

## Роль фактора росту Flt-3 у регуляції проліферативної активності AC133<sup>+</sup> клітин кордової крові

Н.М. БІЛКО<sup>1</sup>, С.В. ВАСИЛОВСЬКА<sup>1</sup>, Д.І. БІЛКО<sup>1</sup>, І.А. ВОТЯКОВА<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Центр молекулярних і клітинних досліджень Національного університету "Києво-Могилянська академія"

<sup>2</sup>Медичний Центр тканинної і клітинної терапії "Ембріотек", м. Київ

### Role of Flt-3 Growth Factor in Regulating Proliferative Activity of AC133<sup>+</sup> Cord Blood Cells

N.M. BILKO<sup>1</sup>, S.V. VASILOVSKA<sup>1</sup>, D.I. BILKO<sup>1</sup>, I.A. VOTYAKOVA<sup>2</sup>

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

<sup>2</sup>Medical Center of Tissue and Cell Therapy "Embryotech", Kyiv, Ukraine

AC133<sup>+</sup> (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<sup>+</sup> клітин за даними різних авторів від 20 до 60 % випадків. В останні роки обговорюються перспективи клінічного застосування AC133<sup>+</sup> клітин замість CD34<sup>+</sup> клітин, адже саме їм притаманна здатність до довготривалої підтримки гемопоезу *in vitro*. Мета роботи – дослідження клоногенного потенціалу клітин фракції AC133<sup>+</sup> кордової крові в системі *in vitro* та визначення впливу інкубації з фактором росту Flt-3 на їх функціональні властивості.

Аналіз результатів культивування клітин AC133<sup>+</sup> 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<sup>+</sup> 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<sup>+</sup> 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<sup>+</sup> (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<sup>+</sup> cells from 20 to 60% cases, as reported by different authors. There have been recently discussed the perspectives of clinical application of AC133<sup>+</sup> cells instead of CD34<sup>+</sup>, 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<sup>+</sup> 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<sup>+</sup> 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 14<sup>th</sup> culturing day was  $31.4 \pm 8.18$ , meanwhile for clusters this index was  $17.76 \pm 3.82$ . 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  $66.69 \pm 19.07$ , 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<sup>+</sup> fraction cells up to  $212.5 \pm 24.95$ , 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<sup>+</sup> 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.