фоцитоподобных клеток. Клетки — предшественники грануломоноцитопоэза содержатся в печени эмбрионов 5—12 недель развития и способны отвечать на КСФ, образуя при культивировании клоны *in vitro*.

S. V. Vasylovska, I. A. Votyakova, L. L. Lukash, G. H. Matsuka

Obtaining and characteristics of human cells at early haemopoiesis stages when cultured *in vitro*

#### Summary

Data on quantitative and qualitative characteristics of haemopoietic cell populations of 5—12 weeks of gestation have been presented, as well as their changes after cryopreservation. The results obtained concern the content of granulocytic progenitors, which practically do not function in the developing organism in this period of embryogenesis, however they contain receptors responding to colony-forming factors and coming into proliferation and differentiation when cultured *in vitro*.

С. В. Василовська, І. А. Вотякова, Л. Л. Лукаш, Г. Х. Мацука

Отримання та характеристика клітин ранніх етапів гемопоєзу людини із застосуванням методів культивування *in vitro*.

#### Резюме

В роботі наведено кількісну та якісну характеристики популяцій гемопоетичних клітин 5—12 тижнів гестації та дані стосовно їхніх змін після криоконсервування. Отримано результати щодо вмісту гранулоцитарних попередників, які в цей період ембріогенезу практично не функціонують в організмі ембріона, однак містять рецептори, здатні відповісти на колонісутворюючі фактори і вступати в проліферацію та диференціювання при культивуванні *in vitro*.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Amit M., Carpenter M. K., Inokuma M. S., Chiu C. P., Harris C. P., Waknitz M. A., Itskovitz-Eldor J., Thomson J. A. Clonally derived human embryonic stem cell lines maintain pluripotency and proliferative potential for prolonged periods of culture // *Develop. Biol.*—2000.—P. 227.
2. Чертков И. Л., Фриденштейн А. Я. Клеточные основы кроветворения.—М.: Медицина, 1977.—С. 272.
3. Kelemen E., Calvo V., Hiedner T. M. Atlas of human hemopoietic development.—New York: Springer, 1979.—P. 226.
4. Moore M. A. S., Metcalf D. Ontogeny of the hemopoietic system: yolk sac origin of *in vitro* and *in vivo* colony forming cells in the developing mouse embryo // *Brit. J. Hematol.*—1970.—18, N 3.—P. 278—296.
5. Hole N. Embryonic stem cell-derived haematopoiesis // *Cells Tissues Organs.*—1999.—165.—P. 181—189.
6. Герасимова Л. П. Кроветворная функция печени в онтогенезе человека // *Пробл. гематологии.*—1984.—29, № 11.—С. 46—50.
7. Sharma S., Bhargava M., Kochupillai V. Morphological pattern of hemapoiesis in human fetal liver // *Fetal Liver Transplantation.*—New York: Alan R. Liss. Inc., 1985.—P. 167—171.
8. Kelemen E., Janossa M. Macrophages are the first differentiated blood cells formed in human embryonic liver // *Exp. Hematol.*—1980.—6, N 7.—P. 996—1000.
9. Fridani S., Mazza U., Massaro P., La Targia M. L., Maiolo A. T., Morsa A. Cytokine effect on *ex vivo* expansion of haemopoietic stem cells from different human sources // *Biotherapy.*—1998.—10.—P. 295—298.
10. Bertonecello I. Status of high proliferative potential colony-forming cells in the hematopoietic stem cell hierarchy // *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*—1992.—177.—P. 83—94.
11. Глузман Д. Ф., Абраменко И. В., Склярченко Л. М., Надгорная В. А. Стволовые клетки и клетки-предшественники миелопоэза // *Лаб. диагностика онкогематол. заболеваний.*—Киев: МОРИОН, 1998.—С. 25—41.
12. Barak Y., Karov Y., Levin S., Soroker N., Barash A., Lancet M., Nir E. Granulocyte—macrophage colonies in culture of human fetal liver cells: morphologic and ultrastructural analysis of proliferation and differentiation // *Exp. Hematol.*—1980.—8, N 7.—P. 837—847.
13. Грициченко В. И., Лобынцева Г. С., Вотякова И. А., Шерешков С. И. Гемопоэтические клетки эмбриональной печени (эмбриогенез, трансплантация и криоконсервирование).—Киев: Наук. думка, 1988.—192 с.
14. Справочник по клиническим и лабораторным методам исследования /Под ред. Е. А. Кост.—М.: Медицина, 1975.—383 с.
15. Pike B. L., Robinson W. A. Human bone marrow colony growth in agar-gel // *J. Cell. Physiol.*—1970.—76.—P. 77—84.
16. Pluznik B. L., Sachs L. The cloning of normal mast cells in the tissue culture // *J. Cell. Comp. Physiol.*—1965.—66, N 3.—P. 319—324.
17. Salmon S. E., Buick R. N. Preparation of permanent slides of intact salt-agar colony cultures of hemopoietic and tumor stem cells // *Cancer Res.*—1979.—39.—P. 1133—1136.
18. Френкель М. А., Харламова Л. А., Шерешков С. И. Морфологическая характеристика колоний в агаровых культурах гемопоэтических клеток при хроническом миелолейкозе // *Терапевт. архив.*—1982.—4, № 18.—С. 116—119.
19. Раков А. А., Блинова Т. С., Бубнов А. Н. Коммитированные гранулоцитарные предшественники в эмбриональных органах человека // *Цитология*, 1981.—23, № 4.—С. 427—431.
20. Lucarelli G., Howard D., Stohlman F. Regulation of erythropoiesis. XV. Neonatal erythropoiesis and the effects of nephrectomy // *J. Clin. Invest.*—1964.—43.—P. 2195—2203.
21. Calvo V., Carbonel F. The development of liver granulopoiesis in the human fetus // *Fetal Liver Transplantation.*—Amsterdam, Oxford, Princeton: Excerpta Medica, 1980.—P. 14—19.
22. Чертков И. Л., Фриденштейн А. Я. Клеточные основы кроветворения.—М.: Медицина, 1977.—272 с.
23. Глузман Д. Ф. Диагностическая цитохимия гемобластозов.—Киев: Наук. думка, 1998.—215 с.
24. Metcalf D. Regulation of granulocyte and monocyte-macrophage proliferation by colony stimulating factor // *Exp. Hematol.*—1974.—2, N 4.—P. 167—173.
25. Messner H. A., Fauser A. A., Lepine J. Properties of human pluripotent hemopoietic progenitors // *Blood Cells.*—1980.—6, N 2.—P. 595—607.
26. Герасимова Л. П. Колониеобразующая способность различных кроветворных и лимфоидных органов в процессе эмбрио- и фетогенеза человека // *Пробл. гематологии.*—1980.—25, № 5.—С. 45—48.
27. Раков А. А., Блинова Т. С., Бубнов А. Н. Коммитированные гранулоцитарные предшественники в эмбриональных органах человека // *Цитология*, 1981.—23, № 4.—С. 427—431.

УДК 576.5

Надійшла до редакції 03.12.01