

## ОЦІНКА ФУНКЦІОНАЛЬНОЇ АКТИВНОСТІ КРОВОТВОРНИХ КЛІТИН ПРИ АУТОТРАНСПЛАНТАЦІЇ СТОВБУРОВИХ КЛІТИН ПЕРИФЕРИЧНОЇ КРОВІ

*Стаття присвячена проблемі підбору оптимальних умов для визначення проліферативної функції кровотворних клітин-попередників поза організмом у штучних умовах культурального середовища in vitro. Проводиться також порівняльний аналіз кількісного вмісту мононуклеарів, CD34<sup>+</sup>-клітин і клітин-попередників у трансплантаті та визначається ефективність клонування клітин-попередників у деконсервованому кістковому мозку в порівнянні з нативним.*

Останніми роками відмічається зростання захворюваності на онкогематологічну патологію, що зумовлює необхідність впровадження нових методів терапії, в тому числі трансплантації стовбурових гемопоетичних клітин (СГК). Першим в Україні закладом із сучасним спеціальним обладнанням і фахівцями, підготовленими для роботи згідно зі світовими методологічними вимогами, є Київський центр трансплантації кісткового мозку, відкритий на базі Наукового центру радіаційної медицини АМІІ України у квітні 2000 р. Центр здійснює аутологічні трансплантації стовбурових клітин периферичної крові (СГКПК) при різних захворюваннях системи крові. Вже розроблено принципи підготовки дорослих і дітей з хворобами кровотворних органів до трансплантації, обґрунтовано ведення хворих у передтрансплантаційному періоді, методи профілактики і лікування посттрансплантаційних

ускладнень, а також започатковано систему імунгенетичного моніторингу донорів-реципієнтів для алогенної та аутологічної трансплантації СГК. Впроваджено в практику протоколи лікування хворих на онкогематологічну патологію із застосуванням високкодозової консолідації та послідовною підтримкою аутологічними СГК. При цьому надзвичайно важливим для відновлення гемопоезу є оцінка функціональної активності клітин, здатних відновлювати кровотворення у цих пацієнтів, тобто визначення кількості стовбурових клітин, отриманих завдяки їх мобілізації з кісткового мозку в периферичну кров, і їх повноцінності після деконсервування.

Вивчення функціональної активності гемопоетичних стовбурових клітин розпочалося у першій половині семидесятих років і пов'язане з розвитком Till і McCulloch методу, який дозволив з формування колоній в селезінці летально

опромінених мишей (KVOc) судити про стан морфологічно не ідентифікованих відділів кровотворної системи [1]. Проведені дослідження були використані для розробки моделі гемопоезу, в основі якої лежить уявлення про те, що джерелом кровотворних клітин є стовбутова клітина, здатна до самопідтримки і продукування комітованих клітин-попередників.

У регуляції проліферації і диференціювання кровотворних клітин бере участь складна сітка цитокінів, що виробляються як самими клітинами, так і клітинами строми та позаклітинного матриксу й впливають на СГК і різні класи кровотворних клітин-попередників. На даний момент клоновано і отримано в очищеній рекомбінантній формі майже всі цитокіни, які стимулюють продукування і функціональну активність гемопоетичних клітин [2]. Одні й ті самі цитокіни необхідні для проліферації, диференціювання і функціональної активності клітин крові та імунної системи різних рівнів дозрівання і напрямків диференціації, в той же час для повноцінної життєдіяльності кожної клітинної генерації необхідна взаємодія різноманітних цитокінів, що діють на клітини крові різних рівнів дозрівання і напрямків клітинного диференціювання.

Щоб збільшити кількість клітин, які вводяться хворому, і підвищити вірогідність успішного проведення трансплантації, сьогодні використовують стовбурові клітини периферичної крові. Досліди показали, що в периферичній крові є клітини, які мають значний проліферативний потенціал і здатні відновлювати кровотворення [2]. Збільшення їх кількості досягається введенням пацієнту цитотоксичних речовин, таких як циклофосфамід, або деяких ростових факторів, таких як гранулоцитарний колоніестимулюючий фактор (Г-КСФ) або гранулоцитарно-макрофальний колоніестимулюючий фактор (ГМ-КСФ) [3].

У периферичній крові постійно циркулює певна кількість кровотворних клітин. Вважається, що у фазі відновлення при проведенні хімотерапії ці клітини залишають свої ніші кісткового мозку і виходять у кровоток. Велику кількість СКПК можна зібрати при проведенні лейкокаферезу. Потім їх можна заморожувати, і після цієї процедури вони не втрачають своїх властивостей. СКПК відмінні за своїми властивостями від кровотворних клітин кісткового мозку, але здатність СКПК відновлювати гемопоез доведена при проведенні культуральних досліджень *in vitro* та *in vivo* [4].

Примітивні гемопоетичні клітини можна відрізнити з-поміж більш зрілих за допомогою певних клітинних молекул на їх поверхні. До антигенів, експресованих на СКК, належать CD34, CD90, CD117, CDw123, CD164, CD166, HLA-DR [5]. Відомо, що на гемопоетичних клітинах знаходиться поверхневий глікофосфопротеїн - CD34, який є надзвичайно зручним для використання його як маркера СКК. Вважають, що рівень його експресії є максимальним на клітинній поверхні найбільш ранніх гемопоетичних клітин. Із розвитком клітин його рівень знижується до невизначених показників.

Серед кріопротекторів для роботи з ПК широко використовується диметилсульфоксид (ДМСО) в кінцевій концентрації 10 %. Він легко проникає в клітину, уповільнюючи при цьому процес кристалоутворення і підвищуючи здатність розчинів до переохолодження завдяки попередженню виникнення на мембрані шкідливих градієнтів концентрацій розчинів. При заморожуванні з ДМСО в кінцевій концентрації 10 % відбувається кристалізація, близька за своєю природою до аморфної. Але даній концентрації притаманна цитотоксична дія навіть при десятихвилинній експозиції, а за температури понад 4 °C токсичність проявляється вже при найменших концентраціях (близько 1 %) [6].

При оцінці якості транспланта та моніторингу процесінгу та кріоконсервування дуже важливою є оцінка життєздатності плюрипотентних стовбурових клітин і їх здатності диференціюватися в комітовані клітини-попередники, а потім і у зрілі клітини крові.

Потенційно цінним методом оцінки стовбурових клітин *in vitro* є культуральний метод. Більшість трансплантаційних центрів використовує таку методику для оцінки життєздатності і відновлювального потенціалу стовбурових клітин. Комітовані клітини-попередники можуть бути виявлені в культурі завдяки їх здатності утворювати колонії, які складаються з дозрілих клітин і клітин крові, що дозрівають, які ростуть, якщо для цього створено відповідні умови.

До цього часу ще не розроблено надійного методу оцінки кількості стовбурових клітин у трансплантації, які, власне, і відповідають за відновлення гемопоезу. Метод культивування кровотворних клітин-попередників дає змогу провести кількісну оцінку наявності в трансплантації більш чи менш диференційованих клітин, здатних утворювати колонії (ІСУО). Ефективність колонієутворення (ЕКУ) залежить від багатьох чинників: типу колоніестимулюючого фактора,

що використовується, середовища, сироватки, умов культивування тощо. Розробка умов, необхідних для оцінки функціональної активності стовбурових клітин у культурі та визначення типу клітин-попередників, здатних відновити гемопоез, залишається однією з найбільш важливих проблем у трансплантології.

Мобілізація стовбурових клітин з кісткового мозку у периферичну кров пацієнтів проводилася за допомогою п'ятикратного введення їм рекомбінантного гранулоцитарного фактора людини Нейпоген (Roche, Швейцарія) по 300 мкг щоденно протягом п'яти діб до початку забору клітин. СКК отримували на приладі «Cobe Spectra».

Перед заморожуванням сепаровані клітини центрифугували при 1200 об./хв протягом 10 хв. За допомогою ручного плазмоекстрактора з мішка максимально видаляли плазму і залишали клітини об'ємом 40,0-60,0 мл (при цьому клітини концентруються приблизно в 10 разів). У ролі кріопротектора використовували ДМСО як найефективніший при заморожуванні клітин. Однак ДМСО незалежно від концентрації при температурі понад 4 °С виявляє токсичний ефект, тому всі маніпуляції до заморожування проводились при зниженій температурі (0 °С) з використанням льоду. До об'єму виділених клітин додавали рівні об'єми плазми і ДМСО, кінцева концентрація якого становила 7,5-8 %.

Після цього матеріал заморожували у рідкому азоті. Паралельно із основними пакетами з клітинним матеріалом заморожували і так звані сателіти - пробірки об'ємом 1,8 мл, в яких містились клітини, що використовували у подальших дослідженнях.

Сателіти розморожували у день експерименту у водяній бані з температурою 40 °С протягом 1 хв. Потім клітини відмивали від ДМСО, який шкідливо на них впливає. Кількість клітин підраховували в камері Горяєва з 3 %-м розчином оцтової кислоти.

Далі розводили клітини різним об'ємом повного поживного середовища з метою отримання суспензії клітин із зростаючою концентрацією (від  $1 \times 10^3$  до  $1 \times 10^6$  мл).

Ростовий фактор Нейпоген з початковою концентрацією  $30 \times 10^6$  ОД/мл розводили, розчиняючи PBS (Phosphate buffer solution) із розрахунку концентрації фактора від  $3 \times 10^6$  до  $3 \times 10^2$  ОД/мл. При культивуванні використовували 5 концентрацій ростового фактора з метою виявлення оптимальної концентрації, при якій досягалась найбільша кількість колоній у планшеті.

Для приготування повного поживного середовища використовували поживне середовище RPMI Medium 1640 (Gibco BRL, Germany), L-глутамін (Sigma, USA), пеніцилін і стрептоміцин по 100 ОД/мл, фетальну телячу сироватку (Gibco BRL, Germany), агар фірми Difco (USA) у початковій концентрації 3,3 %. Для вибору оптимальних умов сироватку брали у концентрації 0 %, 10, 20, 30 % від поживного середовища. Для контролю дії кріоконсерванта використовували середовище 199 (Росія).

Постановка культур *in vitro* проводилася за методом Pike, Robinson в напіврідкому агаровому середовищі [4]. Розплавлений агар додавали до готового поживного середовища. Останніми вносили клітини у чотирьох різних концентраціях (густина посіву від  $1 \times 10^3$  до  $1 \times 10^6$  мл). Культивування проводили в умовах абсолютної вологості при 5 %-й концентрації  $\text{CO}_2$  і температурі 37 °С протягом 14 днів.

Результати підраховували на 14-й день культивування. Колонії-клони піддавали кількісному обліку під інвертованим мікроскопом.

Кількісний облік клонів супроводжувався перерахунком на 100 000 клітин. За результат приймали середнє арифметичне результатів клонування, отриманих у чотирьох лунках планшета. Після кількісного обліку окремі клони ізолювали і вносили у поживне середовище, яке складалося із 20 %-ної ембріональної телячої сироватки в однократному середовищі RPMI (з розрахунку одна колонія в 0,05 мл середовища), і на цитоцентрифузі готували препарати, які потім фіксували, забарвлювали за Паппенгеймом і аналізували під світловим мікроскопом. Частина препаратів фіксували за Май-Грюнвальдом протягом 3 хв і зафарбовували барвником Гімзи.

CD34<sup>+</sup>-клітин аналізували з використанням CD45 FITC (Clone 2D1) і CD34 PE (Clone 8g12) разом з відповідним контролем, міченим ізотопом, після лізування з використанням FACS.

У пробірку вносили 50 мкл аферезного продукту і додавали 10 мкл моноклональних антитіл. Після цього проводили інкубацію протягом 20 хв при кімнатній температурі. До матеріалу додавали 2 мл лізувального розчину і залишали па 10 хв для проходження лізису. Після цього доливали 1 мл забуференого фізрозчину і центрифугували протягом 5 хв при 1000 об./хв. Супернатант зливали. До залишку додавали 500 мкл фізіологічного розчину і підраховували кількість CD34<sup>+</sup>-клітин на проточному цитометрі Coulter XL.

Для статистичної обробки отриманих результатів використовували метод визначення середньої похибки ( $m$ ) від середньої арифметичної і коефіцієнта вірогідності ( $t$ ), запропонований Є. В. Монцевічуте-Ерингене [7].

З метою покращення умов культивування клітин-попередників з периферичної крові провели дослідження їх колонієутворюючої функції в культурі тканин з різними концентраціями компонентів поживного середовища. Вивчали ефективність колонієутворення в культурі *in vitro* при використанні різних доз ростового фактора (Г-КСФ), а також різних концентрацій ембріональної телячої сироватки.

Визначали ефективність клонування гранулоцитарних клітин-попередників у культурі тканини *in vitro*, використовуючи зростаючі концентрації ростового фактора, а саме:  $3 \times 10^3$ ,  $3 \times 10^4$ ,  $3 \times 10^5$  і  $3 \times 10^6$  ОД/мл. При концентраціях ростового фактора  $3 \times 10^3$  і  $3 \times 10^4$  ОД/мл росту колоній не спостерігалось. А при концентрації  $3 \times 10^5$  ОД/мл колонієутворююча активність варіювала від 2 до 80 одиниць на 100 000 експлантованих клітин. Ефективність клонування залежала від діагнозу і кількості курсів цитостатичної терапії, які проводили пацієнтам в останні 3-5 років перед процесінгом (процесом отримання клітин периферичної крові, збагачених стовбуровими клітинами). Підвищення дози ростового фактора не впливало на ефективність клонування. Так, при дозі фактора  $3 \times 10^6$  ОД/мл кількість колоній не збільшувалась порівняно з концентрацією фактора  $3 \times 10^5$  ОД/мл. Аналіз препаратів, приготовлених з культур, свідчив про те, що це були переважаючі культури, тобто такі культури, в яких процеси диференціювання переважали над процесами проліферації. Спостерігали переважаюче зростання дифузних колоній, у той час коли при концентрації фактора  $3 \times 10^5$  ОД/мл частка гранулоцитарних і змішаних колоній становила 70 %.

Наступний етап дослідження стосувався підбору оптимальної концентрації ембріональної

телячої сироватки у повному поживному середовищі. Використовуючи різні концентрації сироватки (0%, 10%, 20%, 30%), ставили аналогічні культури *in vitro*. Ефективність клонування клітин-попередників виявилась найкращою при використанні 20 %-ної сироватки, вона дорівнювала  $42,8 \pm 1,5$ . Подальше збільшення концентрації сироватки не призводило до суттєвого збільшення кількості колоній, вірогідної різниці між результатами не спостерігалось, у той час як відсутність сироватки призводила до росту незначної кількості колоній ( $1,5 \pm 0,3$ ), 10%-ної концентрації було недостатньо. Тому ми зупинилися на концентрації сироватки, яка дорівнює 20 %.

У зв'язку з тим, що процесінг проводили протягом трьох діб, колонієутворюючу активність у трьох випадках визначали кожного дня, збираючи матеріал до і після кріоконсервування. В інших випадках досліджували ефективність клонування лише після кріоконсервування.

Як контроль вдалого консервування використовували поживне середовище 199, в якому розводили отримані в результаті процесінгу клітини і заморожували. Незважаючи на використання автоматичного методу програмного заморожування, ефективність клонування клітин-попередників, не оброблених ДМСО, після розморожування дорівнювала 0, у той час як при використанні кріопротектора в культурі визначали  $32,6 \pm 1,8$  колоній на  $1 \times 10^5$  експлантованих клітин. Порівнюючи з ефективністю клонування цих попередників до кріоконсервування, яка дорівнювала  $42,5 \pm 1,2$ , слід сказати, що різниця між цими даними вірогідна (табл.).

Як видно з таблиці, використання автоматичної програми заморожування дозволяє зберегти життєздатність більшості кровотворних клітин-попередників. У різних випадках процент збережених колонієутворюючих одиниць становив від 70 до 75 %.

Визначали наявність зв'язку між кількістю КУО, CD34<sup>+</sup>-клітин і мононуклеарів у зразках

**Таблиця. Порівняльний аналіз результатів досліджень ефективності клонування до і після заморожування у холодильній установці з автоматичним програмним кріоконсервуванням Espace 330**

Консервуюче середовище	Ефективність клонування клітин-попередників в культурі $M \pm m$	
	До кріоконсервування	Після кріоконсервування
ДМСО	$42,5 \pm 1,2$	$32,6 \pm 1,8$
RPMI	$41,8 \pm 1,2$	0

**Примітка:** Різниця між даними до і після кріоконсервування статистично вірогідна  $p < 0,05$ .

ПК, отриманих у результаті цитоферезу. Зіставлення результатів досліджень показує, що у б обстежених хворих спостерігалася пряма залежність кількості КУО,  $Co34^+$ -клітин і мононуклеарів. У двох випадках такої залежності не виявлено. Отримані дані свідчать про те, що КУО перебуває у мононуклеарній фракції серед  $CD34^+$ -клітин. Цей висновок зроблений нами у зв'язку з тим, що при концентрації  $Co34^+$ -клітин нижче 1 % КУО майже не спостерігалось (ЕКУ дорівнювала від 0 до 3), а при концентраціях  $CD34^+$ -клітин більше 2 % їх кількість значно зростала, при концентрації понад 4 % вона була дуже високою. У зв'язку з різними діагнозами хворих об'єднання і статистична обробка цих даних на даному етапі були б некоректними. Але у кожному окремому випадку такий зв'язок чітко простежується.

Аналіз проведених досліджень свідчив, що метод культивування кровотворних клітин попередників дає змогу дати кількісну оцінку наявності в трансплантаті найближчих нащадків стовбурових клітин, здатних утворювати колонії (КУО).

Оптимізація умов культивування клітин периферичної крові пацієнтів, яким призначено

аутологічну трансплантацію, показала, що найкращою концентрацією ростового фактора є  $3 \times 10^5$  Од/мл. Перевищення цієї концентрації не лише не змінює ефективності клонування, а й призводить до старіння культури, що не сприяє точності оцінки функціональної активності стовбурових клітин. Використання 20 %-ної ембріональної телячої сироватки є оптимальною концентрацією для клонування клітин-нопередників з периферичної крові у культурі тканин *in vitro*.

Виявлено також, що  $CD34^+$ -клітини перебувають у фракції мононуклеарів, збагачених бластними клітинами.

Порівняльний аналіз вмісту колоїєутворюючих одиниць у культурі,  $CD34^+$  і мононуклеарів свідчив про наявність прямої залежності між цими показниками.

Вивчення функціонального збереження кровотворних клітин, мобілізованих у периферичну кров до і після кріоконсервування, показало, що метод низькотемпературної консервації дозволяє зберегти біологічну повноцінність гранулоцитарно-макрофагальних клітин-попередників і може бути придатним для клінічного застосування.

1. McCulloch E. A., Till J. E. The sensitivity of cells from normal mouse bone marrow to gamma radiation *in vitro* and *in vivo* // *Radiat. Res.*- 1962.- V. 16.- P. 822-832.
2. Dexter M., Peayworth C., Spooner E. The role of growth factors in self-renewal and differentiation of haemopoietic stem cells // *Philosophical Transactions Royal Society.*— 1990.- V.327.- P. 85-98.
3. Huang S., Teslapen L. Formation of haemopoietic microenvironment and haemopoietic stem cells from single human bone marrow stem cells // *Nature.*- 1992.- V. 360.- P. 745-749.
4. Pike B., Robinson W. Human bone marrow colony growth in agar gel // *J. Cell Physiol.*- 1970.- V. 76. - P. 77-82.
5. Иммунологические аспекты трансплантации костного мозга / Окулов В. Б., Афанасьев Б. В. // *Вопр. онкологии.*- 1992. - № 4.
6. Кробиология / Белоус А. М., Гришнков В. И.- К.: Наук. думка, 1994.
7. Венчиков А. И., Венчиков В. А. Основные приемы статистической обработки результатов наблюдений в области физиологии.- М.: Медицина, 1974.- 152 с.

*M. P. Barabuha, N. M. Bylko*

## EVALUATION OF FUNCTIONAL ACTIVITY OF HAEMOPOIETIC CELLS FOR AUTOTRANSPLANTATION OF PERIPHERAL BLOOD STEM CELLS

*This article is devoted to the problem of optimal conditions fitting used for evaluation of proliferating function of haemopoietic progenitor cells outside the organism under artificial conditions of cultural medium *in vitro*. The article also considers carrying out of the comparative analysis of quantitative contents of mononuclear cells,  $CD34^+$ -cells and progenitor cells in transplantate, and cloning efficiency determination of progenitor cells from unfrozen bone marrow in comparison with native bone marrow.*