

УДК 611.018.46.068.089

Д.І. Білько*, І.З. Борбуляк, Н.М. Білько

**Оцінка морфофункціонального стану гемопоетичних клітин-попередників
кордової крові для подальшої трансплантації[#]**

UDC 611.018.46.068.089

D.I. Bilko*, I.Z. Borbulyak, N.M. Bilko

**Assessment of Morphological and Functional State
of Hematopoietic Progenitor Cells from Cord Blood
for Potential Transplantation[#]**

Ключові слова: гемопоетичні стовбурові клітини, кордова кров, оцінка потенційного трансплантата, якісний аналіз колоній-клонів.

Ключевые слова: гемопоэтические стволовые клетки, кордовая кровь, оценка потенциального трансплантата, качественный анализ колоний-клонов.

Key words: hematopoietic stem cells, cord blood, evaluation of potential graft, qualitative cell cloning assay.

Наразі трансплантація гемопоетичних стовбурових клітин є радикальним методом лікування багатьох онкогематологічних захворювань людини. У зв'язку з цим отримання інформації про наявність стовбурових клітин у потенційному трансплантаті є одним з ключових питань сучасної трансплантології, оскільки від їхньої кількості і функціональної активності залежить успіх вказаної процедури [3, 4]. Цілком очевидна недостатність тільки морфологічного вивчення гемопоетичних клітин. Саме функціональні методи дослідження клітин дозволяють виявити потенціал їх проліферації та диференціації. Тому оцінка перспективності майбутнього трансплантата, а саме ефективності відновлення гемопоєзу, на сьогодні надзвичайно важлива. Метою даної роботи було оцінити морфологічні особливості та функціональну активність ранніх гемопоетичних клітин-попередників кордової крові як потенційного трансплантата.

Для отримання потенційного трансплантата гемопоетичних клітин зазвичай використовують суспензію збагачених довготривалим культивуванням гемопоетичних стовбурових клітин та їх найближчих нащадків. Впродовж тривалого культивування (5–7 тижнів) культура гемопоетичних клітин кордової крові може проліферувати і диференціюватися різними шляхами [2]. В оптимальних умовах вона збагачується на стов-

Nowadays, transplantation of hematopoietic stem cells is a radical way for treating many oncohematologic diseases in human. In this regard, information on the presence of stem cells in potential graft is one of the key issues of contemporary transplantology, due to strong relation of their number and functional activity and the success of the procedure [3, 4]. The inconsistency of solely morphological study of hematopoietic cells is apparent. Namely functional assessment of cells could reveal their proliferative and differentiation potential. Therefore, the evaluation of future graft sustainability in terms of efficiency of hematopoiesis restoration is very important now. Thus, the aim of this study was to estimate the morphological characteristics and functional activity of early hematopoietic progenitors from cord blood as a potential graft.

To procure a potential graft of hematopoietic cells one usually utilizes the suspension of hematopoietic stem cells and their closest descendants enriched in long-term culture. During long-term culturing (5–7 weeks), the culture of cord blood hematopoietic cells could proliferate and differentiate in various ways [2]. In optimal conditions, it is enriched with stem cells and progenitor cells, but in the case of invincible negative reasons, the cells in culture differentiate into macrophages, regardless their promising appearance under inverted microscope [8].

Центр молекулярних і клітинних досліджень, Національний університет «Києво-Могилянська академія», м. Київ, Україна

***Автор, якому необхідно надсилати кореспонденцію:**
вул. Іллінська, 4а, м. Київ, Україна 04070
електронна пошта: denys.bilko@yahoo.com

Centre of Molecular and Cell Research, National University of Kyiv-Mohyla Academy, Kyiv, Ukraine

***To whom correspondence should be addressed:**
4A, Illinska str., Kyiv, Ukraine 04070
e-mail: denys.bilko@yahoo.com

[#]Це дослідження було представлено на мінісимпозіумі «День стовбурової клітини», що відбувся 24 травня 2013 року в м. Києві.

[#]This research was presented at minisymposium Stem Cell Day, held in Kiev, Ukraine, on the 24th of May, 2012.

Надійшла 15.06.2013
Прийнята до друку 30.08.2013

Received June, 15, 2013
Accepted August, 30, 2013

Проблемы криобиологии и криомедицины. – 2013. – Т. 23, №3. – С. 283–286.
© 2013 Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины

Problems of Cryobiology and Cryomedicine. – 2013. – Vol. 23, Nr. 3. – P. 283–286.
© 2013 Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine

бурові клітини та клітини-попередники, проте за наявності негативних причин, яких не вдалося запобігти, клітини у культурі диференціюються у макрофагальному напрямку, хоча під інвертованим мікроскопом культура може мати перспективний вигляд [8].

З метою оцінки морфофункціональних особливостей клітин-попередників кордової крові, культивованих у довготривалій культурі *in vitro*, проводили їх аналіз. Для цього клітини, вилучені з довготривалої культури, відмивали центрифугуванням у живильному середовищі протягом 10 хв. Життєздатність клітин визначали за суправітальним забарвленням метиленовим синім, їх функціональну активність – шляхом підрахунку колоній-клонів, які формуються кровотворними клітинами-попередниками у двотижневий термін при культивуванні *in vitro* у напіврідкому агарі методом Pluznik та Sachs [7].

Заздалегідь готували повне живильне середовище на основі синтетичного живильного середовища, телячої сироватки, суміші ростових факторів, до якого додавали напіврідкий агар. Підготовлені клітини переносили у суміш повного живильного середовища з агаром (щільність посіву 5×10^5 на 1 мл), отриману суспензію розливали у стерильні чашки Петрі і проводили культивування за умов абсолютної вологості, 5%-ї концентрації CO_2 і 37°C .

Результати встановлювали на 14-й день культивування. При підрахунку колоній-клонів під інвертованим мікроскопом при збільшенні 200 зазвичай одержували високі показники: від 40 до 60 колоній-клонів на 10^5 культивованих клітин.

Аналіз морфологічних характеристик культивованих клітин при подальшому культивуванні у напіврідкому агарі показав, що клітини, які складали колонії, під інвертованим мікроскопом без забарвлення було неможливо ідентифікувати, тобто кількість отриманих колоній-клонів не є критерієм істинного стану культури. Склад клітин, які формували майбутній трансплантат, був різним і залежав від умов, в яких вони культивувалися. Механізми їх диференціювання у визначених напрямках ще до кінця не зрозумілі [1, 5, 6]. Тому, щоб запобігти помилок, для визначення наявності стовбурових гемопоетичних клітин та їх клітин-попередників в культурі не слід обмежуватись лише кількісним аналізом клонів.

Проводили подальший аналіз кожної отриманої колонії-клона для вивчення морфології клітин, які формують клон. Для цього готували препарат наступним чином. Чашку Петрі з колоніями у напіврідкому агарі розкривали, встановлювали під інвертований мікроскоп ($\times 200$), піпеткою Пастера вилучали колонію та переносили у лунку 96-лункового планшета із 20 мкл живильного середовища RPMI-1640 та 1% фетальної телячої сироватки. Після ресуспендування

To evaluate morphological and functional characteristics of cord blood progenitors underwent long-term *in vitro* culturing, they were analyzed as follows. Cells procured from long-term culture were washed using centrifugation in culture medium for 10 minutes. Cell viability was assessed by supravital staining with Methylene Blue, their functional activity was evaluated by calculation of clone progenies, formed by hematopoietic progenitors during two-week-long *in vitro* cultivation in semisolid agar according Pluznik and Sachs [7].

Complete culture medium based on a synthetic medium, calf serum, a mixture of growth factors, and supplemented by semisolid agar was prepared in advance. Prepared cells were transferred to a mixture of complete medium with agar (seeding density of 5×10^5 per 1 ml), the resulting suspension was poured into sterile Petri dishes and culturing was performed under conditions of absolute humidity, 5% CO_2 and 37°C .

The data were collected on the 14th day of cultivation. Calculation of clone progenies under inverted microscope at 200 magnification usually showed a high value: 40 to 60 clones per 10^5 cultured cells.

Analysis of cells' morphological characteristics during the following culturing in semisolid agar showed the infeasibility to identify using the inverted microscope the cells forming the colonies if no staining was applied, *i. e.* the number of derived clones did not reflect the true state of culture. The population of cells forming the prospective transplant was diverse and depended on the conditions in which cells were cultured. Mechanisms of differentiation in certain directions are unclear until now [1, 5, 6]. Therefore, to prevent the erroneous determination of the present hematopoietic stem cells and their precursors in culture, the analysis of clones should not be restricted by solely quantitative assays.

Thereafter we performed analysis of each derived clone to study the morphology of clone forming cells. The sample was prepared as follows. Petri dish with colonies in semisolid agar was opened, placed under the inverted microscope (magnification of 200), using Pasteur pipette the colony was collected and transferred into the well of 96-well plate with 20 μl of RPMI-1640 culture medium supplemented with 1% fetal calf serum. After resuspending the cell suspension was transferred into a cytocentrifuge cuvette, centrifugation was performed with 1000 rpm for 1 min. The resulting sample was stained according Romanowsky-Giemza. Further morphological analysis of the sample was conducted under a light microscope at 900 magnification, we calculated the number of colony forming cells with different maturity stages.

Combining together the number of proliferating myeloid hematopoietic cells (blasts, promyelocytes, myelocytes, metamyelocytes *etc.*) and relating of these to the



суспензію клітин переносили у комірку цитоцентрифуги і проводили центрифугування при 1000 об/хв протягом 1 хв. Отриманий препарат забарвлювали за методом Романовського-Гімза. Далі проводили морфологічний аналіз препарату під світловим мікроскопом (×900) шляхом підрахунку клітин різного ступеня зрілості, які формували колонії.

Об'єднавши в одну групу мієлоїдні гемопоетичні клітини, які проліферують (бластні, промієлоцити, мієлоцити і метамієлоцити та інші), і протиставивши їх кількості макрофагів, які не є джерелом відродження кровотворення, було виявлено, що в культивованих зразках, в залежності від умов зберігання і культивування, спостерігалася суттєво різна картина.

У разі переважання в препаратах клітин мієлоїдного напрямку диференціювання різного ступеня зрілості, проте з більшістю проліферуючих клітин, – потенційний трансплантат оцінювали як високоефективний та здатний забезпечити відновлення кровотворення.

При цьому, якщо кількість проліферуючих гемопоетичних клітин перевищувала кількість макрофагальних клітин не менше, ніж у 4 рази, трансплантат вважали високopersпективним, здатним забезпечити відновлення кровотворення.

У той же час макрофагальна експансія, незважаючи на велику кількість клітин у клонах, свідчила про згасання кровотворення, відсутність чи зниження відновлюючого потенціалу, у зв'язку з чим констатували недоцільність використання продукту з такими характеристиками в якості трансплантата.

Саме вивчення співвідношення кількості мієлоїдних до макрофагальних клітин у колоніях-клоних дозволило об'єктивно оцінити якість потенційного трансплантата. Вказане співвідношення кількості таких клітин (не менш 4:1) є оптимальним, оскільки за збільшення макрофагальної експансії (4:2, 4:3 і більше) знижується здатність культурального матеріалу відновлювати гемопоез. До того ж уявити собі культуру, в якій зовсім немає макрофагів, неможливо.

Отже, у роботі було досліджено морфофункціональні особливості гемопоетичних клітин-попередників кордової крові, а також оцінено їх проліферативний потенціал. Додаткове культивування збагаченої популяції клітин у напіврідкому агарі з метою отримання колоній клітин-попередників є адекватним способом оцінки потенційного трансплантата. Отримані результати свідчать про те, що даний метод оцінки стовбурових гемопоетичних клітин як потенційного трансплантата дозволяє провести відбір якісного трансплантаційного матеріалу, здатного до ефективного відновлення гемопоезу, що може бути підґрунтям для успішного використання методу як з науковою метою, так й у практичній медицині.

number of non-hemopoietic macrophages, it was found that cultured samples exhibited various pattern, depending on the storage and culture conditions.

If we observed the prevalence of myeloid cells with various degrees of maturity, but with a predominance of proliferating cells, a potential graft was considered as highly effective, and capable to provide the restoration of hemopoiesis.

Herewith, if the number of proliferating hematopoietic cells exceeded the number of macrophage cells no less than four times, graft was considered as highly prospective, and capable of restoring hematopoiesis.

At the same time, macrophage expansion regardless of the high amount of cells in the clones pointed to the decay in hematopoiesis, absent or declined restoration potential, and therefore, the sample with such a characteristics was designated as inappropriate for grafting.

Namely the estimation of the ratio of myeloid and macrophage cells in the clones allowed to assess reasonably the quality of potential graft. The given above ratio of the cells (not less than 4 to 1) was optimal due to the fact that in the case of an elevated macrophage expansion (4:2, 4:3 and higher) the cultured sample lost the ability to restore hematopoiesis. Moreover, it is hardly possible to imagine a culture with no macrophages.

Consequently, we performed the investigation of morphofunctional features of cord blood hematopoietic progenitors and assessed their proliferative potential. Subsequent culturing of enriched cell population in semi-solid agar aimed to obtain the colonies of progenitor cells could be an adequate way to evaluate potential graft. The obtained results indicate that this method of evaluation of hematopoietic stem cells as a potential graft would allow to select high-grade transplantation material capable of effective hematopoiesis restoration, which may be the basis for the successful application of this method for both scientific purposes and medical practice.

References

1. Cain C.J., Manilay J.O. Hematopoietic stem cell fate decisions are regulated by Wnt antagonists: comparisons and current controversies // *Experimental Hematology*. – 2013. – Vol. 41, N1. – P. 3–16.
2. Copley M.R., Beer P.A., Eaves C.J. Hematopoietic stem cell heterogeneity takes center stage // *Cell Stem Cell*. – 2012. – Vol. 10, N6. – P. 690–697.
3. Cutler C., Ballen K.K. Improving outcomes in umbilical cord blood transplantation: state of the art // *Blood Rev.* – 2012. – Vol. 26, N6. – P. 241–246.
4. Haylock D.N., Nilsson S.K. Expansion of umbilical cord blood for clinical transplantation // *Curr. Stem Cell Res. Ther.* – 2007. – Vol. 2, N4. – P. 324–335.
5. Kent D., Copley M., Benz C. et al. Regulation of hematopoietic stem cells by the steel factor/KIT signaling pathway // *Clin. Cancer Res.* – 2008. – Vol. 14, N7. – P. 1926–1930.
6. Perdigoto C.N., Bardin A.J. Sending the right signal: Notch and stem cells // *Biochim. Biophys. Acta*. – 2013. – Vol. 1830, N2. – P. 2307–2322.

Література

1. Cain C.J., Manilay J.O. Hematopoietic stem cell fate decisions are regulated by Wnt antagonists: comparisons and current controversies // *Experimental Hematology*. – 2013. – Vol. 41, №1. – P. 3–16.
2. Copley M.R., Beer P.A., Eaves C.J. Hematopoietic stem cell heterogeneity takes center stage // *Cell Stem Cell*. – 2012. – Vol. 10, №6. – P. 690–697.
3. Cutler C., Ballen K.K. Improving outcomes in umbilical cord blood transplantation: state of the art // *Blood Rev.* – 2012. – Vol. 26, №6. – P. 241–246.
4. Haylock D.N., Nilsson S.K. Expansion of umbilical cord blood for clinical transplantation // *Curr. Stem Cell Res. Ther.* – 2007. – Vol. 2, №4. – P. 324–335.
5. Kent D., Copley M., Benz C. et al. Regulation of hematopoietic stem cells by the steel factor/KIT signaling pathway // *Clin. Cancer Res.* – 2008. – Vol. 14, №7. – P. 1926–1930.
6. Perdigoto C.N., Bardin A.J. Sending the right signal: Notch and stem cells // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2013. – Vol. 1830, №2. – P. 2307–2322.
7. Pluznik D.H., Sachs L. The cloning of normal "mast" cells in tissue culture // *J. Cell. Physiol.* – 1965. – Vol. 66, №3. – P. 319–324.
8. Suzuki A., Nakano T. Development of hematopoietic cells from embryonic stem cells // *Int. J. Hematol.* – 2001. – Vol. 73, №1. – P. 1–5.

