

DOI: 10.18523/2617-4529.2024.7.36-41

УДК 612.119+57.086.833.4+616.411

Пахаренко М. В., Руссу І. З., Білько Д. І., Лагоднюк І. Ю., Білько Н. М.  
Національний університет «Києво-Могилянська академія» (НаУКМА), Київ, Україна

## ОСОБЛИВОСТІ ВПЛИВУ РЕКОМБІНАНТНИХ ЦИТОКІНІВ НА ФУНКЦІОНАЛЬНУ АКТИВНІСТЬ ГЕМОПОЕТИЧНИХ КЛІТИН-ПОПЕРЕДНИКІВ ПРИ МІЄЛОДИСПЛАСТИЧНОМУ СИНДРОМІ *IN VITRO*

Популяції гемопоетичних клітин-попередників є найближчими нащадками стовбурових клітин. Саме на рівні цих клітин (гемопоетичних клітин-попередників) відбувається реалізація процесів проліферації та диференціювання. На відміну від стовбурових клітин, вони чутливі до дії цитокінів, які викликаються у разі нестачі клітин крові на периферії. Проте довгий час роль гемопоетичних клітин-попередників у реалізації патологічного процесу при порушеннях гемопоезу було недооцінено, вона виявилася вагомішою, ніж вважали раніше. Особливо це стосується мієлодиспластичного синдрому, який, незважаючи на назву, є клональним захворюванням, яке передують гострій лейкемії. Метою дослідження було визначення особливостей функціонування гемопоетичних клітин-попередників у нормі і порушеннях гемопоезу на ініціальних етапах злоякісного процесу МДС (МДС-ІВ) в умовах дії різних концентрацій цитокінів для оцінювання гемопоетичного потенціалу цих клітин. Вивчали їхню колонієутворювальну активність (КУО) пацієнтів двох груп – контрольної (10 осіб) і дослідної (20 осіб) у культурі *in vitro*. Виявилось, що КУО збільшується з підвищенням концентрації цитокінів і потребує вдвічі більшого стимулу у разі культивування гемопоетичних клітин від пацієнтів з МДС-ІВ. Оптимальною концентрацією в контролі для G-CSF, GM-CSF, IL-3 виявилася 20 нг/мл, а для клітин від пацієнтів з МДС-ІВ – 40 нг/мл. Доведено, що у разі використання комплексу цитокінів (GM-CSF, G-CSF, IL-3) колонієутворювальна здатність клітин-попередників від пацієнтів з МДС-ІВ значно зростає в порівнянні з такими показниками для цитокінів, що діяли окремо (28,7±3,2 до 18,3±1,8, 12,1±1,5 та 24,5±2,1 відповідно). У роботі розкрито прихований потенціал до проліферації клітин від пацієнтів з МДС-ІВ, що може бути використаним як в експериментальних дослідженнях, так і для створення протоколів лікування хворих на МДС в ініціальній стадії захворювання.

**Ключові слова:** мієлодиспластичний синдром, гемопоетичні клітини-попередники, рекомбінантні цитокіни, колонієутворювальна активність, культура *in vitro*.

### Вступ

Гемопоез ссавців – це складна ієрархічна система безперервного оновлення кровотворних клітин, що ґрунтується на збалансованості процесів їхнього утворення і руйнування. У дорослих організмах більшість стовбурових клітин перебувають у стані G0 фази клітинного циклу. Завдяки цьому вони є стійкішими до пошкоджень ДНК [1,2] та можуть довго зберігатися

в гемопоетичних нішах, активуючись лише у разі потреби проліферації [3]. Ця особливість «сплячих» стовбурових клітин дає можливість зберегти «золотий запас» для відновлення після різних стресів.

Окрім стовбурових клітин, в організмі існує й інша популяція – гемопоетичні клітини-попередники. Саме на їхньому рівні відбувається реалізація процесів проліферації та диференціювання,

адже вони чутливі до дії цитокінів, які викидаються у разі нестачі клітин крові в кровотоці [3]. Роль гемопоетичних клітин-попередників було недооцінено в реалізації патологічного процесу при порушеннях гемопоезу, вона виявилася вагомішою, ніж вважали раніше. На мієлодиспластичний синдром із надлишком бластів (МДС-ІВ) припадає 40 % випадків МДС [4]. Причину виникнення МДС остаточно не визначено, але можна з впевненістю сказати, що це клональне захворювання зі змінами, які сталися завдяки мутаціям, що призвели до цитогенетичних порушень і охоплюють відділ стовбурової клітини [5,6]. Проте єдиного погляду щодо ролі гемопоетичних клітин-попередників, найближчих нащадків стовбурової клітини, і прогностичної цінності клональних культуральних методів досліджень при мієлодиспластичному синдромі (МДС) немає [7]. Попри думку, що мієлодиспластичний синдром є «захворюванням стовбурових клітин», наразі немає вагомих доказів на підтримку цього твердження. Крім того, ступінь ураження клітин у стовбурово-клітинному компартменті при МДС залишається невідомим.

**Метою** дослідження було визначення особливостей функціонування гемопоетичних клітин-попередників у нормі і порушеннях гемопоезу на ініціальних етапах злоякісного процесу МДС (МДС-ІВ) в умовах дії різних концентрацій цитокінів для оцінювання гемопоетичного потенціалу цих клітин.

#### **Матеріали та методи дослідження**

Дослідження, представлені в роботі, спрямовано на визначення особливостей функціонування гемопоетичних клітин-попередників у нормі і порушеннях гемопоезу на ініціальних етапах злоякісного процесу – мієлодиспластичного синдрому (МДС). У роботі було проведено аналіз функціональної активності клітин-попередників 20 пацієнтів з МДС-ІВ (11 чоловіків і 9 жінок) у момент маніфестації процесу до лікування (дослідна група) і 10 осіб, у яких при стернальній діагностичній пункції не виявлено онкогематологічної патології (контрольна група). Діагноз встановлено відповідно до сучасної класифікації ВООЗ пухлин кровотворної і лімфоїдної тканин [8-10]. У дослідження було залучено тільки пацієнтів із вперше виявленим МДС.

Усі пацієнти дали інформовану згоду на використання свого матеріалу з дослідницькою метою відповідно до національних протоколів лікування та збору біологічного матеріалу під

час лікування. Діагностичну стернальну пункцію пацієнтам проводили медичні працівники Інституту гематології та трансфузіології НАМН України у період з 2018 по 2021 рік. Діагноз було встановлено на підставі обов'язкових лабораторних досліджень за міжнародною класифікацією хвороб (з уточненням від 2016 року).

Перед культивуванням проводили розрахунки кількості клітин для постановки експерименту у 24-лунковому планшеті. В одну лунку об'ємом 500 мкл вносили суспензію такого складу: живильне середовище DMEM, із 9 % FBS, 1 % L-глутаміну (2мМ) та з антибіотиками пеніциліном і стрептоміцином; ростові фактори згідно із завданнями експериментів і агар у концентрації 0,33 %; клітинна суспензія. Для достовірності отриманих результатів дослідження проводили у 3 повторах, тобто використовували 3 лунки. У пусті лунки по периметру вносили по 500 мкл розчину PBS для створення вологості. Культивування клітин кісткового мозку відбувалось у термостаті протягом 14 діб в умовах присутності 5 % вуглекислого газу, за абсолютної вологості і 37 °С.

#### **Результати**

Для визначення оптимальних концентрацій факторів росту гранулоцитарно-макрофагального (GM-CSF), гранулоцитарного (G-CSF) і інтерлейкіну-3 (IL-3) для культивування кісткового мозку спочатку дослідили кістковий мозок осіб контрольної групи. Культивування проводили з поступовим збільшенням концентрації цих трьох факторів. Мінімальною ефективною концентрацією вважали ту, за якої з'являлися перші агрегати гемопоетичних клітин. Ця концентрація становила 2,5 нг/мл на  $1 \times 10^5$  експлантованих клітин. За цієї концентрації кількість колоній (агрегатів понад 40 клітин) на 14-й день культивування становила  $6,0 \pm 1,2$ ,  $5,3 \pm 0,8$  і  $8,5 \pm 1,5$  для GM-CSF, G-CSF та IL-3, відповідно. Далі концентрацію факторів росту подвоювали до 5 нг/мл. Це призвело до значного зростання колонієутворення:  $12,0 \pm 2,5$ ,  $10,3 \pm 1,5$  і  $14,1 \pm 2,3$  колоній для GM-CSF, G-CSF та IL-3, відповідно. За концентрації 10 нг/мл кількість КУО-ГМ (колонієутворювальних одиниць гранулоцитарно-макрофагальних) становила  $22,1 \pm 2,8$ ,  $20,6 \pm 2,5$  і  $27,5 \pm 3,2$  для GM-CSF, G-CSF та IL-3, відповідно. Оптимальною концентрацією було визначено 20 нг/мл, за якої кількість колоній становила  $38,3 \pm 3,5$ ,  $34,0 \pm 4,3$  і  $42,5 \pm 5,4$  для GM-CSF, G-CSF та IL-3, відповідно (рисунок).

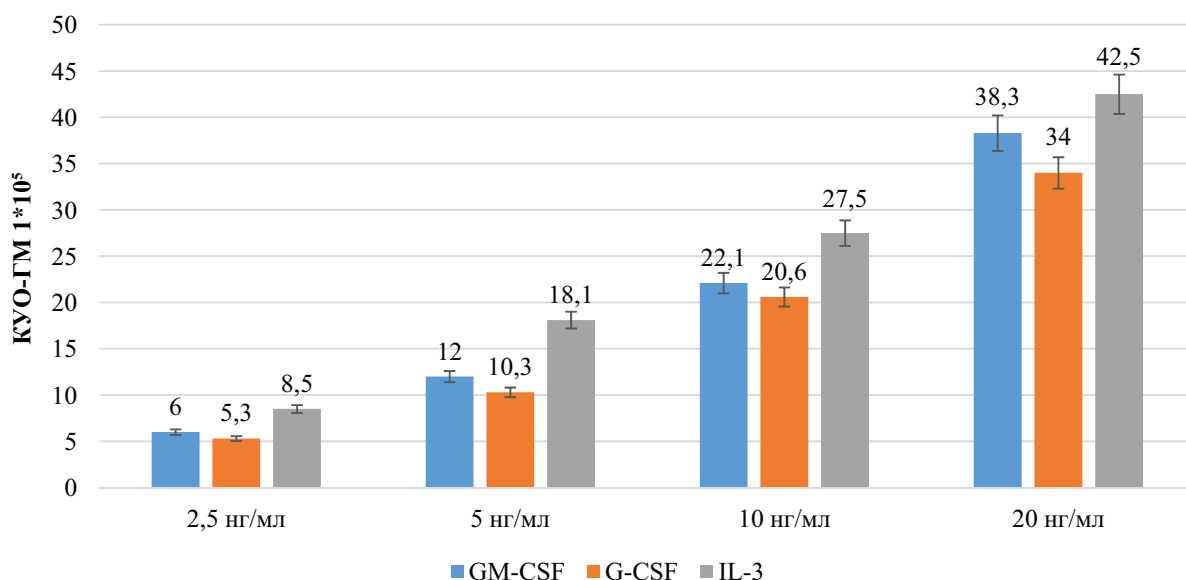


Рисунок. Ефективність колонієутворення ГПК *in vitro* зі зростанням доз цитокінів

Таблиця

Ефективність колонієутворення ГПК від МДС-ІВ за високих доз цитокінів та їхні комбінації в культурі *in vitro*

Назва цитокіну	Концентрація цитокіну, нг/мл	КУО-ГМ
GM-CSF	40	18,3±1,8*
G-CSF	40	12,1±1,5*
IL-3	40	24,5±2,1*
Комбінація GM-CSF + G-CSF + IL-3	кожний фактор	28,7±3,2*

\* Різниця між показниками статистично достовірна.

Наступним кроком стало дослідження впливу різних факторів росту та їхніх комбінацій на КУО-ГМ у 20 хворих на МДС-ІВ *in vitro*. Культури кісткового мозку цих пацієнтів у разі використання кожного з трьох факторів росту в їхніх оптимальних концентраціях демонстрували значне пригнічення кровотворної функції. Кількість КУО-ГМ становила  $4,0 \pm 0,5$ ,  $7,0 \pm 0,8$  і  $9,3 \pm 1,5$  на  $1 \times 10^5$  експлантованих клітин для GM-CSF, G-CSF та IL-3, відповідно. Важливо зазначити, що перші два фактори виявилися менш ефективними, ніж IL-3. Ця різниця була статистично достовірною ( $p \leq 0,05$ ).

Далі було проведено два типи експериментів: у першому концентрацію факторів росту подвоїли, а в другому їх використовували в комбінації. Виявилось, що у разі подвоєння концентрації факторів росту ефективність колонієутворення при МДС-ІВ значно зростала та становила  $18,3 \pm 1,8$ ,  $12,1 \pm 1,5$  і  $24,5 \pm 2,1$  для GM-CSF, G-CSF та IL-3, відповідно. Використання комплексу цитокінів призвело до утворення  $28,7 \pm 3,2$  КУО-ГМ, що статистично достовірно вище, ніж у разі

використання цитокінів окремо. Проте цей показник все ж не досяг значень контрольної групи (див. таблицю).

### Обговорення

У кістковому мозку проліферація та диференціювання гемопоетичних клітин контролюються кровотворним мікрооточенням. Це складне середовище, що складається з мезенхімальних стромальних клітин, а також адипоцитів, остеобластів, ендотеліальних і ретикулярних клітин та макрофагів [11]. Клітини, які формують гемопоетичні ніші, секретують безліч сигнальних молекул, що діють локально (аутокринно) або на відстані (паракринно). Ці сигнали включають ростові фактори, хемокіни, цитокіни, морфогени та молекули адгезії [12].

Як відомо, система кровотворення, ядром якої у дорослого організму є кістковий мозок, безперервно оновлює пул своїх клітин. Цей процес можливий завдяки наявності мультипотентних стовбурових клітин та їхніх нащадків – клітин-попередників. На відміну від стовбурових клітин,

які мають необмежену здатність до самовідтворення, гемопоетичні клітини-попередники мають меншу гнучкість. Їхня спеціалізація більш виражена, а здатність до самовідтворення обмежена, тож регуляція кровотворення здійснюється за допомогою ростових факторів, які продукуються мікрооточенням кісткового мозку [13,14].

Отримані нами дані свідчать про те, що при МДС відбувається порушення сприйняття стимулів гемопоетичними клітинами: знижується їхня чутливість до цитокінів. Проте здатність реагувати на них зберігається, що було продемонстровано *in vitro*. Ці результати дають змогу припустити, що гемопоетичні клітини-попередники відіграють важливу роль у патогенезі МДС. Це підтверджується здатністю гемопоетичних стовбурових клітин та клітин-попередників кісткового мозку реагувати на вплив цитокінів *in vitro*. Важливо

вказати, що проведене дослідження охоплює лише ранню стадію МДС (МДС-ІВ) і не дає інформації про подальші етапи захворювання. Проте воно демонструє, що за цієї форми МДС можна досягти певного терапевтичного ефекту, збільшуючи концентрацію цитокінів.

### Висновки

Зважаючи на те, що при мієлодиспластичному синдромі (МДС) гемопоетичні клітини-попередники мають дефектну пригнічену реакцію на цитокіни, але все ж таки здатні реагувати на підвищені дози препаратів, особливо в їхній комбінації, рекомендовано використовувати цей підхід під час дослідження МДС в експерименті. Крім того, дані, отримані в дослідженнях культури клітин *in vitro*, можна враховувати під час розроблення протоколів лікування.

### Список літератури

- Zhao M, Li L. Regulation of hematopoietic stem cells in the niche. *Sci China Life Sci.* 2015;58(12):1209-15.
- 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.
- Jahandideh B, Derakhshani M, Abbaszadeh H, Akbar Movassaghpour A, Mehdizadeh A, Talebi M, Yousefi M. The pro-inflammatory cytokines effects on mobilization, self-renewal and differentiation of hematopoietic stem cells. *Hum Immunol.* 2020;81(5):206-17.
- Tefferi A, Thiele J, Vardiman JW. The 2008 World Health Organization classification system for myeloproliferative neoplasms. *Cancer.* 2009;115(17):3842-7.
- Garcia Manero G, Chien KS, Montalban Bravo G. Myelodysplastic syndromes: 2021 update on diagnosis, risk stratification and management. *Am J Hematol.* 2020;95(11):1399-420.
- Gerke MB, Christodoulou I, Karantanos T. Definitions, Biology, and Current Therapeutic Landscape of Myelodysplastic/Myeloproliferative Neoplasms. *Cancers.* 2023;15(15):3815.
- Gondek LP, DeZern AE. Assessing clonal haematopoiesis: clinical burdens and benefits of diagnosing myelodysplastic syndrome precursor states. *Lancet Haematol.* 2020;7(1):e73-e81.
- Ackermann M, Liebhaber S, Klusmann J, Lachmann N. Lost in translation: pluripotent stem cell derived hematopoiesis. *EMBO Mol Med.* 2015;7(11):1388-402. doi:10.15252/emmm.201505301
- Anthony BA, Link DC. Regulation of hematopoietic stem cells by bone marrow stromal cells. *Trends Immunol.* 2014;35(1):32-7.
- Білько ДІ, Пахаренко МВ. Особливості функціонування гемопоетичних клітин-попередників кісткового мозку хворих на мієлодиспластичний синдром у культурі *in vitro* і в гелевих дифузійних камерах *in vivo*. *Наукові записки НаУКМА. Біологія і екологія.* 2022;5:33-8. doi:10.18523/2617-4529.2022.5.33-38
- Hernandez-Barrientos D, Pelayo R, Mayani H. The Hematopoietic Microenvironment: A Network of Niches for the Development of All Blood Cell Lineages. *J Leukoc Biol.* 2023;114(5):404-420.
- Hurwitz SN, Jung SK, Kurre P. Hematopoietic stem and progenitor cell signaling in the niche. *Leukemia.* 2020;34(12):3136-48.
- Mosaad YM. Hematopoietic stem cells: An overview. *Transfus Apher Sci.* 2014;51(3):68-82.
- Woolthuis CM, Park CY. Hematopoietic stem/progenitor cell commitment to the megakaryocyte lineage. *Blood.* 2016;127(10):1242-8.

### References

- Zhao M, Li L. Regulation of hematopoietic stem cells in the niche. *Sci China Life Sci.* 2015;58(12):1209-15.
- 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.
- Jahandideh B, Derakhshani M, Abbaszadeh H, Akbar Movassaghpour A, Mehdizadeh A, Talebi M, Yousefi M. The pro-inflammatory cytokines effects on mobilization, self-renewal and differentiation of hematopoietic stem cells. *Hum Immunol.* 2020;81(5):206-17.
- Tefferi A, Thiele J, Vardiman JW. The 2008 World Health Organization classification system for myeloproliferative neoplasms. *Cancer.* 2009;115(17):3842-7.
- Garcia Manero G, Chien KS, Montalban Bravo G. Myelodysplastic syndromes: 2021 update on diagnosis, risk stratification and management. *Am J Hematol.* 2020;95(11):1399-420.
- Gerke MB, Christodoulou I, Karantanos T. Definitions, Biology, and Current Therapeutic Landscape of Myelodysplastic/Myeloproliferative Neoplasms. *Cancers.* 2023;15(15):3815.
- Gondek LP, DeZern AE. Assessing clonal haematopoiesis: clinical burdens and benefits of diagnosing myelodysplastic syndrome precursor states. *Lancet Haematol.* 2020;7(1):e73-e81.
- Ackermann M, Liebhaber S, Klusmann J, Lachmann N. Lost in translation: pluripotent stem cell derived hematopoiesis. *EMBO Mol Med.* 2015;7(11):1388-402. doi:10.15252/emmm.201505301
- Anthony BA, Link DC. Regulation of hematopoietic stem cells by bone marrow stromal cells. *Trends Immunol.* 2014;35(1):32-7.
- Bilko D, Pakharenko M. Peculiarities of functioning of hematopoietic progenitor cells of bone marrow of patients with myelodysplastic syndrome in culture *in vitro* and in cell diffusion chambers *in vivo*. *NaUKMA Research Papers. Biology and Ecology.* 2022;5:33-8. doi:10.18523/2617-4529.2022.5.33-38. Ukrainian.

11. Hernandez-Barrientos D, Pelayo R, Mayani H. The Hematopoietic Microenvironment: A Network of Niches for the Development of All Blood Cell Lineages. *J Leukoc Biol.* 2023; 114(5):404-420.
12. Hurwitz SN, Jung SK, Kurre P. Hematopoietic stem and progenitor cell signaling in the niche. *Leukemia.* 2020;34(12): 3136-48.
13. Mosaad YM. Hematopoietic stem cells: An overview. *Transfus Apher Sci.* 2014;51(3):68-82.
14. Woolthuis CM, Park CY. Hematopoietic stem/progenitor cell commitment to the megakaryocyte lineage. *Blood.* 2016;127(10): 1242-8.

**M. Pakharenko, I. Russu, D. Bilko, I. Lahodniuk, N. Bilko**

National University of Kyiv-Mohyla Academy (NaUKMA), Kyiv, Ukraine

## **PECULIARITIES OF THE INFLUENCE OF RECOMBINANT CYTOKINES ON THE FUNCTIONAL ACTIVITY OF HEMATOPOIETIC PROGENITOR CELLS IN MYELODYSPLASTIC SYNDROME *IN VITRO***

### **Abstract**

Populations of hematopoietic progenitor cells are the closest descendants of stem cells. It is at their level that the processes of proliferation and differentiation occur, since they are sensitive, unlike stem cells, to the action of cytokines, which are released in the event of a shortage of blood cells in the periphery. However, for a long time the role of hematopoietic progenitor cells in the implementation of the pathological process in disorders of hematopoiesis was underestimated, while now it has turned out to be more significant than previously thought. This is especially true of myelodysplastic syndrome, which, despite its name, is a clonal disease that precedes acute leukemia. The purpose of the study was to determine the peculiarities of the functioning of hematopoietic progenitor cells in normal and impaired hematopoiesis at the initial stages of the malignant process of MDS (MDS-IB) under the conditions of exposure to different concentrations of cytokines to assess the hematopoietic potential of these cells. Their colony-forming activity (CFU) was studied in two groups of patients — control (10 people) and experimental (20 people) *in culture in vitro*. It was found that CFU increases with increasing concentration of cytokines and requires twice as much stimulus when culturing hematopoietic cells from patients with MDS-IB. The optimal concentration in the control for G-CSF, GM-CSF, IL-3 was 20 ng/ml, and for cells from patients with MDS-IB — 40 ng/ml. It has been proven that in the case of using a complex of cytokines (GM-CSF, G-CSF, IL-3), the colony-forming ability of progenitor cells from patients with MDS-IB increases significantly, compared to such indicators for cytokines acting alone ( $28.7 \pm 3.2$  to  $18.3 \pm 1.8$ ,  $12.1 \pm 1.5$  and  $24.5 \pm 2.1$ , respectively). The paper reveals the latent potential for cell proliferation from patients with MDS-IB, which can be used both in experimental studies and in the creation of protocols for the treatment of patients with MDS in the initial stage of the disease.

**Keywords:** myelodysplastic syndrome, hematopoietic progenitor cells, recombinant cytokines, colony-forming activity, *in vitro* culture.

*Матеріал надійшов 23.05.2024*

## Відомості про авторів

### Notes about authors

**Пахаренко Маргарита Вікторівна** – PhD, провідний спеціаліст, асистентка, ОНП «Лабораторна діагностика біологічних систем» Національного університету «Києво-Могилянська академія» (НаУКМА), Київ, Україна

**Pakharenko Marharyta** – PhD, Leading Specialist, Assistant, “Laboratory diagnostics of biological systems” program, National University of Kyiv-Mohyla Academy (NaUKMA), Kyiv, Ukraine

<https://orcid.org/0000-0003-2718-5116>

e-mail: m.pakharenko@ukma.edu.ua

**Руссу Ірина Зіновіївна** – кандидат біологічних наук, доцент, ОНП «Лабораторна діагностика біологічних систем» Національного університету «Києво-Могилянська академія» (НаУКМА), Київ, Україна

**Russu Iryna** – PhD, Assistant Professor, “Laboratory diagnostics of biological systems” program, National University of Kyiv-Mohyla Academy (NaUKMA), Kyiv, Ukraine

<https://orcid.org/0000-0001-9676-2859>

e-mail: iryna.russu@ukma.edu.ua

**Білько Денис Іванович** – кандидат біологічних наук, доцент, ОНП «Лабораторна діагностика біологічних систем» Національного університету «Києво-Могилянська академія» (НаУКМА), Київ, Україна

**Bilko Denys** – PhD, Assistant Professor, “Laboratory diagnostics of biological systems” program, National University of Kyiv-Mohyla Academy (NaUKMA), Kyiv, Ukraine

<https://orcid.org/0000-0001-6801-401X>

e-mail: denys.bilko@ukma.edu.ua

**Лагоднюк Ігор Юрійович** – аспірант ОНП «Лабораторна діагностика біологічних систем» Національного університету «Києво-Могилянська академія» (НаУКМА), Київ, Україна

**Lahodniuk Ihor** – graduate student of the “Laboratory diagnostics of biological systems” program, National University of Kyiv-Mohyla Academy (NaUKMA), Kyiv, Ukraine

<https://orcid.org/0000-0001-6865-8018>

e-mail: laigor777@gmail.com

**Білько Надія Михайлівна** – доктор медичних наук, професор, завідувачка кафедри, гарант ОНП «Лабораторна діагностика біологічних систем» Національного університету «Києво-Могилянська академія» (НаУКМА), Київ, Україна

**Bilko Nadiia** – M.D., Professor, Head of the department, guarantor of the “Laboratory diagnostics of biological systems” program, National University of Kyiv-Mohyla Academy (NaUKMA), Kyiv, Ukraine

<https://orcid.org/0000-0002-3213-0032>

e-mail: nbilko@ukma.edu.ua

