

Пахаренко М. В., Білько Д. І., Третяк Н. М.,
Стародуб Г. С., Лагоднюк І. Ю., Білько Н. М.

ФУНКЦІОНАЛЬНА АКТИВНІСТЬ КРОВОТВОРНИХ КЛІТИН-ПОПЕРЕДНИКІВ ПРИ МІЕЛОДИСПЛАСТИЧНОМУ СИНДРОМІ В УМОВАХ *IN VITRO*

Порушення функціональної активності кісткового мозку при мієлодиспластичному синдромі (МДС) є наслідком генетичної трансформації плюрипотентної стовбурової клітини, яка супроводжується мультилінійною цитопенією. Оцінка колонієутворюючої здатності гемопоетичних клітин-попередників кісткового мозку в системі *in vitro* розкриває особливості їх функціонування. Метою роботи було визначення особливостей функціонального стану гемопоетичних клітин-попередників при мієлодиспластичному синдромі в культурі з напіврідким агаром. Було вивчено зразки кісткового мозку 15 пацієнтів з МДС РАНБ І у культуральних умовах *in vitro*. Пацієнти з МДС мали значно меншу кількість колоній у порівнянні з контролем – $5,1 \pm 2,3$ та $38,6 \pm 1,2$ на 1×10^5 експлантованих клітин відповідно. Здатність до кластероутворення теж була помітно зниженою – $9,2 \pm 2,1$ та $65,1 \pm 3,5$ на 1×10^5 експлантованих клітин відповідно. Серед інших агрегатів вирізнялися утворення фібробластоподібних клітин з гемопоетичними округлими клітинами на їхній поверхні. Було показано, що клітини кісткового мозку при мієлодиспластичному синдромі мають знижену здатність до колоніє- та кластероутворення, а деякі утворені клітинні агрегати вирізняються неправильною формою та наявністю фібробластоподібних клітин у їхньому складі.

Ключові слова: мієлодиспластичний синдром, гемопоез, культура *in vitro*, колонієутворюючі одиниці, стовбурова клітина.

Вступ

Мієлодиспластичний синдром (МДС) – гетерогенна група клональних захворювань системи крові, які виникають унаслідок мутації гемопоетичної стовбурової клітини або її клітин-попередників. Диференціювання нащадків такої трансформованої стовбурової клітини призводить до неефективного дозрівання клітин мієлоїдного паростка, диспластичних змін у кістковому мозку (КМ) та високої ймовірності трансформації його в гостру мієлоїдну лейкемію (ГМЛ) [1]. За останніми даними, ризик виникнення МДС у молодого населення становить 5, а для людей похилого віку – 28 на 100 000 осіб [2].

На сьогодні достовірно відомо, що в основі виникнення МДС лежить ураження стовбурової клітини та її мікрооточення, але досі не визначено всіх деталей функціонування клітин-попередників у разі виникнення цієї злоякісної трансформації [3,4]. Водночас деякі дослідники чітко показали, що МДС є наслідком генетичних змін плюрипотентної стовбурової клітини, що, своєю чергою, провокує розвиток клітин-нащадків,

які мають здатність до активнішої проліферації порівняно з нормальними гемопоетичними клітинами. Проте досі залишається невизначеним механізм цієї неконтрольованої проліферації [5]. Саме тому вивчення особливостей розвитку гемопоетичних клітин-попередників при МДС дасть змогу поглибити знання щодо механізму трансформації МДС у ГМЛ.

Мета дослідження – визначення особливостей функціонального стану гемопоетичних клітин-попередників у культурі з напіврідким агаром у пацієнтів з МДС.

Матеріали та методи дослідження

Було досліджено 15 зразків КМ пацієнтів з мієлодиспластичним синдромом, а саме рефрактерною анемією з надлишком бластів І. Усі пацієнти підписували добровільну інформовану згоду на проведення дослідження. Середній вік хворих становив 66 років, серед них було 6 жінок та 9 чоловіків. Діагноз встановлювався на підставі клінічних даних та обов'язкових лабораторних досліджень відповідно до Міжнародної статистичної

класифікації захворювань 10-го перегляду (з уточненням від 2008 р.).

Кістковий мозок (КМ) отримували за допомогою стерильної пункції голкою Касирського та стерильним шприцом. 1 мл КМ вміщували в пробірку з 100 мкл середовища DMEM (Sigma, США) з 10 % гепарину. Матеріал транспортували за температури танучого льоду (0 °С).

За допомогою стерильного розчину PBS (Sigma, США) розводили кістковий мозок у співвідношенні 1:3, після чого нашаровували на Nystoraque (Gibco, США) з градієнтом щільності (1,077 г/мл) та центрифугували протягом 30 хв при 740 g. У результаті отримували мононуклеарну фракцію, яку відбирали у стерильну пробірку з 5 мл PBS (Sigma, США) та тричі центрифугували протягом 10 хв при 430 g. Підрахунок кількості клітин у суспензії проводили меланжерним методом у камері Горяєва з використанням інвертованого мікроскопа (Olympus СК-2, Японія) при збільшенні $\times 200$.

Культивування клітин *in vitro* в напіврідкому агарі проводили у 24-комірковому планшеті (Nunc, Німеччина). Суспензію для культивування підготовлювали на основі середовища DMEM (Sigma, США), яке містило 20 % фетальної телячої сироватки (Sigma, США), 100 мМоль L-глутаміну (Sigma, США), антибіотики пеніцилін/стрептоміцин (Gibco, USA) по 100 Од/мл, 3,3 % агару (Difco, США) та 50 нг/мл гранулоцитарно-макрофагального колоніестимулюючого фактора (PeproTech, USA). Суспензію клітин кісткового мозку додавали таким чином, щоб кінцева їх концентрація становила 1×10^5 мононуклеарів на лунку. Планшет вносили у CO₂-інкубатор (P Selecta, Іспанія) за 100 % умов вологості, 5 % CO₂ та температури 37 °С. Облік результатів проводили на 14-й день культивування.

Результати

Проаналізовано 15 зразків кісткового мозку пацієнтів із мієлодиспластичним синдромом, а саме рефрактерною анемією з надлишком бластів I, для виявлення їхніх культуральних особливостей в умовах *in vitro*.

Серед морфологічних типів колоній-клонів у культурі вирізняли компактні, компактні з «вінчиком» та дифузні. Перший тип характеризувався компактним розміщенням клітин відносно одна одної в агрегаті. Другий – наявністю центрального скупчення морфологічно неоднорідних клітин у колонії та так званім «вінчиком» навколо неї. Третій тип колоній вирізнявся дифузним типом розміщення клітин.

У пацієнтів із МДС РАНБ I колонієутворююча здатність кісткового мозку виявилася зниженою – $5,1 \pm 2,3$ у порівнянні з нормою, яка дорівнювала $38,6 \pm 1,2$ на 1×10^5 експлантованих клітин. Різниця статистично достовірна, $p < 0,05$. Визначали компактні ($1,0 \pm 0,2$), компактні з «вінчиком» ($3,0 \pm 1,2$) та дифузні ($2,0 \pm 1,1$) колонії на 1×10^5 експлантованих клітин (рис. 1).

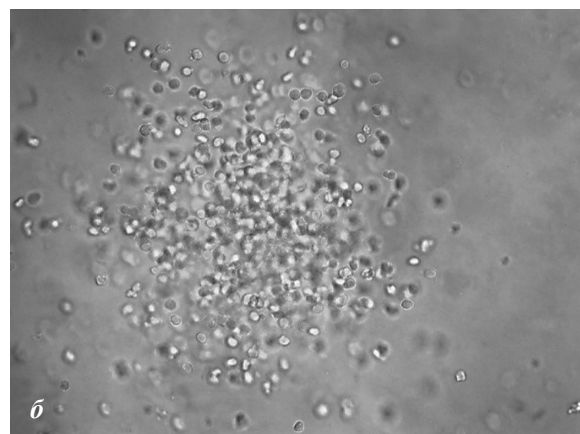
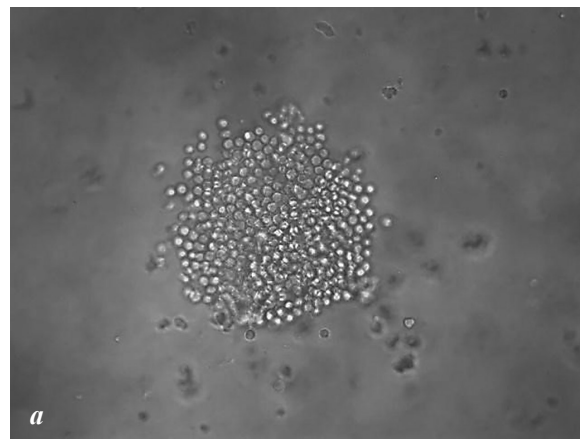


Рис. 1. Колонії гемопоетичних клітин-попередників у культурі з напіврідким агаром кісткового мозку при МДС: *a* – компактного типу; *б* – компактна з «вінчиком»; *в* – дифузного типу. 14 день культивування. Інвертований мікроскоп. Збільшення: *a, б* – $\times 200$, *в* – $\times 100$

Щодо кластероутворення виявилось, що їхня кількість була значно зниженою в порівнянні з нормою і дорівнювала $9,2 \pm 2,1$ та $65,1 \pm 3,5$ на 1×10^5 експлантованих клітин відповідно (рис. 2).

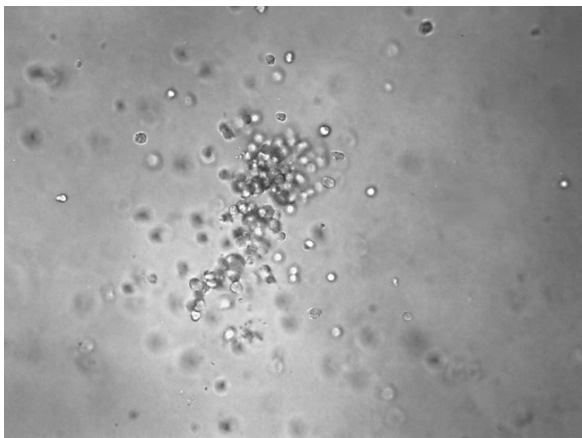


Рис. 2. Кластер гемопоетичних клітин-попередників у культурі з напіврідким агаром кісткового мозку при МДС, 14 день культивування. Інвертований мікроскоп. Збільшення $\times 200$

Також було помічено, що деякі з отриманих агрегатів характеризувалися морфологічними особливостями, зокрема, деякі клітини у їхньому складі мали фібробластоподібну форму, над ними розміщувалися гемопоетичні клітини округлої форми (рис. 3). Такі колонії в невеликій кількості ($1,0 \pm 0,1$ на 1×10^5 експлантованих клітин) спостерігалися в культивованих зразках кісткового мозку всіх пацієнтів.



Рис. 3. Колонія фібробластоподібних клітин у культурі з напіврідким агаром кісткового мозку при МДС на 14-й день культивування. Інвертований мікроскоп. Збільшення $\times 200$

Обговорення

Оскільки досі не з'ясованим залишається механізм трансформації клітин-попередниць у лейкемічну клітину при МДС, було проведено дослідження поведінки гемопоетичних клітин-попередників у культурі *in vitro* як із прогностичною метою, так і для з'ясування ролі ГСК у мієлопроліферативному процесі [6]. Трансформація плюрипотентної стовбурової клітини, яка на рівні попередників характеризується низькою колонієутворюючою і кластероутворюючою здатністю КМ при МДС, є однією з причин неефективного гемопоезу, який супроводжується цитопенією за всіма гілками кровотворення. Окремими дослідженнями показано пригнічення колонієутворення в культурі при МДС зі збереженням кластероутворюючої функції [7]. Наразі однозначно визначеним є факт, що при МДС пригнічується функція як самих клітин-попередниць гемопоезу, так і їхнього мікрооточення [8,9]. Саме з цими умовами пов'язують знижену здатність до росту в культурі з напіврідкого агару гемопоетичних клітин-попередників кісткового мозку.

За останніми даними, пацієнтів із МДС розділяють на дві категорії – з високим та низьким ризиком переходу в гостру мієлоїдну лейкемію [10]. За нашими спостереженнями, підвищена кількість колонієутворюючих одиниць супроводжується змінами в морфології клітин, які формують клони. Цей процес відображається на рівні морфологічно ідентифікованих клітин порушеннями в процесах диференціювання, що виражається у збільшенні кількості бластних форм у мієлограмі пацієнтів.

Для підтвердження отриманих нами даних у подальшому потрібно провести довготривале культивування клітин-попередників гемопоезу, оскільки воно дає змогу спостерігати за поведінкою останніх протягом певного періоду часу та оцінити особливості їх росту та розвитку [10,11].

Висновки

Було показано, що клітини кісткового мозку при МДС мають знижену здатність до колонієта кластероутворення, а деякі утворені клітинні агрегати вирізняються неправильною формою та наявністю фібробластоподібних клітин у їхньому складі. Причина неефективного гемопоезу, що супроводжується цитопенією за всіма гілками кровотворення, може бути пов'язана з трансформацією гемопоетичної стовбурової клітини та її найближчих нащадків.

Список літератури

1. Flores-Figueroa E, Gutierrez-Espindola G, Guerrero-Rivera S, Pizzuto-Chavez J, Mayani H. Hematopoietic progenitor cells from patients with myelodysplastic syndromes: *in vitro* colony growth and long-term proliferation. *Leukemia research*. 1999 Apr;23:385–94.
2. Глузман ДФ, Скляренко ЛМ, Коваль СВ, Ивановская ТС, Завелевич МП, Фильченков АА, Полищук АС, Родионова НК. Современная классификация и диагностика миелодиспластических синдромов. Киев: Інтерсервіс; 2018. 152 с.
3. Pang Y, Deng C, Geng S, Weng J, Lai P, Liao P, Zeng L, et al. Premature exhaustion of mesenchymal stromal cells from myelodysplastic syndrome patients. *Am J Transl Res*. 2017 Jul;9:3462–8.
4. Li AJ, Calvi LM. The microenvironment in myelodysplastic syndromes: niche-mediated disease initiation and progression. *Experimental Hematology*. 2017 Aug;55:3–18.
5. Shastri A, Will B, Steidl U, Verma A. Stem and progenitor cell alterations in myelodysplastic syndromes. *Blood*. 2017 Mar;129(12):1586–94.
6. Li B, Liu J, Qu S, Gale RP, Song Z. Colony-forming unit cell (CFU-C) assays at diagnosis: CFU-G/M cluster predicts overall survival in myelodysplastic syndrome patients independently of IPSS-R. *Oncotarget*. 2016 Sep;7:68023–32.
7. Kida J, Tsujioka T, Suemori S, Okamoto S, Sakakibara K, Takahata T, Yamauchi T, et al. An MDS-derived cell line and a series of its sublines serve as an *in vitro* model for the leukemic evolution of MDS. *Leukemia*. 2018 Aug;32:846–1850.
8. Abbas S, Kini A, Srivastava VM, Abbas S, Kini A, Srivastava VM, M MT, Nair SC, Abraham A, Mathews V, et al. Coexistence of aberrant hematopoietic and stromal elements in myelodysplastic syndromes. *Blood Cells Mol Dis*. 2017 Jul;66:37–46.
9. Braham MVJ, Li Yim ASP, Garcia Mateos J, Minnema MC, Dhert WJA, Öner FC, Robin C, et al. A Human Hematopoietic Niche Model Supporting Hematopoietic Stem and Progenitor Cells *In Vitro*. *Adv. Healthcare Mater*. 2019 May;8(10):e1801444.
10. Folkerts H, Hazenberg C, Houwerzijl E, van den Heuvel F, Mulder A, van der Want J, Vellenga E. Erythroid progenitors from patients with low-risk myelodysplastic syndromes are dependent on the surrounding microenvironment for their survival. *Experimental Hematology*. 2015 Mar;43(3):215–22.
11. Will B, Zhou L, Vogler TO, Ben-Neriah S, Schinke C, Tamari R, Yu Yi, et al. Stem and progenitor cells in myelodysplastic syndromes show aberrant stage-specific expansion and harbor genetic and epigenetic alterations. *Blood*. 2012 Sep;120(10):2076–86.

References

1. Flores-Figueroa E, Gutierrez-Espindola G, Guerrero-Rivera S, Pizzuto-Chavez J, Mayani H. Hematopoietic progenitor cells from patients with myelodysplastic syndromes: *in vitro* colony growth and long-term proliferation. *Leukemia research*. 1999 Apr;23:385–94.
2. Gluzman DF, Sklyarenko LM, Koval SV, Ivanovskaya TS, Zavelevich MP, Filchenkov AA, Polischuk AS, Rodionova NK. Modern classification and diagnosis of myelodysplastic syndromes. Kyiv: Interservis; 2018. 152 p. Russian.
3. Pang Y, Deng C, Geng S, Weng J, Lai P, Liao P, Zeng L, et al. Premature exhaustion of mesenchymal stromal cells from myelodysplastic syndrome patients. *Am J Transl Res*. 2017 Jul;9:3462–8.
4. Li AJ, Calvi LM. The microenvironment in myelodysplastic syndromes: niche-mediated disease initiation and progression. *Experimental Hematology*. 2017 Aug;55:3–18.
5. Shastri A, Will B, Steidl U, Verma A. Stem and progenitor cell alterations in myelodysplastic syndromes. *Blood*. 2017 Mar;129(12):1586–94.
6. Li B, Liu J, Qu S, Gale RP, Song Z. Colony-forming unit cell (CFU-C) assays at diagnosis: CFU-G/M cluster predicts overall survival in myelodysplastic syndrome patients independently of IPSS-R. *Oncotarget*. 2016 Sep;7:68023–32.
7. Kida J, Tsujioka T, Suemori S, Okamoto S, Sakakibara K, Takahata T, Yamauchi T, et al. An MDS-derived cell line and a series of its sublines serve as an *in vitro* model for the leukemic evolution of MDS. *Leukemia*. 2018 Aug;32:846–1850.
8. Abbas S, Kini A, Srivastava VM, Abbas S, Kini A, Srivastava VM, M MT, Nair SC, Abraham A, Mathews V, et al. Coexistence of aberrant hematopoietic and stromal elements in myelodysplastic syndromes. *Blood Cells Mol Dis*. 2017 Jul;66:37–46.
9. Braham MVJ, Li Yim ASP, Garcia Mateos J, Minnema MC, Dhert WJA, Öner FC, Robin C, et al. A Human Hematopoietic Niche Model Supporting Hematopoietic Stem and Progenitor Cells *In Vitro*. *Adv. Healthcare Mater*. 2019 May;8(10):e1801444.
10. Folkerts H, Hazenberg C, Houwerzijl E, van den Heuvel F, Mulder A, van der Want J, Vellenga E. Erythroid progenitors from patients with low-risk myelodysplastic syndromes are dependent on the surrounding microenvironment for their survival. *Experimental Hematology*. 2015 Mar;43(3):215–22.
11. Will B, Zhou L, Vogler TO, Ben-Neriah S, Schinke C, Tamari R, Yu Yi, et al. Stem and progenitor cells in myelodysplastic syndromes show aberrant stage-specific expansion and harbor genetic and epigenetic alterations. *Blood*. 2012 Sep;120(10):2076–86.

M. Pakharenko, D. Bilko, N. Tretiak, H. Starodub, I. Lahodniuk, N. Bilko

FUNCTIONAL ACTIVITY OF HEMATOPOIETIC PROGENITOR CELLS IN MYELODYPLASTIC SYNDROME *IN VITRO*

Myelodysplastic syndrome (MDS) is a heterogeneous group of blood system clonal diseases, which leads to dysplastic changes in the bone marrow and ineffective hematopoiesis. Impaired bone marrow functional activity in myelodysplastic syndrome is a consequence of a genetic transformation of a pluripotent stem cell, accompanied by multilineal cytopenia. Evaluation of the colony-forming ability of hematopoietic bone marrow progenitor cells in the *in vitro* system reveals the peculiarities of their functioning. The aim of the study was to determine the features of the functional conditions of hematopoietic progenitor cells (HPC) in myelodysplastic syndrome in a culture with the semi-solid agar. Bone marrow samples of 15 patients with myelodysplastic syndrome, namely refractory anemia with an excess of blasts 1 were cultured in DMEM medium with 20 % FBS, 1 % of antibiotics

(penicillin / streptomycin) and L-glutamine and 50 ng/ml GM-CSF in the semi-solid agar for 14 days under 100 % humidity, 5 % CO₂ and 37 °C. The behavior of hematopoietic progenitor cells *in vitro* was investigated, both for prognostic purposes and to elucidate the role of HPC in the myeloproliferative process. Patients with myelodysplastic syndrome had a significantly lower number of colonies compared with the control – 5.1±2.3 and 38.6±1.2 per 1×10⁵ of explanted cells, respectively. Compact, compact with a “circlet” and diffuse types of colonies were distinguished in the culture. The ability to cluster formation was also significantly reduced – 9.2±2.1 and 65.1±3.5 per 1×10⁵ of explanted cells, respectively. Among other aggregates, the formation of fibroblast-like cells with hematopoietic rounded cells on their surface was distinguished (1.0±0.1 per 1×10⁵ of explanted cells). It was shown that bone marrow cells of people with myelodysplastic syndrome have a reduced ability to colony and cluster formation, and some cell aggregates are characterized by an irregular shape and the presence of fibroblast-like cells in their composition. The ineffective hematopoiesis can be caused by a transformation of the hematopoietic stem cell and its posterity.

Keywords: myelodysplastic syndrome; hematopoiesis; *in vitro* culture; colony forming units; stem cell.

Матеріал надійшов 15.04.2020