

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

UDC 57.085.23:611.018

N.M. Bilko^{1*}, S.V. Vasilovskaya¹, D.I. Bilko¹, I.A. Votyakova²

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

Фракція клітин AC133⁺, яка була виділена із кордової крові за допомогою магнітного сортиру, інкубувалася із фактором росту Flt-3 у концентрації 10 нг/мл протягом 12–18 годин. Це сприяло статистично достовірному збільшенню колонієутворення у культурі *in vitro* функціонально активних кровотворних клітин-попередників.

Ключові слова: гемопоетичні клітини-попередники, AC133⁺ клітини кордової крові, фактор росту Flt-3, клоногенний аналіз *in vitro*.

Фракція AC133⁺ клітин, виділених із кордової крові при допомозі магнітного сортиру, інкубувалася з фактором росту Flt-3 в концентрації 10 нг/мл на протязі 12–18 ч. Это способствовало статистически достоверному увеличению колониеобразования в культуре *in vitro* функционально активных кроветворных клеток-предшественников.

Ключевые слова: гемопоетические клетки-предшественники, AC133⁺ клетки кордовой крови, фактор роста Flt-3, клоногенный анализ *in vitro*.

AC133⁺ fraction of the cord blood cells separated by magnetic bead sorting was incubated with (10 ng/ml) during 12–18 hours that induced statistically significant enrichment of the colony formation *in vitro* of functionally active hematopoietic progenitor cells.

Key-words: hematopoietic progenitor cells, AC133⁺ cord blood-derived hematopoietic cells, Flt-3 growth factor, *in vitro* clonogenic assay.

Кордова кров (КК) людини є джерелом гемопоетичних стовбурових клітин (ГСК) і гемопоетичних клітин-попередників (ГКП), що володіють високим проліферативним потенціалом і відносно низькою імунореактивністю у порівнянні з кістковим мозком (КМ) [1].

AC133⁺ (CD133) як маркер поліпотентних стовбурових клітин був запропонований і описаний в 1997 році. Він характеризує популяцію клітин, які вважаються їх найближчими нащадками [2, 3]. Його коекспресія виявлена на 20–60% CD34⁺ клітин. Останніми роками обговорюються перспективи клінічного застосування AC133⁺-клітин як альтернативи CD34⁺. Саме їм притаманна здатність до довготривалої підтримки гемопоезу *in vitro*, таким чином, вони є перспективною моделлю для експансії раних клітин-попередників гемопоезу.

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.

Матеріали і методи

Виділення фракції AC133⁺ клітин здійснювали методом позитивної селекції (Miltenyi Biotec, Німеччина). Інкубацію AC133⁺ клітин з фактором

росту Flt-3 у концентрації 10 нг/мл (Sigma, США) проводили впродовж 12, 16 і 18 годин, після чого клітини культивували в середовищі DMEM з 15% FCS, 10 нг/мл LIF, 10 нг/мл IL-3, 10 нг/мл GM-CSF (Sigma, США) у CO₂-інкубаторі (Leec, Великобританія). Для оцінки функціональної активності гемопоетичних клітин використовували клоногенний аналіз у напіврідкому одношаровому агаровому середовищі з визначенням гранулоцитарно-макрофагальних колонієутворюючих одиниць (КУО-ГМ), для стимуляції утворення яких використовували GM-CSF (Sigma, США) в концентрації 10 нг/мл. Кількість клітинних агрегатів оцінювали на 14-ту добу культивування [4]. Обробці піддавали середні значення колоній (КУОк) трьох типів, кластерів (КЛУО), суму колоній, кластерів і загальну кількість всіх клітинних агрегатів при експлантації в агар 1×10³ клітин фракції AC133⁺. Проліферативний потенціал (ПП) популяції клітин AC133⁺ визначали як співвідношення колоній до кластерів. Статистичну обробку отриманих результатів проводили з використанням t-критерію Стьюдента.

Результати та обговорення

Клітини початкової популяції AC133⁺ (контроль без інкубації) утворювали в агарі колонії трьох типів,

¹Центр молекулярних і клітинних досліджень Національного університету "Києво-Могилянська академія", м. Київ

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

* Автор, якому необхідно направляти кореспонденцію: вул. Сковороди, 2, м. Київ, Україна 04655; тел.:+38 (044) 425-60-57, електронна пошта: nbilko@ukma.kiev.ua

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.

* To whom correspondence should be addressed: 2, Skovoroda str., Kyiv, Ukraine 04655; tel.:+380 44 4256057, e-mail: nbilko@ukma.kiev.ua

сума яких на 14-ту добу культивування становила $31,4 \pm 8,18$ (рисунок, а). Сума кластерів склала $17,76 \pm 3,82$. Проліферативний потенціал популяції клітин AC133⁺ в контролі був на низькому рівні $1,97 \pm 0,81$ (рисунок, б). Таким чином, невисокий рівень клоногенної активності початкової популяції AC133⁺ зумовлений їх примітивністю і обмеженою здатністю реагувати на присутність GM-CSF в культурі, що не дозволяє в даних умовах розкрити їх проліферативний потенціал.

Інкубація з Flt-3 протягом 12 годин з подальшим культивуванням клітин призводила до зростання кількості колонієутворюючих одиниць КУОк в агаровому середовищі до $66,69 \pm 19,07$, що у 2 рази перевищує цей показник в культурах без інкубації ($p < 0,01$). Достовірно не змінювалися кількість великих і малих кластерів, а також їх сума. Таким чином, сумарна кількість всіх клітинних агрегатів зростала завдяки збільшенню кількості КУОк, однак проліферативний потенціал залишався на рівні контрольних значень.

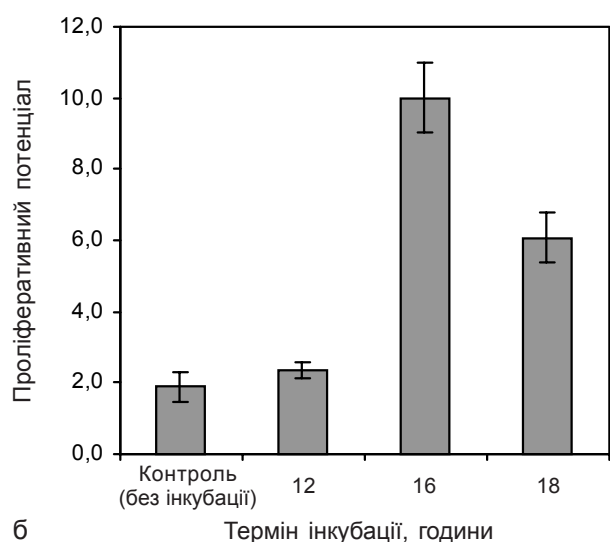
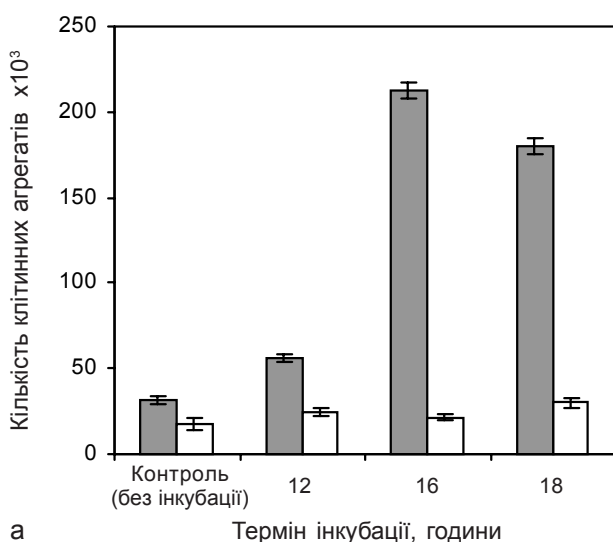
Подовження терміну інкубації до 16 годин дозволило значно підвищити клоногенну активність клітин фракції AC133⁺. Сума колонієутворюючих одиниць збільшувалася до $212,5 \pm 24,95$, що більше приблизно в 3,2 рази, ніж при інкубації 12 годин ($p < 0,001$) і приблизно в 6,8 рази за дані у контрольному варіанті ($p < 0,001$). Таке збільшення кількості колоній під впливом Flt-3 може свідчити про включення в проліферацію і диференціювання ранніх клітин-попередників фракції AC133⁺ клітин, що знаходяться у стані спокою у вихідному стані. Підтвердженням цього є збільшення показника проліферативного потенціалу AC133⁺ клітин у культурі до $10,04 \pm 1,90$, значення якого також було в 3,6 рази вище, ніж після 12-годинної інкубації ($p < 0,01$) і в 5 разів відносно контролю ($p < 0,01$).

Інкубація протягом 18 годин не приводила до збільшення клоногенної активності клітин відносно показника 16-годинної інкубації, хоча значно перевищувала його при 12-годинній інкубації і в контрольному варіанті ($p < 0,001$). Достовірної зміни показника ПП після 18 годин перебування клітин з Flt-3 не виявлено.

Отримані в роботі результати свідчать про те, що стимулюючий ефект фактора росту Flt-3 визначається впродовж 12-18 годин, проте його дія найбільш виражена після 16 годин, що сприяє підвищенню загального відсотка клоногенних попередників у суспензії з 4,2% (у вихідній фракції AC133⁺) до 23,4% [5]. Відомо, що рецептор Flt-3, або CD135 належить до класу рецепторів факторів росту, залучених до раннього гемопоезу. Він є представником родини клітинних білків, які поєднують функції рецептора і внутрішньоклітинної тирозинкінази. Експресія рецептора Flt-3 відмічена на лімфоїдних, проте більш виражена на мієлоїдних клітинах-попередниках. В неактивному стані рецептор Flt-3 представлений у вигляді одиничних молекул. Взаємодія ліганда з рецептором викликає димеризацію двох одиничних молекул, і в цьому стані рецептор стає активним. Цей процес супроводжується фосфорилуванням тирозинових залишків тирозинкіназного домену ТК 2, що приводить до запуску каскаду реакцій (по Мар-кіназному шляху для Flt-3), результатом яких є експресія генів, що відповідають за проліферацію і диференціювання клітин.

Висновки

Призначенням Flt-3 є сприяння просуванню первісної популяції на наступні етапи розвитку, в результаті підвищується чутливість клітин до цитокінів, накопичуються функціонально активні нащадки



Вплив тривалості інкубації з Flt-3 на показники клоногенної активності AC133⁺ клітин кордової крові в умовах культивування *in vitro*: ■ – КУК; □ – КУО.

стовбурових клітин і, як наслідок, підвищується рівень колонієутворення в культурі *in vitro*.

Література

1. Гольдберг Е.Д., Дыгай А.М., Шахов В.П. Методы культуры ткани в гематологии.— Томск: Изд-во Томск. ун-та, 1992.— 264 с.
2. Патент України №16917U, МПК С12N 5/00, С12N 5/08. Спосіб культивування клітин кордової крові / Н.М. Білько, С.В. Василівська, Д.І. Білько, І.А. Вотякова, Р.В. Бойко. Опубл. 15.08.06. Бюл. №8.
3. Bilko N.M., Votyakova I.A., Vasylovska S.V., Bilko D.I. Characterization of the interaction between stromal and haematopoietic progenitor cells in expansion cell culture models // Cell Biol. Int.— 2005.— Vol. 29, N1.— P. 83–86.
4. Broxmeyer H.E., Srour E., Orschell C. et al. Cord blood stem and progenitor cells // Methods Enzymol.— 2006.— Vol. 419.— P. 439–473.
5. Yin A.H., Miraglia S., Zanjani E.D. et al. AC133, a novel marker for human hematopoietic stem and progenitor cells // Blood.— 1997.— Vol. 90, N12.— P. 5002–5012.

Надійшла 10.06.2008