

Роль фактора росту Flt-3 у регуляції проліферативної активності AC133⁺ клітин кордової крові

Н.М. БІЛКО¹, С.В. ВАСИЛОВСЬКА¹, Д.І. БІЛКО¹, І.А. ВОТЯКОВА²

¹Центр молекулярних і клітинних досліджень Національного університету "Києво-Могилянська академія"

²Медичний Центр тканинної і клітинної терапії "Ембріотек", м. Київ

Role of Flt-3 Growth Factor in Regulating Proliferative Activity of AC133⁺ Cord Blood Cells

N.M. BILKO¹, S.V. VASILOVSKA¹, D.I. BILKO¹, I.A. VOTYAKOVA²

¹Center of Molecular and Cellular Research at National University
of "Kyiv-Mohyla Academy", Kyiv, Ukraine

²Medical Center of Tissue and Cell Therapy "Embryotech", Kyiv, Ukraine

AC133⁺ (CD133) є маркером поліпотентних стовбурових клітин, який характеризує найбільш примітивні популяції негемопоетичних клітин. З іншого боку, ці клітини вважаються попередниками гемопоетичних клітин і визначаються серед AC133⁺ клітин за даними різних авторів від 20 до 60 % випадків. В останні роки обговорюються перспективи клінічного застосування AC133⁺ клітин замість CD34⁺ клітин, адже саме їм притаманна здатність до довготривалої підтримки гемопоезу *in vitro*. Мета роботи – дослідження клоногенного потенціалу клітин фракції AC133⁺ кордової крові в системі *in vitro* та визначення впливу інкубації з фактором росту Flt-3 на їх функціональні властивості.

Аналіз результатів культивування клітин AC133⁺ популяції свідчив про наявність у них клоногенних властивостей. У напіврідкому агарі вдалося отримати колонії, які склалися з недиференційованих клітин. Сума їх на 14-ту добу культивування становила $31,4 \pm 8,18$, тоді як для кластерів цей показник дорівнював $17,76 \pm 3,82$. Застосування етапу інкубації з Flt-3 протягом 12 годин з подальшим культивуванням клітин призводило до формування колоній з ознаками гемопоетичних клітин. Кількість колонієутворюючих одиниць (КУОк) в агаровому середовищі дорівнювала $66,69 \pm 19,07$, що у 2 рази перевищує цей показник у культурах без інкубації ($p < 0,01$). Продовження терміну інкубації до 16 годин дозволило значно підвищити клоногенну активність клітин фракції AC133⁺ до $212,5 \pm 24,95$, що приблизно в 3,2 рази перевищує даний показник при інкубації протягом 12 годин ($p < 0,001$) і приблизно в 6,8 рази вище за дані у контрольному варіанті ($p < 0,001$). Таке збільшення кількості колоній під впливом Flt-3 може свідчити про включення у проліферацію і диференціювання ранніх клітин-попередників, що знаходяться у стані спокою у початковому стані.

Отримані експериментальні дані свідчать про те, що використання додаткового етапу преінкубації клітин AC133⁺ фракції з ростовим фактором Flt-3 доцільне для подальшого примноження ранніх клітин-попередників у культурі клітин *in vitro* та сприяє їх просуванню шляхом диференціювання у напрямку гемопоезу.

The AC133⁺ (CD133) are the marker for polypotent stem cells, characterising the most primitive populations of non-hemopoietic cells. From another side, these cells are considered as hemopoietic cell precursors, being determined among AC133⁺ cells from 20 to 60% cases, as reported by different authors. There have been recently discussed the perspectives of clinical application of AC133⁺ cells instead of CD34⁺, because of the capability for long-term hemopoiesis maintenance *in vitro*, being inherent namely to them. The research was aimed to investigate the clonogenic potential of AC133⁺ fraction of cord blood cells *in vitro* and to determine the effect of incubation with Flt-3 growth factor on their functional properties.

The analysis of culturing results of AC133⁺ population cells testified to the presence in them of clonogenic properties. In a semi-liquid agar we managed to obtain the colonies, comprising non-differentiated cells. Their total number to the 14th culturing day was 31.4 ± 8.18 , meanwhile for clusters this index was 17.76 ± 3.82 . The application of incubation stage with Flt-3 within 12 hours with following cell culturing resulted to the formation of colonies with hemopoietic cell signs. The number colony-forming units (CFU) in agar medium was 66.69 ± 19.07 , that exceeded this index in incubation-free cultures ($p < 0.01$). The prolongation of incubation term up to 16 hrs enabled to significantly increase a clonogenic activity of AC133⁺ fraction cells up to 212.5 ± 24.95 , that exceeded this index at incubation within 12 hrs approximately in 3.2 times ($p < 0.001$) and was nearly in 6.8 times higher than the data in the control variant ($p < 0.001$). This augmentation in colony number under Flt-3 effect may testify to the inclusion of early progenitor cells, being initially in a quiescent state, into proliferation and differentiation.

The obtained experimental data testify to the expediency of applying additional preincubation stage of AC133⁺ fraction cells with Flt-3 growth factor for further augmentation of early cell-precursors in tissue culture *in vitro*, and contribution to their progress via differentiation towards hemopoiesis.