

Функціональна активність гемопоетичних клітин-попередників кордової крові у довготривалій культурі на гідрогелевій підложці *in vitro*

Д.І. Білько¹, І.С. Дягіль²

¹Національний університет «Києво-Могилянська академія», Київ; e-mail: comraduk@yahoo.co.uk;

²ДУ «Національний науковий центр радіаційної медицини НАМН України», Київ

*Для збереження плюрипотентності стовбурових клітин у культурі необхідними є не тільки комплекс цитокінів, але й відповідна жорсткість підложки. Мета нашої роботи – дослідити функціональну активність гемопоетичних клітин-попередників кордової крові (КК) у процесі довготривалого культивування на м'якій підложці з поліакриламідного гелю за наявності комплексу цитокінів (інтерлейкіну-1, інтерлейкіну-6 і гранулоцитарно-макрофагального фактора), а також визначити переваги такого способу для подальшого використання при трансплантаціях. Для реалізації цієї мети були використані: метод довготривалого культивування *in vitro* на гідрогелевій підложці, спосіб колонієутворення у напіврідкому агарі, цитологічні методи досліджень, світлова і інвертована мікроскопія, статистичні методи досліджень. Завдяки використанню разом з комплексом цитокінів гідрогелевої підложки спостерігалася висока проліферативна активність гемопоетичних клітин, що відображалася в їх експансії протягом довготривалого культивування (5 тиж), а також у збереженні високих значень колонієутворюючої активності ($521,5 \pm 7,5$ колоній на $1 \cdot 10^5$ експлантованих клітин). Таким чином, експансія гемопоетичних стовбурових клітин та їх найближчих нащадків у культурі залежить від жорсткості підложки.*

*Ключові слова: гемопоетичні клітини-попередники; проліферація; колонієутворення; м'яка гідрогелева підложка; довготривала культура *in vitro*.*

ВСТУП

Інтенсивне вивчення питань регуляції кровотворення протягом 50 років призвело до розробки різних експериментальних систем, що дають змогу досліджувати проліферацію і диференціювання гемопоетичних стовбурових клітин і клітин-попередників у довготривалій культурі [1–3]. Розвиток нових і вдосконалення існуючих моделей тривалого культивування гемопоетичних стовбурових клітин і клітин-попередників кордової крові (КК) є одним з найважливіших напрямів у сучасній клітинній біології, пов'язаних з отриманням достатньої кількості кровотворної тканини для експериментального і клінічного застосування [4–6]. Нині існують два основних напрямки у вирішенні цього питання: експансія гемопоетичних клітин *in vitro* і транс-

плантація суміші ядровмісних клітин (ЯВК) із двох різних зразків КК. Проте при використанні двох трансплантатів часто виникає конкуренція між трансплантатами, яка заважає приживленню, викликаючи реакцію «трансплантат проти трансплантата» [1, 7]. Культуральні дослідження *in vitro* посідають у клітинній біології особливе місце. Спроби експансії примітивних клітин виявилися найбільш успішними для майбутньої трансплантації. В кінці 80-х років ХХ сторіччя групою вчених експериментально показано, що в одиниці об'єму КК міститься більша кількість гемопоетичних клітин-попередників відносно периферичної крові дорослого і приблизно еквівалентна одиниці об'єму кісткового мозку дорослої людини [1, 8]. Ці висновки простимулювали подальше

© Д.І. Білько, І.С. Дягіль

вивчення КК людини як потенційного матеріалу для клінічного застосування як гемопоетичну тканину [8].

Головним підходом у дослідженнях, спрямованих на експансію гемопоетичної стовбурової клітини людини *in vitro* є підбір культурального мікросередовища, насамперед через додавання рекомбінантних цитокінів. У різних лабораторіях світу досягнуто певних успіхів у цьому напрямку, однак протоколи експансії, комбінації використовуваних у них цитокінів і факторів росту, а також їх концентрації різняться і зазвичай не розкриваються [9–11]. Останнім часом з'явилися публікації про не менше значення у вирощуванні клітин м'якої підложки, яка покращує результати культивування [12–14]. Поліакриламідний гель у відповідній концентрації використовується як підложка, що підтримує плюрипотентність клітин. Це було доведено на культурі лінії ембріональних стовбурових клітин (ЕСК) [12, 15]. Культивування ембріональних стовбурових клітин на різних за консистенцією підложках з поліакриламідного гелю переконливо свідчило про роль жорсткості субстрата у самопідтримці ЕСК [1, 16]. Пояснення цього факту лежить в основі біофізичних взаємодій. Висока сила зчеплення клітинно-матричного комплексу покращує диференціювання, водночас низькі клітинні сили зчеплення відповідають за самопідтримку і плюрипотентність взаємодії [17, 18].

Метою нашого дослідження була розробка умов експансії гемопоетичних клітин-попередників КК з використанням моделі довготривалого культивування на м'якій підложці з поліакриламідного гелю.

МЕТОДИКА

Зразки КК від здорових породіль без патології вагітності було отримано в пологових відділеннях медичних установ м. Київ, акредитованих на цю діяльність. КК забирали на основі інформованої письмової згоди жінки

на надання матеріалу для дослідницьких цілей. Її збирали у стерильні конічні пробірки об'ємом 15 мл, що містили натрієву сіль гепарину («Белмедпрепарат», Білорусь) без консервантів у кінцевій концентрації 20 Од/мл. Матеріал до місця подальшої обробки транспортували при температурі талого льоду. Час від здійснення забору КК до початку досліджень не перевищував 4 год. Кількість ЯВК у отриманих суспензіях визначали за загальноприйнятим методом підрахунку мононуклеарів під інвертованим мікроскопом з використанням камери Горяєва.

Для отримання фракції мононуклеарів КК застосовували гістопак щільністю 1,077 г/мл («Sigma», США). Ефективність застосування методу оцінювали за кількістю виділених ЯВК і кількістю клоногенних попередників гранулоцитарно-макрофагального ряду в агаровій культурі.

КК, розведену 1:1 фосфатно-буфурним розчином, нашаровували на розчин гістобака у співвідношенні 2:1 і центрифугували при швидкості 430g протягом 30 хв у стандартних умовах, тричі відмивали і виділяли суспензію ЯВК. Готували цитопрепарати з використанням цитоцентрифуги Cytospin-3 («Shandon», Великобританія) і забарвлювали за Паппенгеймом.

Гемопоетичні клітини КК культивували *in vitro*. Фракцію мононуклеарів КК, виділену методом центрифугування в градієнті гістобака, розводили повним культуральним середовищем DMEM («Gibco», Німеччина), яке містило 20%-у фетальну телячу сироватку, 1%-й L-глутамін, 25 Од/мл канаміцину. У повне живильне середовище додавали комбінацію цитокінів і факторів росту в таких концентраціях: 50 нг/мл рекомбінантного інтерлейкіну-3 людини; 20 нг/мл рекомбінантного інтерлейкіну-6 людини; 20 нг/мл гранулоцитарно-макрофагального фактора. Препарати були фірми «Sigma» (США) [19, 20].

Клітинні суспензії у концентрації $1 \cdot 10^5$ /мл переносили в шестилункові пластикові матраци («Nunc», Німеччина). Кожні 72 год

замінювали половину супернатанту свіжим середовищем. Культивування проводили в CO₂-інкубаторі («LEEC», Великобританія) при 5% CO₂, 37°C і абсолютній вологості протягом 5 тиж [6].

Гелеві пластини формували з компонентів поліакриламідного гелю у визначених пропорціях [18]. Відомо, що гідрогелі після полімеризації залишаються токсичними за наявності складових, що не прореагували. Щоб позбутися токсичності гелеві пластини, які виштамповували за розміром лунки планшета, переносили у флакони об'ємом 500 мл з 0,85%-м розчином NaCl. Наступним кроком була стерилізація пластин, які занурювали у 45%-й розчин етанолу (у такому стані пластини можуть перебувати до 5 років). За добу до експерименту пластини у необхідній кількості, згідно з завданням експерименту, занурювали у флакон об'ємом 500 мл з стерильним 0,85%-м розчином NaCl для відмивки. Через 24 год їх укладали на дно лунок планшета.

Оцінювали кількість ЯВК і клоногенну активність на етапах культивування (1-, 2-, 3- і 5-й тиждень); визначали колонієутворюючу здатність за методом Pluznik і співавт. [4, 6]. у модифікації з використанням напіврідкого агарового середовища (агар «Difco» 0,33%). Суть методу культивування у м'якому агарі «Difco» полягає в тому, що при експлантації суспензії кровотворних клітин у строго визначених умовах, за наявності колонієстимулюючого чинника, в агарі, протягом 12–14 днів, формуються колонії-клони, кількість яких дає змогу визначити вміст клітин-попередників гранулоцитарно-макрофагального ряду [10].

Досліджувану суспензію клітин мононуклеарної фракції КК переносили у живильному середовищі з 20 нг/мл гранулоцитарно-макрофагального фактору («Sigma», США) у планшети («Nunc», Німеччина) діаметром 35,0 мм таким чином, щоб концентрація клітин для мононуклеарної фракції КК становила 1·10⁵ клітин на лунку. Всі

маніпуляції виконували із строгим дотриманням правил асептики у стерильній камері з ламінарним потоком повітря («LEEC», Великобританія). Після застигання агару планшети переносили у CO₂-інкубатор і культивували при 37°C в умовах 100%-ї вологості з 5% CO₂. На 14-й день культивування підраховували кількість колоній і кластерів. За колонію приймали клітинні агрегати, які нараховували 40 і більше клітин, за кластери – менше ніж 40 клітин. Розрізняли колонії трьох типів: компактні, компактні з «вінчиком» і дифузні. Колонії, які формувалися в агарі, вважали гранулоцитарно-макрофагальними колонієутворюючими одиницям (КУО-ГМ), а кластери – кластероутворюючими одиницями (КЛУО-ГМ).

Оскільки отримані результати підпорядковувалися закону нормального розподілу, всі розрахунки з визначення вірогідності проводили за допомогою критерію t Стьюдента ($P \leq 0,05$). Обробку результатів здійснювали у програмі Microsoft Excel 2010.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Гемопоетичні клітини-попередники, виділені з КК у градієнті щільності гістопака 1,077 г/мл, культивували у суспензійній культурі *in vitro* на гідрогелевих підложках. На кожному етапі експерименту, а саме, на 1-, 2-, 3- і 5-му тижнях, оцінювали зміни середніх кількостей ЯВК у лунках планшета і визначали їх клоногенну активність у напіврідкому агарі. Кількості ЯВК і гемопоетичних попередників, отримані на кожному етапі культивування, порівнювали між собою, а також зі значеннями для вихідної суспензії (рис. 1).

На початку культивування у кожен лунку планшета вносили 1·10⁵ клітин для суспензійної культури і таку саму кількість клітин для культури з напіврідким агаром. Визначали вихідну колонієутворюючу активність за наявністю гранулоцитарно-макрофагального фактора в концентрації 20 нг/мл, яка становила 50,0 ± 2,5 колоній

на $1 \cdot 10^5$ експлантованих клітин. Надалі у кожний зазначений термін (1, 2, 3 і 5 тиж) підраховували кількість ЯВК і визначали колонієутворюючу активність КУО-ГМ.

Так, у зразках клітин, що культивувалися за відсутності комплексу цитокінів і підложки, кількість ЯВК через тиждень зменшувалася на половину і дорівнювала $0,5 \cdot 10^5$ клітин; після 2 тиж вона знижувалася до $0,3 \cdot 10^5$. Культивування цих клітин у напіврідкому агарі дало змогу отримати одиничні колонії; їх колонієутворююча активність КУО-ГМ дорівнювала $9,0 \pm 1,2$ на $1 \cdot 10^5$ експлантованих клітин. Кількість колоній I, II, III типів становила $0,20 \pm 0,03$, $3,3 \pm 0,6$ і $5,30 \pm 1,14$ відповідно. Збільшувалася і кількість кластерів. Так, КЛУО-ГМ сягали $28,80 \pm 6,47$, що є свідченням згасання гемопоезу.

Проте 1 тиж культивування з додаванням комплексу факторів дав змогу отримати у суспензійній культурі $5,5 \cdot 10^5$ клітин, а через 2 тиж – $10 \cdot 10^5$ клітин. Клоногенний аналіз клітин суспензійної культури за наявності суміші факторів через 2 тиж культивування показав, що КУО-ГМ дорівнювала $60,00 \pm 3,14$ колоній на $1 \cdot 10^5$ експлантованих клітин на тлі збільшення ЯВК, що достовірно вище, ніж у вихідному значенні цього показника. У культурах переважали компактні колонії I типу ($30,20 \pm 5,58$), вони становили приблизно 50% від загальної кількості всіх колоній.

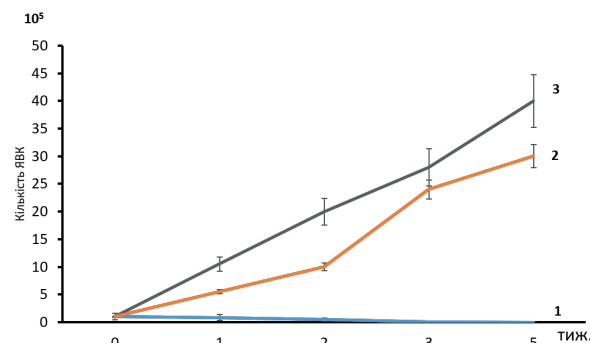


Рис. 1. Зміни кількості клітин кордової крові у суспензійній культурі *in vitro* на гідрогелевій підложці протягом 5 тиж: 1 – без факторів, 2 – з додаванням комплексу факторів, 3 – на підложці з гідрогелю з додаванням комплексу факторів

Кількість колоній II і III типу була на рівні $16,50 \pm 2,59$ і $14,30 \pm 3,21$ відповідно.

На наступному етапі ми культивували суспензію клітин КК на гідрогелевій підложці за наявності суміші факторів. Виявилось, що кількість ЯВК збільшувалася на 1-й тиждень до $10,5 \cdot 10^5$ і на 2-й – до $20 \cdot 10^5$. У двотижневий термін КУО-ГМ становили $72,0 \pm 2,8$ на $1 \cdot 10^5$ експлантованих клітин, що перевищувало значення, отримані у культурах з цитокінами ($60,0 \pm 3,2$; $P < 0,05$).

Через 3 тижні кількість ЯВК у культурі з додаванням комплексу факторів сягала $24,0 \cdot 10^5$ клітин, а у культурі на підложці разом з факторами – $28,0 \cdot 10^5$. Субкультивування цих клітин у напіврідкому агарі демонструвало зростанням показників колонієутворення. Так, колонієутворююча активність КУО-ГМ у культурі з комплексом факторів становила $150,0 \pm 10,5$, водночас на підложці з гідрогелю за наявності факторів у культурі вона сягала значень $200,0 \pm 11,8$ на $1 \cdot 10^5$ експлантованих клітин.

Через 5 тиж культивування кількість ЯВК у суспензійній культурі з факторами становила $30,0 \cdot 10^5$, а на гідрогелевих підложках за наявності факторів – $40,0 \cdot 10^5$ клітин. Кількість колоній, отриманих з суспензійної культури КК за наявності в ній комплексу цитокінів (без підложки) була $250,0 \pm 11,5$ на $1 \cdot 10^5$ експлантованих клітин. Натомість культивування на гідрогелевій підложці за наявності факторів призводило до росту колонієутворення вдвічі ($521,5 \pm 7,5$) на тлі збільшення кількості клітин у суспензійній культурі до $40 \cdot 10^5$ клітин, що достовірно вище, ніж при культивуванні з факторами без підложки (рис. 2).

Отже, використання при довготривалому культивуванні клітин КК цитокінового комплексу суттєво збільшувало кількість колонієутворюючих одиниць у культурі клітин *in vitro* порівняно з суспензійними культурами, в які не додавали ростових факторів (результати 2 тиж культивування) [19, 20]. У разі культивування суспензії

клітин за наявності комплексу цитокінів (інтерлейкіну-3, інтерлейкіну-6 і гранулоцитарно-макрофагального фактора) разом з укладанням м'якої гідрогелевої основи на дещо посуду значно збільшувало КУО-ГМ порівняно з культурами, збагаченими факторами. Тобто ефективність культивування на підложці з поліакриламідного геля з комплексом цитокінів на 5-й тиждень була вдвічі більшою, ніж у разі культивування на жорсткій основі (на денці лунки планшета) за наявності цитокінів ($521,5 \pm 7,5$ і $250,0 \pm 5,3$ відповідно з розрахунку на $1 \cdot 10^5$ експлантованих клітин).

Таким чином, у процесі культивування клітин КК *in vitro* на гідрогелевій підложці за наявності комплексу цитокінів, відбувається довготривала підтримка проліферативної активності гемопоетичних клітин, що відображається в їх експансії, а також збереженні високих значень КУО-ГМ. Спосіб збагачення мононуклеарів КК гемопоетичними клітинами-попередниками в результаті довготривалого культивування за наявності підложки і комплексу цитокінів, став таким, що створює оптимальні умови для проліферації клітин у клонах. Наші

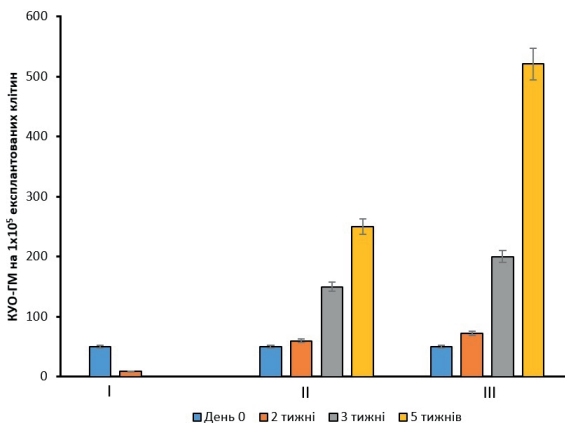


Рис. 2. Колонієутворююча здатність гемопоетичних клітин з кордової крові в культурі *in vitro* впродовж довготривалого культивування: I – без факторів, II – з додаванням комплексу факторів, III – на підложці з гідрогелю з додаванням комплексу факторів. 1 – вихідний стан, 2 – 2 тиж, 3 – 3 тиж, 4 – 5 тиж. Статистично значущі відмінності між групами на рівні $P \leq 0,05$

результати можуть слугувати основою для розробки протоколів експансії кровотворних клітин-попередників для отримання достатньої кількості кровотворної тканини для експериментального і клінічного застосування.

ВИСНОВКИ

У роботі експериментально обґрунтовано комплекс умов, потрібних для підтримки тривалого кровотворення у системі *in vitro*, що дає змогу збагатити популяцію клітин КК кровотворними клітинами-попередниками із збереженням високих показників їх функціональної активності. Так, комбінація інтерлейкіну-3, інтерлейкіну-6 і гранулоцитарно-макрофагального фактора при додаванні у культуру забезпечує отримання значної кількості КУО-ГМ із високим ступенем функціональної активності ($250,0 \pm 5,3$ колоній на 10^5 експлантованих клітин). Завдяки використанню разом з комплексом цитокінів гідрогелевої підложки досягнута підтримка проліферативної активності гемопоетичних клітин, що відображається в їх експансії протягом довготривалого культивування (5 тиж), а також у високих показниках колонієутворюючої активності ($521,5 \pm 7,5$ колоній на 10^5 експлантованих клітин). У результаті проведених досліджень доведено, що плюрипотентність стовбурових клітин залежить не тільки від комплексу живильного середовища, цитокінів і добавок, а й від ступеня жорсткості субстрату, на якому культивуються клітини.

Робота виконувалася в рамках фінансування дослідницького проекту у Національному університеті «Києво-Могилянська академія», № держреєстрації 0109U000441.

The authors of this study confirm that the research and publication of the results were not associated with any conflicts regarding commercial or financial relations, relations with organizations

and/or individuals who may have been related to the study, and interrelations of co-authors of the article.

D.I. Bilko¹, I.S. Dyagil²

FUNCTIONAL ACTIVITY OF HEMOPOIETIC PROGENITOR CELLS FROM CORD BLOOD IN LONG-TERM CULTURE ON HYDROGEL SUBSTRATE EX VIVO

¹National University of Kyiv-Mohyla Academy;

²SI National Research Center for Radiation Medicine of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine;
e-mail: comraduk@yahoo.co.uk

Development of new and improvement of existing models of long-term cultivation of hematopoietic stem cells (HSC) and cord blood progenitor cells is one of the most important directions in modern cell biology, related to obtaining a sufficient amount of hematopoietic tissue for experimental and clinical use. The aim of the work was to investigate the functional activity of hematopoietic progenitor cells from cord blood during long-term cultivation on a soft polyacrylamide gel substrate in the presence of a cytokine complex and to determine the advantages of this method of maintaining hematopoiesis for further use in transplantation. To realize this purpose, the following methods were used: the method of long-term cultivation *in vitro* on a hydrogel substrate, the method of colony formation in semi-liquid agar, cytological research methods, light and inverted microscopy, statistical research methods. Due to the use of the hydrogel substrate together with the cytokine complex, a high proliferative activity of hematopoietic cells is observed, which is reflected in their expansion during long-term cultivation (5 weeks), as well as of high colony-forming activity ($521.5 \pm 7.5 \cdot 10^5$ per explanted cells). Thus, the stiffness of the substrate must be taken into account for the expansion of stem cells and their immediate descendants. The presence of a soft substrate made of polyacrylamide gel along with a complex of cytokines ensures the expansion of hematopoietic cells due to the long-term support of hematopoiesis.

Key words: hematopoietic progenitor cells; proliferation; colony formation; hydrogel substrate; long-term culture *in vitro*.

REFERENCES

1. Bilko DI, Chaikovskiy YuB. The role of substrate stiffness in maintaining pluripotency of embryonic stem cells *in vitro* culture. *Fiziol Zh.* 2021;67(3):27-34. [Ukrainian].
2. Nakahata T, Ogawa M. Hemopoietic colony forming cells in umbilical cord blood with extensive capability to generate mono- and multipotential hemopoietic progenitors. *Clin Invest.* 1982;70:1324-8.
3. Zhang J, Yang C, Chen J, Luo M, Qu Y, Mu D, Chen Q. Umbilical cord mesenchymal stem cells and umbilical cord blood mononuclear cells improve neonatal rat memory after hypoxia-ischemia. *Behav Brain Res.* 2019 Apr 19;362:56-63.
4. De Wynter E, Ploemacher RE. Assays for the assessment of human hematopoietic stem cells. *J Biol Regul Homeost Agents.* 2001;15(1):23-7.
5. Majeti R, Park CY, Weissman IL. Identification of a hierarchy of multipotent hematopoietic progenitors in human cord blood. *Cell Stem Cell.* 2007;131:635-45.
6. Bilko N, Votjakova I, Vasylovska S, Bilko D. Characterization of the interactions between stromal and haematopoietic progenitor cells in expansion cell culture models. *Cell Biol Int.* 2005 Jan;29(1):83-6.
7. Madlambayan GJ, Rogers I, Casper RF, Zandstra PW. Controlling culture dynamics for the expansion of hematopoietic stem cells. *J Hematother Stem Cell Res.* 2001;10:481-92.
8. Li X, Ma R, Gu Q, Liang L, Wang L, Zhang Y, et al. A fully defined static suspension culture system for large-scale human embryonic stem cell production. *Cell Death Dis.* 2018 Aug 30;9:892.
9. Kuchma MD, Kyrkyk VM, Svitina HM, Shablii YM, Lukash LL, Lobyntseva GS, Shablii VA. Comparative analysis of the hematopoietic progenitor cells from placenta, cord blood and fetal liver, based on their immunophenotype. *BioMed Res Int.* 2015;2015:418752.
10. Mayani H, Dragowska W, Lansdorp PM. Characterization of functionally distinct subpopulations of CD34⁺ cord blood cells in serum free long-term cultures supplemented with hematopoietic cytokines. *Blood.* 1993;82(9):2664-72.
11. Indumathi S, Harikrishnan R, Rajkumar JS, Dhanasekaran M. Immunophenotypic comparison of heterogenous non-sorted versus sorted mononuclear cells from human umbilical cord blood: a novel cell enrichment approach. *Cytotechnology.* 2013;1:107-14.
12. Chowdhury F, Li Y, Chui Poh Y, Tamaki T, Wang N, Tanaka T. Soft substrates promote homogeneous self-renewal of embryonic stem cells via downregulating cell matrix tractions. *PLoS One.* 2010 Dec 13;5(12):15655.
13. Gerardo H, Lima A, Carvalho J, Ramos JRD, Couceiro S, Travasso RDM, Pires das Neves R, Graos M. Soft culture substrates favor stem-like cellular phenotype and facilitate reprogramming of human mesenchymal stem/stromal cells (hMSCs) through mechanotransduction. *Sci Rep.* 2019 Jun 24;9(1):9086.
14. Congrains A, Bianco J, Rosa RG, Mancuso RI, Saad STO. 3D scaffolds to model the hematopoietic stem cell niche: Applications and perspectives. *Materials (Basel, Switzerland).* 2021 Jan;14(3):569.
15. Zhang P, Zhang C, Li J, Han J, Liu X, Yang H. The physical microenvironment of hematopoietic stem cells and its emerging roles in engineering applications. *Stem Cell Res Therapy.* 2019 Nov 19;10(1):327.
16. Goetzke R, Sechi A, De Laporte L, Neuss S, Wagner W. Why the impact of mechanical stimuli on stem

- cells remains a challenge. Cell Mol Life Sci. 2018 Sep;75(18):3297-312.
17. Bilko DI, inventor; Method of long-term cultivation of hematopoietic stem cells. Patent No. 146819. 2021 Mar 1.
18. Moore MAS. Cytokine and chemokine networks influencing stem cell proliferation, differentiation, and marrow homing. J Cell Biochem Suppl. 2002;38:29-38.
19. Laurenti E, Göttgens B. From hematopoietic stem cells to complex differentiation landscapes. Nature. 2018;553(7689):418-26.
20. Gluckman E. Cord blood transplantation. Biol Blood Marrow Transplant. 2006;12(8):808-12.

*Матеріал надійшов
до редакції 13.07.2022*