

ВПЛИВ ФАКТОРА РОСТУ FLT3 НА ФУНКЦІОНАЛЬНУ АКТИВНІСТЬ АС 133 + КЛІТИН КОРДОВОЇ КРОВІ В КУЛЬТУРІ *IN VITRO*

Статтю присвячено вивченню особливостей функціональної активності клітин АС 133 + кордової крові залежно від умов культивування. Показано, що інкубація клітин фракції АС 133 + з фактором росту Flt3 та подальше довготривале культивування у дифузійних камерах на фідері зі стромі фетальної печінки 7-8 тижнів гестації та комплексу екзогенних рекомбінантних цитокінів призводить до значного збільшення кількості гемопоетичних клітин упродовж усього терміну культивування на тлі зберігання високих показників клоногенної активності клітин-попередників грануломоноцитопоезу.

Останнім часом клітинні біотехнології, пов'язані з експансією гемопоетичних клітин у культурі, переживають бурхливий розвиток. Причиною такої зацікавленості є перспектива застосування їх у клітинній терапії [1]. Пошук оптимальних умов культивування гемопоетичних клітин включає підбір комбінацій цитокінів, адекватних фідерних шарів та різноманітних культуральних систем, що дають змогу отримувати клітинні суспензії з високим вмістом кровотворних клітин-попередників. У разі успішних пошуків недостатню кількість гемопоетичних клітин можна було б поповнити за рахунок їх культивованих попередників [2].

Найперспективнішою альтернативою кістковому мозку сьогодні є кордова кров, яка передається від матері до дитини і забір якої проводять при народженні. Отримано достатньо свідчень про склад та функціональну активність клітин кордової крові, є позитивний досвід використання її у клініці [3]. До безперечних переваг кордової крові як трансплантату належать її доступність та безпека при отриманні для життя матері та дитини, онтогенетична примітивність клітин-попередників та значно вищий проліферативний потенціал у порівнянні з попередниками кісткового мозку. Крім того, визначають можливість довготривалого зберігання кордової крові без великих втрат кількості клітин та їхньої функціональної активності, менший ризик передачі деяких інфекцій і проявів реакції «трансплантат проти хазяїна» при трансплантації кордової крові та відсутність етичних проблем [4]. Проте й досі кордова кров недостатньо широко застосовується в клініці як трансплантат. Це пояс-

нюється тим, що поруч із позитивними якостями, які вигідно відрізняють кордову кров від кісткового мозку і периферійної крові, існує низка недоліків, пов'язаних із вимогами до її застосування. Кількості цих клітин недостатньо для відновлення кровотворення у дорослої людини [5].

Сьогодні ведеться пошук оптимальних умов культивування клітин-попередників кордової крові з метою їх накопичення. Застосування методів культивування клітин, оцінка їх активності є базою для вивчення функціональної повноцінності клітин кордової крові як трансплантату. Саме ці методи є найбільш перспективними в аспекті вирішення проблеми отримання достатньої кількості повноцінних клітин, здатних відновити гемопоез у людини.

Сучасний напрям досліджень кордової крові людини спрямований на пошук та розробку методик експансії *ex vivo* гемопоетичних стовбурових клітин. Відбувається тестування різноманітних культуральних систем, складів живильного середовища, різних культуральних матриксів, комбінацій цитокінів та біологічно активних сполук, що вносяться до середовища [2]. Всі ці методи покликані стимулювати поділ примітивних кровотворних клітин без втрати їх потенцій до самопідтримки, але зі збільшенням їх кількості. Розвиток довготривалих культуральних моделей гемопоетичних стовбурових клітин є одним з найважливіших завдань у сучасній біотехнології.

Метою цієї роботи було дослідження впливу інкубації з ростовим фактором Flt3 на функціональну активність АС 133+ клітин кордової крові в довготривалій культурі *in vitro*.

Матеріали і методи

Фракцію AC133+ клітин вилучали методом позитивної селекції з мононуклеарів кордової крові, отриманих шляхом центрифугування у градієнті щільності Nystopaque (1,077 г/мл). Процедуру здійснювали за допомогою AC 133+ антитіл-кон'югованих супермагнетичних мікронамистинок з використанням MiniMACS колонок 25 MS+ (Miltenyi Biotec, Germany) [6]. Співвідношення частин до клітин становило 16:1. Після інкубації клітини відмивали льодяним PBS з 1 % BSA і 5 mM EDTA. Клітинну суспензію пропускали через 25 MS+ колонку MiniMACS, з її подальшим промиванням. Збагачені примітивними популяціями клітинні суспензії отримували після того, як колонку звільняли від дії магнітного поля MiniMACS і вимивали її вміст розчином вищевказаного складу.

Інкубацію AC133+ клітин проводили впродовж 12-ти, 16-ти і 18-ти годин з Flt-3 (Sigma) в концентрації 10 нг/мл середовища в умовах CO₂ інкубатора при 37 °С. Після заміни середовища в культуру додавали комплекс цитокінів у таких концентраціях: 10 нг/мл LIF; 10 нг/мл IL-3; GM-CSF 10 нг/мл (Sigma) і культивували протягом одного тижня в живильному середовищі DMEM з 15 % FCS в CO₂ інкубаторі (Jouan) з 5 % CO₂, при 37 °С і абсолютній вологості.

Для оцінки функціональної повноцінності клітин проводили клонотипний аналіз із визначенням кількості клітинних агрегатів-колоній (КУОк) і кластерів (КЛУО), утворених у напіврідкому агарі на 14-ту добу культивування [7; 8] у присутності GM-CSF 10 нг/мл (Sigma). За результатами клонотипного аналізу визначали найбільш ефективний термін інкубації з Flt3.

Обравши оптимальний термін інкубації з Flt3 у подальшому оцінювали функціональну активність AC клітин у довготривалій культурі в присутності фідерного шару зі строми фетальної печінки 7-8 тижнів гестації з додаванням комплексу рекомбінантних цитокінів (20 нг/мл SCF; 50 нг/мл IL-3; 20 IL-6 нг/мл; 10 нг/мл GM-CSF) (Sigma). Фідерні шари готували заздалегідь. Дезагрегацію фетальної печінки проводили ферментативно з використанням 0,25 % розчину Trypsin EDTA (Sigma) [9]. Сформований моношар обробляли Мітоміцином С у концентрації 2 мг/мл протягом двох годин у стандартних умовах CO₂ інкубатора [10]. Використовували оригінальний, запатентований спосіб культивування клітин у порожнині гелевої дифузійної камери [11]. Клітинні суспензії, інкубовані з Flt3 та неінкубовані (контроль), у концентрації 1-10³/мл, вводили в порожнину дифузійної камери в об'ємі 0,2 мл.

Камери переносили в шестилункові пластикові планшети фірми Nunc (2 камери на 1 лунку) з фідерним шаром, а-лунки заповнювали повним живильним середовищем із додаванням комплексу рекомбінантних цитокінів (20 нг/мл SCF; 50 нг/мл IL-3; 20 нг/мл IL-6; 10 нг/мл GM-CSF) (Sigma) та культивували протягом 5 тижнів зі зміною половини супернатанту свіжим середовищем кожні 3 доби.

У процесі культивування на 2, 3 та 5 тижнях оцінювали кількість ядровмісних клітин (ЯВК) та проводили клонотипний аналіз у напіврідкому агарі для визначення кількості функціонально повноцінних клітин-попередників (КУО-ГМ). Проліферативний потенціал (ПП) оцінювали як співвідношення колоній до кластерів. У довготривалій культурі оцінювали абсолютну кількість КУО-ГМ в 1 мл.

Статистичну обробку даних проводили з застосуванням програм STATISTICA® 5.0 (США) та Microsoft Excel 2003. Достовірність різниці середніх значень двох сукупностей оцінювали за допомогою критерію Стьюдента [12].

Результати та обговорення

AC133+ клітини є найближчими нащадками гемопоетичних стовбурових клітин. Вони характеризуються здатністю до довготривалого підтримання гемопоезу *in vitro*, таким чином, вони є перспективною моделлю для експансії кровотворних клітин-попередників [13].

Ми оцінювали найбільш ефективний термін інкубації клітин фракції AC133+ кордової крові з Flt3. Клонотипний аналіз неінкубованої фракції AC133+ клітин кордової крові (контроль), проведений у м'якому агарі, показав ріст колоній трьох типів та кластерів. Невисокий рівень клонотипної активності AC133+ клітин (31,4 ± 2,15), на наш погляд, зумовлений їхньою примітивністю та обмеженою здатністю реагувати на присутність GM-CSF у культурі, що не давало змоги розкрити повністю їх проліферативний потенціал (1,88 ± 0,41) (рис. 1).

Використання Flt3 призводило до збільшення кількості колоній (КУОк) і показника проліферативного потенціалу вже після 12-ї години дії. Найефективнішою була інкубація з Flt3 протягом 16-ти годин, яка призводила до збільшення у 7 разів кількості КУОк (212,5 ± 4,59) та максимального збільшення ПП (10,01 ± 0,96). Продовження терміну інкубації клітин до 18-ти годин не збільшувало показники клонотипної активності, при цьому проліферативний потенціал значно зменшувався (рис 1 а, б). Отримані дані покладено в основу патенту України [15].

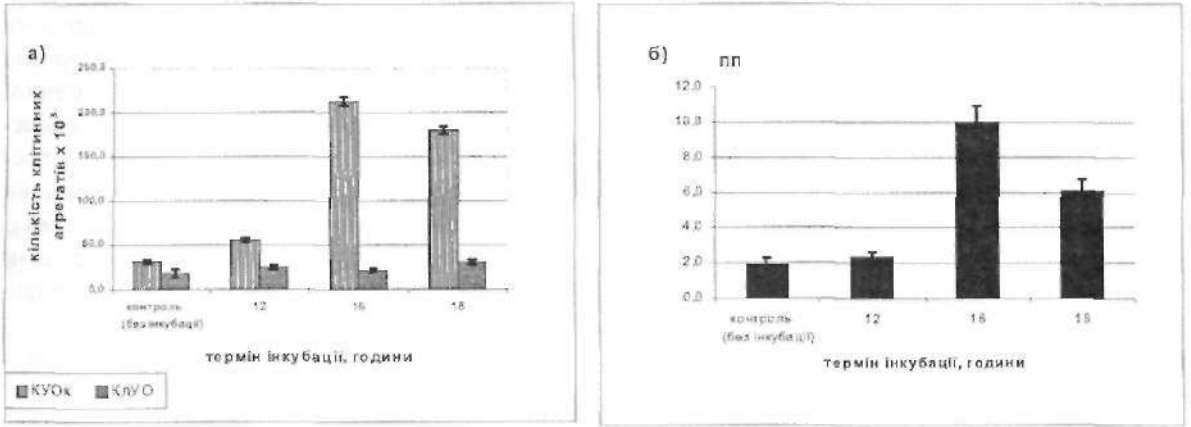


Рис. 1. Вплив терміну інкубації з Flt3 на гемопостичну активність AC133+ клітин кордової крові: а) клонотична активність клітин-попередників; б) проліферативний потенціал.

Таке збільшення кількості колонісуючих одиниць у культурі після інкубації Flt3, можливо, пов'язане з тим, що фактор росту Flt3 функціонує шляхом активації рецепторів Flt3-ТН розінкінази на поверхні гемопоетичних клітин-попередників і сприяє переходу примітивних клітин-попередників до цитокінзалежного стану [14].

У процесі довготривалого культивування AC133+ клітин, інкубованих з Flt3 протягом 16-ти годин, у дифузійних камерах у присутності фідерного шару та комплексу рекомбінантних цитокінів, спостерігалася проліферація гемопоетич-

них клітин-попередників, що призводило до їх експансії впродовж усього терміну культивування (5-ти тижнів) на тлі високих показників їх функціональної активності (рис. 2).

Довготривала підтримка гемопоезу в культурі AC 133+ клітин кордової крові досягалась за відсутності їх безпосереднього контакту з фідерним шаром і здійснювалась шляхом дистанційної регуляції кровотворення гуморальними факторами, що вироблялись клітинами фідерного шару, а також завдяки присутності екзогенних рекомбінантних цитокінів.

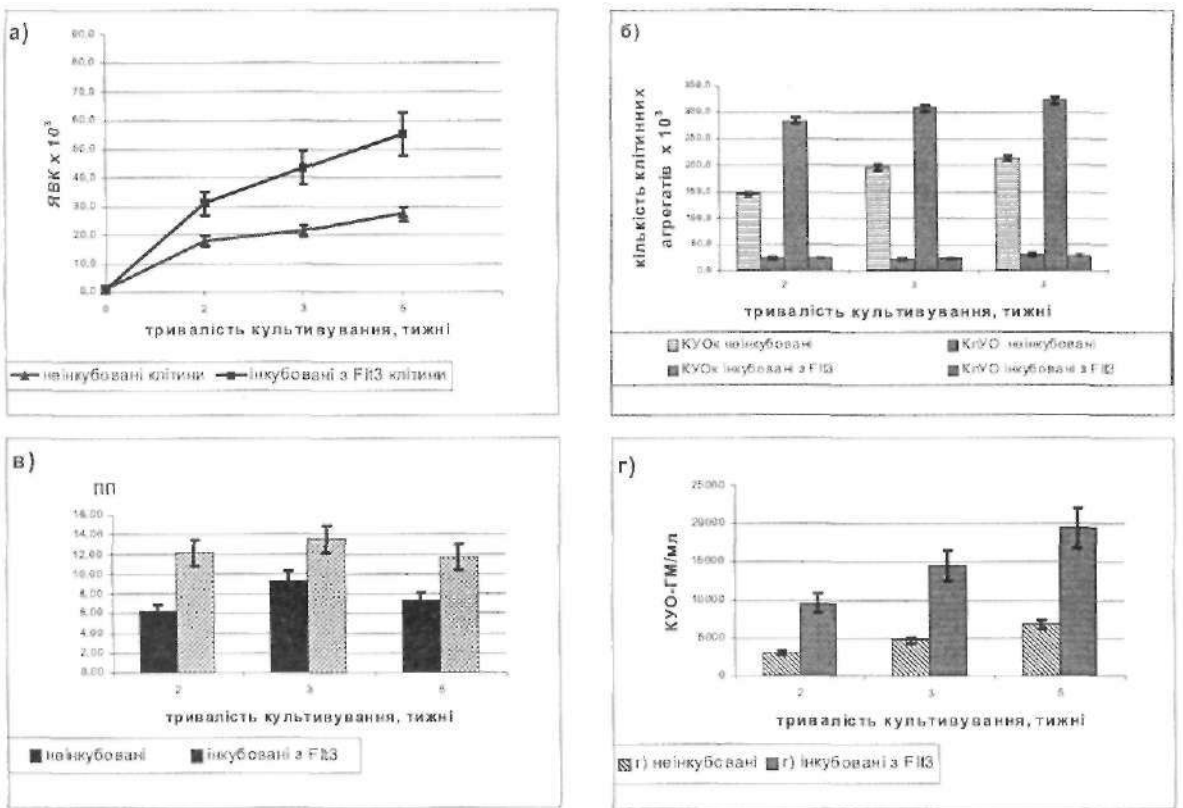


Рис. 2. Вплив 16-ти годинної інкубації з Flt3 на гемопостичну активність AC133+ клітин кордової крові в довготривалій культурі: а) ядровмісні клітини; б) клонотична активність; в) проліферативний потенціал; г) кількість КУО-ГМ в 1 мл.

Інкубація очищеної фракції AC133+ клітин у повному живильному середовищі з Flt3 протягом 16-ти годин з наступним культивуванням на фідері зі строми фетальної печінки та комплексу рекомбінантних цитокінів зумовлювала значне збільшення кількості ЯВК упродовж усього терміну культивування у порівнянні з неінкубованими клітинами. Так, максимальне збільшення кількості ЯВК, у 55 разів, було отримано на 5-му тижні культивування для інкубованих з Flt3 клітин, тоді, як для неінкубованих клітин цей показник зріс у 27 разів у відповідний термін культивування (рис. 2 а). Крім того, відзначено зростання показників клоногенної активності клітин-попередників грануломоноцитопоезу (рис. 2 б, в), що підтверджується збільшенням абсолютної кількості клітин-попередників (КУО-ГМ) у довготривалій культурі (рис. 2 г).

Таким чином, інкубація з Flt3 клітин фракції AC 133+ протягом 16-ти годин з подальшим перенесенням клітин у довготривалу культуру при-

зводила до збільшення їх кількості впродовж усього терміну культивування, а також сприяла збереженню високих показників клоногенної активності гранулоцитарно-моноцитарних попередників. Беручи до уваги особливість дії ростового фактору Flt3 у культурі, вважаємо, що використання етапу інкубації AC 133+ клітин із Flt3 спричиняє просування первісної популяції на наступні етапи розвитку, внаслідок чого підвищується чутливість клітин до цитокінів і, відповідно, досягається високий рівень показників колонієутворення в культурі *in vitro*.

Отримані експериментальні дані можуть бути використані для розробки протоколів експансії гемопоетичних клітин-попередників з метою отримання достатньої кількості матеріалу для клінічного застосування.

Роботу виконано за підтримки Державного фонду Фундаментальних досліджень Міністерства освіти і науки України.

1. *Madlambayan G. J., Rogers I, Casper R. F., Zandstra P. W.* Controlling Culture Dynamics for the Expansion of Hematopoietic Stem Cells *II Journal of hematology & stem cell research.*- 2001.- № 10.- P. 481-492.
2. *Eridani S., Mazza U., Massaro P., La Targia M. L., Maiolo A.T., Mosca A.* Cytokine effect on ex vivo expansion of haemopoietic stem cells from different human sources *II Biotherapy.*- 1998.- Vol. 10.- № 4.- P. 295-298.
3. *Broxmeyer H. E., Kurtzberg J., Gluckman E., Auerbach A. D., Douglas G., Cooper S., Falkenburg J. H., Bard J., Boyse E. A.* Umbilical cord blood hematopoietic stem and repopulating cells in human clinical transplantation *II Blood Cells.*- 1991.-Vol. 17.-№ 2.-P. 313-329.
4. *Migliaccio A. R., Baiocchi M., Durand B., Eddleman K., Migliaccio G., Adamson J. W.* Aspects of biology of the neonatal hematopoietic stem cells *II Stem Cell Dayt.*- 1993.- Vol. 11.- № 2.- P. 54-64.
5. *Broxmeyer H. E.* Placental cord blood for clinical bone marrow transplantation *II The 33rd Annual Meeting of the Society for Criobiology.*- Indianapolis, Indiana, USA.- 1996.- P. 4.
6. *Kobari L., Giarratana M. C., Pfluinio F, Izac B., Coulombel L., Douay L.* CD 133+ cell selection is an alternative to CD34+ cell selection for ex vivo expansion of hematopoietic stem cells *II J. Hematother. Stem Cell Res.*- 2001.- Vol. 10.- № 2.- P. 273-81.
7. *Pike B. L., Robinson W. A.* Human bone marrow colony growth in agar-gel *II J. Cell. Physiol.*- 1970.- 76.- P. 77-84.
8. *Pluznik B. L., Sachs L.* The cloning of normal mast cells in the tissue culture. *II J. Cell. Comp. Physiol.*- 1965.- 66.-№ 3.-P. 319-324.
9. *Дьяконов Л. /., Ситькова В. И.* Животная клетка в культуре. Методы и применение в биотехнологии.- М.: Компания Спутник.- 2000.- 400 с.
10. *Ponchio L., Duma L., Oliviero B., Gibelli N., Pedrazzoli P., Robustelli della Cuna G.* Mitomycin C as an alternative to irradiation to inhibit the feeder layer growth in long-term culture assays *II Cytotherapy.*- 2000.- Vol. 2.- № 4.- P. 281-286.
11. *Біцько Н. М.* Спосіб виготовлення камери для культивування клітин. Патент України № 2692 від 15.04.94. // Офіційний бюлетень «Промислова власність».- 1994.- № 5.- С 218.
12. *Бобриков В. П., Бобриков И. П.* STATISTICAL - Статистический анализ и обработка данных в среде Windows®.- М.: Информационно-издательский дом «Филлинь», 1998.-608 с.
13. *Goussetis E., Theodosaki M, Paterakis G., Per is ter i J., Petropoulos D., Kitra V., Papassarandis C, Graphakos S.* A functional hierarchy among the CD34+ hematopoietic cells based on in vitro proliferative and differentiative potential of AC133+CD34(bright) and AC133(dim)/CD34+ human cord blood cells *II J. Hematother. Stem Cell Res.*- 2000.- Vol. 9.- № 6.- P. 827-840.
14. *Haylock D. N., Horsfall M. J., Dowse T. L., Ramshaw H. S., Niutta S., Protopsaltis S., Peng L., Burrell C, Rap-pold I., Buhring H. J., Simmons P. J.* Increased recruitment of hematopoietic progenitor cells underlies the ex vivo expansion potential of FLT3 ligand *II Blood.*- 1997.- Vol. 15.- № 90(6).- P. 2260-2272.
15. *Білько Н. М., Василовська С. В., Білько Д. /., Вотяко-ва І. А., Бойко Р. В.* Спосіб культивування клітин кордової крові. Патент України № 16917U від 15.08.06 // Офіційний бюлетень «Промислова власність».- 2006.- № 8.-С. 18.

S. Vasylovska, N. Bilko

**INFLUENCE OF FLT3 GROWTH FACTOR ON FUNCTIONAL
ACTIVITY OF AC133+ CORD BLOOD CELLS CULTIVATED *IN VITRO***

The article concerns investigation of functional activity of AC 133+ cord blood cells. It was shown, that incubation of AC 133+ cells with Flt3 growth factor followed by prolonged cultivation in the diffusion chambers with fetal liver stromal feeder increases number of hematopoietic cells during the complete duration of cultivation. Cells cultured with this method were characterized by high clonogenic activity of granulocyte-macrophage lineages.