UNIWERSYTET JAGIELLOŃSKI COLLEGIUM MEDICUM WYDZIAŁ LEKARSKI

Małgorzata Stec

EKSPANSJA *EX VIVO* HEMATOPOETYCZNYCH KOMÓREK MACIERZYSTYCH ORAZ ICH RÓŻNICOWANIE DO MONOCYTÓW/MAKROFAGÓW

Rozprawa doktorska

Promotor: Prof. zw. dr hab. med. Marek Zembala

Katedra Immunologii Klinicznej i Transplantologii Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie Kierownik Katedry: Prof. zw. dr hab. med. Marek Zembala

KRAKÓW 2006

PRACA WYKONANA DZIĘKI WSPARCIU FINANSOWEMU KOMITETU BADAŃ NAUKOWYCH (PBZ KBN 083/PO5/2002)

Składam serdeczne podziękowania Prof. zw. dr hab. med. Markowi Zembali za wszechstronną pomoc i cenne uwagi wniesione w trakcie powstawania niniejszej pracy.

Ponadto dziękuję Koleżankom i Kolegom z Zakładu Immunologii Klinicznej oraz Zakładu Transplantologii za wskazówki merytoryczne oraz okazaną pomoc i życzliwość.

SPIS TREŚCI

| 1. Wstęp | strona 6 | | |
|---|-------------|--|--|
| 1.1. Ekspansja komórek układu krwiotwórczego w hodowlach <i>in vitro</i> | | | |
| 1.2. Rola cytokin w ekspansji | | | |
| 1.3. Komórki CD34 ⁺ | | | |
| 1.4. Źródła komórek CD34 ⁺ do ekspansji | | | |
| 1.5. Izolacja komórek CD34 ⁺ | | | |
| 1.6. Próby kliniczne zastosowania komórek CD34 ⁺ poddanych ekspansji <i>ex vivo</i> | | | |
| 1.7. Monocyty człowieka – charakterystyka i próby pozyskiwania do celów | | | |
| doświadczalnych i klinicznych | 14 | | |
| 2. Założenia i cele pracy | 20 | | |
| 3. Materiał i metody | 21 | | |
| 3.1. Pozyskiwanie krwi pępowinowej, szpiku kostnego, mobilizowanej krwi obwodowej. | 21 | | |
| 3.2. Izolacja komórek CD 34 ⁺ | | | |
| 3.2.1. Izolacja immunomagnetyczna | | | |
| 3.2.2. Izolacja z zastosowaniem sortowania w cytometrze przepływowym. | | | |
| 3.3. Klonogenność komórek CD34 ⁺ | | | |
| 3.4. Chemotaksja komórek CD34 ⁺ | | | |
| 3.5. Ekspansja komórek CD34 ⁺ | 23 | | |
| 3.6. Ocena efektywności ekspansji komórek CD34 ⁺ | | | |
| 3.6.1. Ocena immunofenotypu komórek | | | |
| 3.6.2. Przeszczepianie komórek CD34 ⁺ do myszy SCID | | | |
| 3.7. Ekspansja i różnicowanie komórek CD34 ⁺ do monocytów/makrofagów | | | |
| 3.8. Izolacja subpopulacji monocytów CD14 ⁺ /CD16 ⁺ oraz CD14 ⁺ /CD16 ⁻ | | | |
| 3.9. Ocena uwolnienia TNF, IL-10, IL-12 przez subpopulacje monocytów | | | |
| stymulowaneLPS/IFNγ i komórkami nowotworowymi (HPC-4) | 26 | | |
| 3.10. Fagocytoza i produkcja O ₂ | 27 | | |
| 3.11. Alogeniczna mieszana hodowla limfocytów (allo-MLR) | 27 | | |
| 3.12. Analiza statystyczna | 27 | | |
| 4. Wyniki | 29 | | |
| 4.1. Izolacja komórek CD34 ⁺ | 29 | | |
| 4.1.1. Wydajność izolacji | 29 | | |
| 4.1.2. Klonogenność izolowanych komórek CD34 ⁺ | | | |

| 4.1.3. Chemotaksja izolowanych komórek CD34 ⁺ | 29 | |
|--|----|--|
| 4.1.4. Klonogenność komórek CD34 ⁺ migrujących do SDF-1 | | |
| 4.2. Ekspansja komórek CD34 ⁺ | 30 | |
| 4.2.1. Proliferacja izolowanych komórek CD34 ⁺ i ich charakterystyka immunofenotypowa | | |
| w krótkoterminowych hodowlach | 30 | |
| 4.2.1.1. Kinetyka ekspansji i immunofenotyp | 30 | |
| 4.2.1.2. Klonogenność komórek CD34 ⁺ bezpośrednio po izolacji oraz po 3 dniowej | | |
| ekspansji. | 30 | |
| 4.2.1.3. Wpływ różnych podłoży na ekspansję komórek CD34 ⁺ | 30 | |
| 4.2.1.4. Wpływ stężenia czynników wzrostowych na ekspansję | 31 | |
| 4.2.1.5. Ekspansja komórek CD34 ⁺ pochodzących z różnych źródeł | 31 | |
| 4.2.1.6. Wpływ różnych surowic na ekspansję komórek CD34 ⁺ izolowanych z krwi | | |
| pępowinowej | 32 | |
| 4.2.1.7. Wpływ sposobu prowadzenia hodowli na proliferację komórek | 32 | |
| 4.2.2. Proliferacja izolowanych komórek CD34 ⁺ i ich charakterystyka | | |
| immunofenotypowa w długoterminowych hodowlach. | 32 | |
| 4.2.2.1. Kinetyka ekspansji i immunofenotyp | 33 | |
| 4.2.2.2. Klonogenność komórek CD34 ⁺ bezpośrednio po izolacji oraz po 3 dniowej | | |
| ekspansji | 33 | |
| 4.3. Ocena zdolności komórek CD34 ⁺ po ekspansji do repopulacji u myszy SCID | 33 | |
| 4.4. Różnicowanie komórek CD34 ⁺ bezpośrednio po izolacji do monocytów/makrofagów | 35 | |
| 4.4.1. Wpływ różnych podłoży hodowlanych na proliferację i różnicowanie komórek | | |
| CD34 ⁺ do monocytów/makrofagów | 35 | |
| 4.4.2. Wpływ różnych surowic na proliferację i różnicowanie komórek CD34 ⁺ do | | |
| monocytów/makrofagów | 35 | |
| 4.4.3. Wpływ różnych czynników wzrostowych na proliferację i różnicowanie | | |
| komórek CD34 ⁺ do monocytów/makrofagów | 36 | |
| 4.5. Dwuetapowe generowanie komórek CD14 ⁺ | 36 | |
| 4.5.1. Immunofenotyp komórek poddanych różnicowaniu w kierunku monocytów | | |
| bezpośrednio po izolacji komórek CD34 ⁺ oraz po 3 dniowej wstępnej ekspansji | 36 | |
| 4.5.2. Wpływ różnych podłoży hodowlanych na proliferację i różnicowanie komórek | | |
| CD34 ⁺ poddanych 3 dniowej wstępnej ekspansji do monocytów/makrofagów | 37 | |
| 4.5.3. Wpływ różnych surowic na proliferację i różnicowanie komórek CD34 ⁺ | | |
| poddanych 3 dniowej wstępnej ekspansji do monocytów/makrofagów | 37 | |

| 4.5.4. Wpływ różnych czynników wzrostowych na proliferację i różnicowanie komórek | |
|---|----|
| CD34 ⁺ poddanych 3 dniowej wstępnej ekspansji do monocytów/makrofagów | 37 |
| 4.5.5. Klonogenność komórek CD34 ⁺ bezpośrednio po izolacji oraz po 10 dniach | |
| hodowli (3 dni ekspansji + 7 dni różnicowania) | 38 |
| 4.5.6. Różnicowanie komórek CD34 ⁺ poddanych 7 i 10 dniowej wstępnej ekspansji, | |
| do monocytów/makrofagów | 38 |
| 4.5.7. Izolacja komórek CD14 ⁺ i ich dalsza hodowla | 38 |
| 4.5.8. Występowanie dwóch subpopulacji monocytów uzyskanych w wyniku dwuetapowej | |
| hodowli: ekspansji i różnicowania komórek CD34 ⁺ | 38 |
| 4.5.9. Charakterystyka immunofenotypowa subpopulacji monocytów | 39 |
| 4.5.9. Wpływ dodatkowych czynników różnicujących na dojrzewanie komórek do | |
| monocytów (1a,25 dihydroxywitaminy D3, CD40L) | 39 |
| 4.6. Ocena funkcjonalna uzyskanych w wyniku ekspansji i różnicowania do | |
| monocytów/makrofagów subpopulacji komórek CD14 ⁺⁺ CD16 ⁺ oraz CD14 ⁺ CD16 ⁻ | 40 |
| 4.6.1. Ocena zdolności do fagocytozy opsonizowanych bakterii Staphylococcus aureus | |
| oraz produkcji reaktywnych form tlenu (anionu ponadtlenkowego) przez subpopulacje | |
| komórek CD14 ⁺⁺ CD16 ⁺ oraz CD14 ⁺ CD16 ⁻ | 40 |
| 4.6.2. Ocena zdolności do produkcji cytokin przez subpopulacje komórek CD14 ⁺⁺ CD16 ⁺ | |
| oraz CD14 ⁺ CD16 ⁻ | 40 |
| 4.6.3. Ocena zdolności indukcji allo-MLR przez subpopulacje komórek CD14 ⁺⁺ CD16 ⁺ | |
| oraz CD14 ⁺ CD16 ⁻ | 40 |
| Rysunki i Tabele | 41 |
| 5. Dyskusja | 80 |
| 6. Wnioski | 91 |
| 7. Streszczenie | 93 |
| 8. Summary | 95 |
| 8. Wykaz skrótów | 97 |
| 9. Piśmiennictwo | 99 |

1. WSTĘP.

1.1. Ekspansja komórek układu krwiotwórczego w hodowlach in vitro.

Ekspansja w hodowlach in vitro pozwala namnożyć komórki układu krwiotwórczego do celów eksperymentalnych i klinicznych. Umożliwia użycie komórek macierzystych/ progenitorowych ze źródeł, które są dostępne w ograniczonej ilości, jak np. krew pępowinowa lub krew obwodowa u dzieci. Ekspansji można poddawać komórki macierzyste, progenitorowe oraz liniowo zróżnicowane (mieloblasty, erytroblasty i megakarioblasty). Pierwszym układem doświadczalnym, w którym stała się możliwa dłuższa hodowla krwiotwórczych komórek macierzystych, były komory dyfuzyjne (Breivik, 1971). Dexter i wsp. [1973] opracowali metodologie hodowli komórek szpiku kostnego na fibroblastach z jego podścieliska. Była to jedna z najwcześniejszych prób zwiększania w hodowli ilości komórek progenitorowych, którą dzisiaj określamy jako ekspansję. Kilka lat później Iscove i wsp. uzyskali 8-12 krotny wzrost liczby mysich komórek macierzystych podczas 4-dniowej hodowli in vitro [Iscove i wsp., 1989]. W kolejnych doniesieniach autorzy wykazali, że w określonych warunkach hodowli jest możliwy wzrost liczby komórek progenitorowych [Srour i wsp., 1999; Emmerson S., 1996; Qiu i wsp., 1999; Qureol i wsp., 1998]. Istnieje również możliwość namnożenia w hodowlach ex vivo komórek układu krwiotwórczego, które są zróżnicowane liniowo (megakarioblasty, mieloblasty i erytroblasty) [Van den Oudenrijn i wsp., 2000; Ratajczak i wsp., 1998a; 1998b]. Opracowano metody pozwalające na uzyskiwanie tych komórek w hodowlach in vitro w ilościach pozwalających na wykorzystanie ich do celów doświadczalnych [Majka i wsp., 2001; Machaj i wsp., 2002] i klinicznych [Stiff i wsp., 2000; Halle i wsp., 2000; Feng i wsp., 2005; Ivanovic i wsp., 2006]. Poddane ekspansji komórki progenitorowe układu megakariocytowego mogą znaleźć zastosowanie w leczeniu małopłytkowości, a namnożone progenitory układu czerwonokrwinkowego moga zostać wykorzystane w leczeniu niedokrwistości. Pozyskanie czystych populacji tych komórek umożliwia poza tym zastosowanie ich jako modeli doświadczalnych w badaniach nad krwiotworzeniem. W komórkach tych można badać ekspresję genów zarówno na poziomie mRNA jak i białek, a także wykorzystywać je w testach biologicznych. Dane doświadczalne uzyskane w takich modelach są niewątpliwie znacznie cenniejsze od wyników uzyskanych z badań, w których jako źródło komórek układu krwiotwórczego wykorzystuje się transformowane, tzw. ustalone, hematopoetyczne linie komórkowe.

Metody ekspansji komórek krwiotwórczych w hodowlach *ex vivo* są ciągle udoskonalane. Trwają prace nad optymalizacją zarówno samych warunków hodowli (skład podłoża hodowlanego) jak i wykorzystania odpowiednich stymulatorów (czynniki wzrostowe, cytokiny, chemokiny, hormony etc.) [Kogler i wsp., 1998; Eun-Seon i wsp., 1999; Piacibello i wsp., 2000; Saeland i wsp., 1989; Schwinger i wsp., 1999; Ulloa-Montoya i wsp., 2005]. Badane są także różne źródła komórek używanych do hodowli (krew pępowinowa, mobilizowana i nie mobilizowana krew obwodowa oraz szpik kostny) [Da Silva i wsp., 2005; De Bruyn i wsp., 2005; Pranke i wsp., 2005; Case i wsp., 2006], czas trwania hodowli [Engel i wsp., 1999; Flores-Guzman i wsp., 2005], wyjściowa liczba komórek czy też wykorzystanie w hodowli komórek podścieliska szpiku kostnego [Paquette i wsp., 2000; Kawano i wsp., 2006; Robinson i wsp., 2006].

1.2. Rola cytokin i czynników wzrostowych w ekspansji

Po urodzeniu szpik kostny jest głównym źródłem komórek hematopoetycznych i miejscem ich dojrzewania. Zawiera on komórki na wszystkich etapach rozwoju, także te najbardziej prymitywne. Aby prowadzić skuteczną ekspansję komórek *in vitro* należy określić warunki panujące w mikrośrodowisku, w którym te komórki powstają, a w szczególności rolę, jaką odgrywają w ich dojrzewaniu czynniki wzrostowe. Proces hematopoezy zachodzi w szpiku kostnym w ścisłej "współpracy" z komórkami podścieliska, które wydzielają szereg czynników, dlatego też tak ważna jest ich rola w ekspansji *ex vivo*.

Część cytokin i czynników wzrostowych jak czynnik wzrostu hematopoetycznych komórek macierzystych (SCF, Stem Cell Factor), Flt-3 Ligand (FLT-3L), Trombopoetyna (TPO, Thrombopoietin), Interleukin (IL) 11, IL-3, IL-6, są odpowiedzialne za proliferację komórek [Devine i wsp., 2003; Vavrova i wsp., 2002]. Inne cytokiny, jak czynnik wzrostu stymulujący tworzenie kolonii makrofagowych (M-CSF, Macrophage Colony Stimulating Factor), czynnik wzrostu stymulujący tworzenie kolonii granulocytowych (G-CSF, Granulocyte Colony Stimulating Factor), czynnik wzrostu stymulujący tworzenie kolonii granulocytowomakrofagowych (GM-CSF, Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor), erytropoetyna (EPO, Erythropoietin) a także TPO są odpowiedzialne za różnicowanie i dojrzewanie danych linii komórkowych i ich aktywność jest ograniczona do jednej populacji komórek progenitorowych [Geissler i wsp., 2000; Schwartz i wsp., 2001]. Uważa się również, że także niektóre witaminy, jak i ich pochodne mają duży wpływ na hematopoezę, i mogą współdziałać z czynnikami wzrostowymi [Devine i wsp., 2003]. Np. pochodna witaminy D3, 1α,25 dihydroxywitamina D3 (VD3), odgrywa rolę czynnika indukującego dojrzewanie monocytów i makrofagów [Grande i wsp., 2002]. Istotne jest także stężenie czynników oraz czas zastosowania. Najpowszechniej znane są metody ekspansji ex vivo komórek macierzystych/progenitorowych w odpowiednich podłożach hodowlanych z dodatkiem surowic i

7

wysokim stężeniem rożnych cytokin i czynników wzrostowych. Haylock i wsp. [1992] stwierdzili, że kombinacja SCF, IL-1, IL-3, IL-6, GM-CSF i G-CSF dodanych do hodowli izolowanych z krwi obwodowej komórek CD34⁺ daje 1000 krotny wzrost liczby komórek w przeciągu 21 dni, wzrost wczesnych komórek układu krwiotwórczego tworzących in vitro kolonie granulocytarno-makrofagowe (CFU-GM, Colony Forming Unit - Granulocytes and Macrophages) był najwyższy w 14 dniu hodowli (66 krotny) i utrzymywał się do 21 dnia. Brak jednego z tych czynników wpływał niekorzystnie na wyniki ekspansji. Zastosowanie G-CSF i/lub GM-CSF wpływa na zwiększenie całkowitej liczby komórek, natomiast zmniejsza się liczba klonogennych komórek potomnych [Brugger i wsp., 1995]. Kombinacja TPO i FLT-3L umożliwia utrzymanie komórek w hodowli in vitro przez 6 miesięcy i uzyskanie komórek progenitorowych wszystkich linii hematopoetycznych [Piacibello i wsp., 1997]. Z kolei Conneally i wsp. [1997] prowadzili 5-8 dniową ekspansję komórek CD34⁺38⁻ pochodzących z krwi pępowinowej w bezsurowiczym podłożu hodowlanym z dodatkiem IL-3, IL-6, G-CSF, FLT-3L, SCF, uzyskując 100-krotny wzrost liczby komórek tworzących kolonie in vitro, oraz 4 krotny wzrost liczby komórek w LTC-IC (Long Term Culture Initiating Cell). Luens i wsp. [1998] hodowali komórki CD34⁺Thy-1⁺Lin⁻ pochodzące ze szpiku kostnego zdrowych dawców przez 6 dni w podłożu IMDM (Iscove Modified Dulbecco's Medium) z 20% płodową surowicą bydleca (FBS, Foetal Bovine Serum) oraz IL-3, IL-6, LIF, TPO, SCF, FLT-3L. Oceniano liczbe komórek, stopień zróżnicowania (utratę CD34) oraz zdolność do rekonstytucji u myszy z ciężkim złożonym niedoborem odporności (SCID, Severe Combined Immunodeficiency). Stwierdzono, że SCF, FLT-3L i TPO są czynnikami spełniającymi najważniejszą rolę w ekspansji komórek macierzystych, bowiem zwiększają proliferację komórek przy nieznacznym ich różnicowaniu liniowym i zachowanych zdolnościach rekonstytucji u myszy SCID.

Określenie warunków pozwalających na podtrzymywanie samoodnawiania i ekspansję ludzkich komórek macierzystych wciąż pozostaje jednym z zasadniczych celów badań eksperymentalnej i klinicznej hematologii.

1.3. Komórki CD34⁺

Komórki CD34⁺ stanowią populację heterogenną komórek prekursorowych o różnym stopniu zróżnicowania. Macierzyste i progenitorowe komórki hematopoetyczne wykazują selektywną ekspresję determinanty CD34⁺. Termin komórka macierzysta określa komórkę posiadającą wysoki potencjał proliferacyjny i zdolną wytworzyć komórki potomne wszystkich linii hematopoetycznych [Smogorzewska i wsp., 1997]. Tylko niewielka część spośród komórek CD34⁺ krwi pępowinowej jest faktycznie macierzystymi komórkami hematopoetycznymi.

Oznaczenie kombinacji kilku markerów powierzchniowych (CD34, CD38, CD71, CD90) pozwala na odróżnienie komórek progenitorowych od macierzystych [Dorrell i wsp., 2000]. Najczęściej używanym w tym celu markerem jest determinanta CD38, pozwalająca na odróżnienie subpopulacji komórek młodszych (CD34⁺CD38⁻) od komórek bardziej zróżnicowanych (CD34⁺CD38⁺). Około 90% komórek CD34⁺ wykazuje koekspresję CD38⁺ [Testrapen i wsp. 1991]. Ekspresja CD38 na komórkach CD34⁺ jest ściśle związana z dojrzewaniem komórek hematopoetycznych. Komórki o fenotypie CD34⁺CD38⁻ z krwi pępowinowej są mniej zależne od komórek podścieliska aniżeli analogiczne komórki ze szpiku kostnego [Weekx i wsp., 1998]. Ta subpopulacja stymulowana cytokinami w płynnych podłożach pozbawionych komórek podścieliska zachowuje zdolność samoodnawiania przez ponad 120 dni. Komórki te są odpowiedzialne za późną odbudowę hematopoetyczną po przeszczepie, a komórki ukierunkowane za wczesną [Charbord i wsp., 1992; Nicol i wsp., 1994]. W krwi pępowinowej komórki CD34⁺CD38⁻ występują w większej proporcji niż w szpiku kostnym i w mobilizowanej krwi obwodowej [Hao i wsp., 1995; de Wynter i wsp., 1999].

Inne determinanty także używane do określenia stopnia dojrzałości komórek CD34⁺ to HLA-DR oraz CD117 (receptor c-kit). Zdolność do proliferacji komórek CD34⁺ jest zależna od występowania CD117 oraz poziomu jego ekspresji na tych komórkach [Kopeć-Szlęzak i wsp., 2001]. W krwi pepowinowej ponad 60% komórek CD34⁺ wykazuje koekspresje CD117. Komórki CD34⁺ o niskiej ekspresji CD117 wykazuja najsilniejszy potencjał proliferacyjny wśród komórek CD34⁺ krwi pępowinowej [Sakabe i wsp., 1998]. Komórki CD34⁺ CD117⁺ najczęściej wykazują także ekspresję HLA-DR, natomiast komórki CD34⁺38⁻ wykazują niską ekspresje HLA-DR [Hao i wsp., 1995]. Spośród komórek CD34⁺ krwi pępowinowej CD38⁻DR⁺ stanowia 3,43+2,12%, a 1,81+1,54% sa CD38⁻DR⁻ [Belvedere i wsp., 1999], podczas gdy w mobilizowanej krwi obwodowej ten odsetek jest znacznie mniejszy, odpowiednio 0,24+0,18% [Belvedere i wsp., 1999]. Na komórkach CD34⁺ krwi pępowinowej oraz 0,04+0,03% stwierdzono także obecność antygenu AC133. Komórki CD34⁺AC133⁺ stanowia populacje komórek młodych [Hao i wsp., 2003]. Stwierdzono, że takie komórki krwi pepowinowej charakteryzuje wyższy potencjał proliferacyjny, posiadają zdolność do tworzenia dwukrotnie większej liczby kolonii CFU-GM i trzykrotnie większej liczby kolonii erytroidalnych (BFU-E, Burst Forming Unit - Erythroid) aniżeli ich odpowiedniki w szpiku kostnym [Hao i wsp., 1995]. To może tłumaczyć możliwość wykorzystywania tych komórek do przeszczepów, nawet gdy ich ilość wydaje się niewystarczająca.

Komórki hematopoetyczne CD34⁺ krwi pępowinowej posiadają zdolność migracji do szpiku kostnego. Komórki podścieliska szpiku kostnego wydzielają chemokinę, tzw. czynnik

podścieliska szpiku kostnego (SDF-1, Stromal Cell Derived Factor), która zwiększa zdolności migracyjne tych komórek [Kopeć-Szlęzak i wsp., 2001]. Na powierzchni macierzystych i progenitorowych komórek hematopoetycznych stwierdzono występowanie receptora CXCR4 wiążącego SDF-1 [Lee i wsp., 1999; Peled i wsp., 1999]. Wykazano, że oś SDF-1 – CXCR4 bierze udział w migracji komórek macierzystych oraz progenitorowych [Majka i wsp., 2000; Peled i wsp., 1999]. W badaniach *in vitro* stwierdzono, że największą podatność na działanie SDF-1 wykazują komórki CD34⁺ krwi pępowinowej, nieco mniejszą szpiku kostnego, a najmniejszą komórki CD34⁺ krwi obwodowej [Voermans i wsp., 1999].

1.4. Źródła komórek CD34⁺ do ekspansji

Hematopoetyczne komórki macierzyste obecne są w szpiku kostnym osobników dorosłych, krwi obwodowej, narządach płodowych (wątrobie i szpiku) oraz w krwi pępowinowej [Wu i wsp., 1999; To i wsp., 1997]. Najbogatszym źródłem komórek macierzystych są tkanki płodowe. W wątrobie płodowej odsetek komórek CD34⁺ wynosi 11,4% [Huang i wsp., 1998], a w płodowym szpiku kostnym 24,6% [Wu i wsp., 1999]. Jednak ze względu na ograniczona dostępność tych tkanek, ich wykorzystanie w transplantologii i w hematologii eksperymentalnej jest ograniczone. Najdłużej wykorzystywanym w transpanstologii źródłem hematopoetycznych komórek macierzystych/progenitorowych jest szpik kostny [Culter i wsp., 2004]. Czasami dawcami szpiku kostnego są dzieci, wówczas liczba komórek możliwa do uzyskania jest znacznie ograniczona [Sanders i wsp., 1987]. Ostatnio coraz częściej do przeszczepów wykorzystuje się także mobilizowaną krew obwodową. Ilość wczesnych komórek hematopoetycznych we krwi obwodowej zwiększa się pod wpływem różnych tak zwanych "czynników mobilizacyjnych", które powodują ich przemieszczenie ze szpiku kostnego do krwi [Broxmeyer i wsp., 1996]. Jest to mniej inwazyjna metoda pozyskiwania materiału do przeszczepu, a także odbudowa układu krwiotwórczego jest szybsza niż po przeszczepieniu szpiku kostnego (co znacznie skraca szczególnie niebezpieczny dla biorcy okres neutropenii) [Culter i wsp., 2004]. Od czasu kiedy wykryto w krwi pępowinowej obecność licznych komórek macierzystych i ukierunkowanych krwiotworzenia, wzrosło zainteresowanie tym materiałem jako źródłem komórek do transplantacji [Broxmeyer i wsp., 1989]. Po raz pierwszy krew pępowinową do przeszczepu użyto w roku 1990 w anemii Fanconiego u dziecka [Gluckman i wsp., 1989]. Krew pępowinowa bardziej przypomina szpik kostny niż krew obwodową osób dorosłych, albowiem odsetek komórek posiadających na swej powierzchni determinantę CD34 wynosi w niej 0,02-1,43% [Hao i wsp., 1995]. Jest to wartość bardziej zbliżona do tej, jaka charakteryzuje szpik kostny (1-5%) niż niemobilizowaną krew obwodowa (<0,01%) [Engel i

wsp., 1999; Tarach i wsp., 1999]. W porównaniu z komórkami macierzystymi szpiku kostnego dorosłego człowieka, cechą wyróżniająca komórki krwi pępowinowej jest także znacznie wyższy potencjał repopulacyjny, duża zdolność do proliferacji i tworzenia większej liczby koloni w hodowlach in vitro, [Hao i wsp., 1995; Machaj i wsp., 2002]. Badając komórki krwi pępowinowej w hodowlach długoterminowych Petengell i wsp. stwierdzili, że poziom LTC-IC jest porównywalny ze szpikiem kostnym [Petengell i wsp., 1994]. Inne doniesienia mówią o częstszym występowaniu we krwi pępowinowej komórek LTC-IC niż w szpiku kostnym [Kinnburg i wsp., 1993], czy mobilizowanej krwi obwodowej [Wang i wsp., 1997], a także częstszym występowaniem komórek zdolnych do wszczepienia u myszy SCID, tzw. SRC (SCID Mice-Repopulating Cells) [Wang i wsp., 1997]. Krew ta jest łatwo dostępna jako materiał pozostający w naczyniach pępowiny i łożyska po porodzie i pozyskanie jej (po porodzie) nie stanowi żadnego zagrożenia życia, czy zdrowia dla matki czy płodu i nie budzi zastrzeżeń etycznych. Największą jednak niedogodnością i ograniczeniem wykorzystywania krwi pępowinowej do transplantacji jest stosunkowo nieduża objętość pozyskiwanej krwi pępowinowej, a zatem i ilości komórek. Jest to istotne, bowiem szybkość odnowy hematologicznej po przeszczepie jest bezpośrednio związana z liczba komórek macierzystych zawartych w materiale transplantacyjnym [Knopińska-Posłuszny i wsp., 1997; Fu i wsp., 2002]. Stad też zależna od cytokin ekspansja komórek mogłaby pozwolić na zwiększenie liczby hematopoetycznych komórek krwi pępowinowej, a co za tym idzie skrócenie czasu neutropenii jak i odnowy układu odporności po przeszczepie.

Wiadomo, że stymulacja komórek macierzystych krwi pępowinowej przez czynniki wzrostowe promująca megakariopoezę daje w układzie *in vitro* efekty znacząco lepsze od otrzymywanych z analogicznych komórek krwi obwodowej lub szpiku kostnego [Van den Oudenrijn i wsp., 2000]. Wykazano także, że ta sama kombinacja cytokin może różnie działać w zależności od źródła komórek poddawanych ekspansji. Komórki CD34⁺ pochodzące z krwi obwodowej oraz ze szpiku kostnego odpowiadają na stymulację TPO i IL-1 wzrostem liczby dojrzałych i niedojrzałych megakariocytów, natomiast kombinacja TPO i IL-3 w przypadku komórek CD34⁺ pochodzących z krwi pępowinowej daje wyższy wzrost liczby megakariocytów niż w przypadku krwi obwodowej i szpiku kostnego [Van den Oudenrijn i wsp., 2000].

Komórki macierzyste krwi pępowinowej mogą być także użyte w terapii genowej. Przenoszenie genów do macierzystych komórek krwiotworzenia, a następnie przeszczepianie tych komórek choremu, może stanowić nową metodę leczenia wielu wrodzonych chorób hematologicznych i immunologicznych, jak np. hemoglobinopatie, choroby spichrzeniowe, choroby metaboliczne, defekty leukocytarne i niedobory immunologiczne [Smogorzewska i wsp., 1996]. Pierwszy przeszczep autologicznych komórek CD34⁺ krwi pępowinowej z wprowadzonym prawidłowym genem kodującym deaminazę adenozyny przeprowadzono podając komórki 3 noworodkom z SCID [Kohn i wsp., 1996]. Autologiczne komórki macierzyste krwi pępowinowej mogą być transdukowane transgenem i uzyskaniem długotrwałej ekspansji.

1.5. Izolacja komórek CD34⁺

Komórki CD34⁺ izoluje się z populacji komórek jednojądrzastych krwi. Początkowo metody ich izolacji były oparte na cechach fizycznych charakterystycznych dla tych komórek jak gęstość i wielkość [Tarach i wsp., 1999]. Wykorzystywano np. metodę wirowania przeciwprądowego do wzbogacenia wczesnych frakcji komórek progenitorowych. Obecnie frakcje komórek jednojądrzastych krwi pępowinowej można uzyskać wirując krew w gradiencie stężeń wielocukrów i ditriozoatu [Pick i wsp., 2002], wykorzystując sedymentację w roztworze żelatyny [Nagler i wsp., 1993] lub skrobii hydroksyetylenowej [Rubinstein i wsp., 1995] oraz z zastosowaniem roztworów hipotonicznych powodujących lizę erytrocytów [Denning i wsp., 1996].

Odkrycie determinanty CD34 było przełomowym momentem dla rozwoju metod izolacji wczesnych komórek hematopoetycznych. Wykorzystanie technik separacji z użyciem przeciwciał monoklonalnych skierowanych przeciwko CD34 umożliwiło izolację wczesnych komórek hematopoetycznych od komórek bardziej dojrzałych. Przeciwciała te mogą być koniugowane z kuleczkami paramagnetycznymi (MiniMacs, StemCell, Dynabeads), biotyną (CellPro) bądź fluorochromami. Komórki wyznakowane przeciwciałami izoluje się następnie za pomocą pola magnetycznego (MiniMacs, StemCell, Dynabeads), kolumn awidynowych (CellPro), bądź cytometrów przepływowych (komórki znakowane fluorochromami) [Pafumi i wsp., 2002; Kimura i wsp., 2003]. Obecnie ekspansji poddaje się także bardziej wyselekcjonowane populacje komórek, np. CD34⁺38⁻ [Flores-Guzman i wsp., 2005; Ng i wsp., 2002], CD34⁺Thy-1⁺Lin⁻ [Luens i wsp., 1998] CD133⁺ [Ruzicka i wsp., 2004] oraz CD34⁺CD133⁺ [Hao i wsp., 2003]

1.6. Próby kliniczne zastosowania komórek CD34⁺ poddanych ekspansji *ex vivo*

Dotychczasowe próby ekspansji komórek CD34⁺ do celów klinicznych prowadziły do zwiększenia liczby komórek podtrzymujących krótkotrwałą odbudowę układu krwiotwórczego po przeszczepie celem skrócenia okresu neutropenii. Do tej pory brak jest jednak przekonywujących danych dotyczących ekspansji komórek macierzystych charakteryzujących

się zdolnością do długotrwałej repopulacji (long term repopulating cells). Próbowano także określić, czy neutropenia może być skrócona poprzez dodanie do materiału przeszczepowego komórek CD34⁺ poddanych ekspansji. Prowadzone do tej pory badania dotyczyły różnych źródeł komórek poddawanych ekspansji (mobilizowana krew obwodowa, szpik kostny, krew pępowinowa), a także warunków hodowli (począwszy od kombinacji cytokin, poprzez dodatek lub nie surowicy, czas trwania hodowli, różnej liczby komórek wyjściowych, a także dodatek komórek podścieliska).

Pierwsze próby przeszczepiania komórek poddanych ekspansji *ex vivo* prowadzono na zwierzętach. Po udanych eksperymentach na myszach [Spooncer i wsp., 1983] w 1983 roku Dexter przeprowadził próbę podania pacjentom z ostrą białaczką szpikową szpiku kostnego hodowanego 10 dni *in vitro* [Chang i wsp., 1986]. Podobne badania przeprowadzono u pacjentów z przewlekłą białaczką szpikową [Barnett i wsp., 1989]. Te próby wykazały, że jest możliwe podanie pacjentom komórek hodowanych poza ustrojem i że nie wywołuje to żadnych efektów ubocznych, jakkolwiek odbudowa hematologiczna jest opóźniona [Emmerson i wsp., 1996]. Podanie 20 pacjentom z różnymi chorobami hematologicznymi allogenicznego szpiku kostnego, z którego 1/3 komórek hodowano *in vitro* 4 dni w obecności GM-CSF i IL-3 nie przyspieszyło odbudowy hematopoetycznej w porównaniu do 40 pacjentów którym przeszczepiono allogeniczny szpik kostny niepoddany ekspansji [Naparstek i wsp., 1992].

W kolejnych próbach podano 10 pacjentom z zaawansowaną chorobą nowotworową komórki CD34⁺ pochodzące z mobilizowanej krwi obwodowej, które były hodowane 12 dni *in vitro*. 6 z nich otrzymało wyłącznie komórki uzyskane z ekspansji w obecności SCF, IL-1, IL-3, IL-6, EPO, a 4 pacjentom podano je łącznie z mobilizowaną krwią obwodową. Chociaż u pacjentów obserwowano szybką odnowę hematologiczną, to jednak nie zauważono istotnych różnic w porównaniu do historycznych kontroli [Brugger i wsp., 1995].

Kolejna grupa badaczy wyizolowała komórki CD34⁺ z mobilizowanej G-CSF krwi obwodowej 9 pacjentów z rakiem piersi. Po 12 dniach hodowli w podłożu X-VIVO 10 w obecności 1 % albuminy ludzkiej i PIXY 321 (GM-CSF/IL-3) uzyskano 26 krotny wzrost liczby komórek. Podano je pacjentom w ilości 44,6x10⁶ komórek/kg masy ciała. Nie zauważono efektów ubocznych, natomiast czas odbudowy hematologicznej był zadawalający [Williams i wsp., 1996]. Podanie chorym z rakiem piersi autologicznych komórek CD34⁺ wyizolowanych z mobilizowanej G-CSF krwi obwodowej, poddanych 10 dniowej ekspansji w podłożu IMDM z dodatkiem SCF, G-CSF i czynnika wzrostu stymulującego tworzenie *in vitro* kolonii megakariocytarnych (MGDF, Megakaryocyte Growth and Development Factor) prowadziło do skrócenia czasu odbudowy układu granulacytarnego o 3-4 dni, nie zauważono natomiast wpływu na odbudowę płytek [McNiece i wsp., 2000a]. Opisano przeszczepienie autologicznych komórek CD34⁺ poddanych 9 dniowej ekspansji w podłożu IMDM z 1% ludzką albuminą i G-CSF, SCF i MGDF, pochodzących z mobilizowanej krwi obwodowej 24 pacjentów z rakiem piersi [Paquette i wsp., 2000]. Stwierdzono skrócenie czasu odbudowy granulocytarnej i płytkowej oraz zmniejszenie liczby przetoczeń masy erytrocytarnej w porównaniu z przeszczepieniem komórek pochodzących z mobilizowanej krwi obwodowej. Komórki poddane ekspansji in vitro podawano również chorym ze szpiczakiem mnogim wraz z autologiczną mobilizowaną krwią obwodową. W każdym produkcie aferezy oznaczano liczbę komórek $CD34^+$ i nadmiar (powyżej $2x10^6$ komórek CD34⁺/kg/m.c.) poddawano ekspansji. Zaobserwowano znaczące skrócenie czasu neutropenii <500/ul do 2 dni [Reiffers i wsp., 1999]. Inne badania dotyczyły ekspansji komórek CD34⁺ hodowanych w obecności komórek podścieliska szpiku kostnego [Stiff i wsp., 2000; Engelhardt i wsp., 2001]. Badania miały na celu sprawdzenie, czy niewielkie ilości autologicznego szpiku kostnego hodowane in vitro są w stanie doprowadzić do odbudowy układu hematopoetycznego po chemioterapii stosowanej w wysokich dawkach. Pacjentom z rakiem piersi przeszczepiano szpik kostny (9-12x10⁸ komórek) hodowany 12 dni w obecności FLT-3L, EPO i PIXY321 w bioreaktorach zawierających komórki podścieliska szpiku kostnego. Zauważono zmniejszenie zawartości komórek nowotworowych w materiale po ekspansji, czas odbudowy hematologicznej był porównywalny z tym jaki uzyskuje się przy przeszczepie 1000-1500 ml szpiku kostnego.

Podsumowując, dotychczasowe obserwacje wskazują, że możliwe jest namnożenie *ex vivo* komórek hematopoetycznych i podanie ich pacjentom. Pomimo braku objawów ubocznych nie zauważono jednak znaczącego skrócenia czasu odbudowy hematologicznej po przeszczepie.

1.7. Monocyty człowieka – charakterystyka i próby pozyskiwania do celów doświadczalnych i klinicznych.

W porównaniu do komórek linii megakariocytowej czy erytrocytarnej brak danych dotyczących metod uzyskiwania z komórek CD34⁺ komórek układu fagocytów jednojądrzastych (monocytów/makrofagów). Monocyty krwi obwodowej wywodzą się ze wspólnej dla linii mieloidalnej komórki progenitorowej (CFU-GM), w szpiku kostnym różnicują się do monoblastów i promonocytów, które stanowią komórki wyjściowe dla monocytów krążących w krwioobiegu (okres półtrwania 72 godziny), które z kolei opuszczając łożysko naczyniowe stanowią prekursory makrofagów tkankowych (makrofagi płucne, otrzewnowe, śledzionowe, mikrogleju, komórki Kupffera, itp.). Migracja z układu krążenia i różnicowanie w mikrośrodowisku tkankowym związane są ze zmianami funkcjonalnymi monocytów i podlegają

14

regulacji przez liczne cytokiny i czynniki wzrostowe [Douglas i Musson, 1986; Brugger i wsp., 1991a; Valledor wsp., 1998]. W odpowiednio dobranych warunkach hodowli in vitro monocyty izolowane z krwi obwodowej człowieka wykazują także zmiany fenotypowe i funkcjonalne charakterystyczne dla dojrzałych makrofagów tkankowych i komórek dendrytycznych [Vincent i wsp., 1992; Tsai i wsp., 1992; Banchereau i wsp., 2000]. Monocyty posiadają zdolność do fagocytowania i zabijania wewnatrzkomórkowego drobnoustrojów, pod wpływem czynników stymulujących produkują reaktywne formy tlenu i azotu (ROI/RNI, reactive oxygen/nitrogen intermediates), uwalnianiaja szerokie spektrum cytokin jak np. czynnik martwicy nowotworów (TNF, Tumour Necrosis Factor), interferony α i β (IFN α i β), IL-1, IL-6, IL-10, IL-12, IL-18 oraz liczne czynniki wzrostowe i chemokiny, jak płytkowy czynnik wzrostu (PDGF, Platelet Derived Growth Factor), czy czynnik wzrostu śródbłonka naczyń (VEGF, Vascular Endothelial Growth Factor), białko zapalne makrofagów (MIP1a, Macrophage Inflammatory Protein-1a), białko chemotaktyczne dla monocytów (MCP1, Monocyte Chemoattractant Protein-1). Posiadają także zdolność do prezentacji antygenów limfocytom T. Do chwili obecnej zidentyfikowano ponad 120 czynników rozpuszczalnych produkowanych przez monocyty i makrofagi, które biorą udział w różnych reakcjach immunologicznych i zapalnych w odpowiedzi organizmu na zakażenia i nowotwory [Cavaillon i wsp., 1994; Ross i wsp., 2002]. Biologicznie aktywne czynniki produkowane przez monocyty/makrofagi w obrębie nowotworu mogą prowadzić do niszczenia komórek nowotworowych, ale także być źródłem czynników wzrostowych. Podjęte próby dożylnych wlewów rekombinowanych cytokin lub syntetycznych analogów dwupeptydu muramylowego (w formie wolnej jak i liposomach) w celu aktywacji krążących w krwioobiegu monocytów do odpowiedzi przeciwnowotworowej, nie przyniosły zadawalających efektów [Fidler i wsp., 1986]. Badania kliniczne polegały na izolacji monocytów z krwi obwodowej pacjentów, ich aktywacji in vitro przez IFNy, lipopolisacharyd (LPS), a następnie systemowym, badź miejscowym ich podaniu pacjentom [Andreesen i wsp., 1998]. Jednak mimo braku objawów ubocznych, efekty terapeutyczne były raczej ograniczone [Brugger i wsp., 1991b; Andreesen i wsp., 1991; Faradji i wsp., 1991].

Monocyty krwi obwodowej wykazują znaczną heterogenność zarówno pod względem morfologicznym, immunofenotypowym , jak i funkcjonalnym. Monocyty wykazują różnice w ekspresji CD64 [Zembala i wsp., 1984; Grage-Griebenov i wsp., 1993; 2000; 2001a; 2001b], CD14 i CD16 [Grage-Gribenow i wsp., 1993; Passlick i wsp., 1989; Ancuta i wsp., 2003], CD33 [Thomas i Lipsky 1994], oraz ITL1 i ITL3 (immunoglobulin-like transcript receptors) [Cella i wsp., 1999]. Ze względu na obecność CD16 w obrębie populacji monocytów wyróżnia się: komórki o silnej ekspresji determinanty CD14 (subpopulacja CD14⁺⁺, tzw. "klasyczne

monocyty") oraz komórki o słabszej ekspresji CD14 przy jednoczesnej ekspresji CD16 (subpopulacja CD14⁺/CD16⁺) [Ziegler-Heitbrock i wsp., 1996; Weber i wsp., 2000; Szafarska i wsp., 2004], które u osób zdrowych stanowią około 9+/-5% monocytów. Spośród monocytów CD16⁺ można wyróżnić komórki CD14^{high}CD64⁺ i CD14^{low}CD64⁻ [Grage-Gebrienow i wsp., 2001a]. Inne badania doprowadziły do wyróżnienia 3 subpopulacji monocytów CD14⁺⁺CD16⁻, CD14⁺⁺CD16⁺ oraz CD14⁺CD16⁺, które w krwi obwodowej wynoszą odpowiednio 85,5±6,2, 3,6±1,5 oraz 6,7±3,0% [Ancuta i wsp., 2003]. Ukazały się także doniesienia mówiące o 5 subpopulacjach monocytów krwi obwodowej CD14⁺⁺CD16⁻CD64⁺, CD14⁺⁺CD16⁺CD64⁺, CD14^{dim}CD33⁺⁺CD16⁻ oraz CD14⁺⁺CD56⁺ [Rothe i wsp., 1996]. Jednakże funkcja tych żadkich subpopulacji monocytów, nie jest do końca poznana, wiadomo natomiast, że subpopulacja CD14⁺⁺CD16⁺ wiąże enzymatycznie degradowane LDL [Kapinsky i wsp., 2001]. Stwierdzono także, że możliwe jest uzyskanie komórek CD14⁺⁺CD16⁺⁺ poprzez hodowle *in vitro* monocytów krwi obwodowej w obecności GM-CSF, IL-4, IL-10. Komórki te charakteryzuje ekspresja markerów komórek dendrytycznych: CD40, CD80, CD86, HLA-DR, CD11b, CD11c, CD18, CD1a, CD83 [Ancuta i wsp., 2000; Li i wsp., 2004].

W porównaniu do monocytów CD14⁺⁺, komórki CD14⁺/CD16⁺ sa mniejsze, wykazuja wyższą ekspresję HLA-DR oraz mniejszą zdolność do adherencji i fagocytozy [Ziegler-Heitbrock i wsp., 1993; Ziegler-Heitbrock 1996]. Cechuja się wysoka cytoplazmatyczna ekspresja i produkcja TNF oraz: IL-1β, IL-6, IL-12 i IL-8, natomiast niewielka produkcja IL-10 po stymulacji LPS, lipoarabinomannanem lub komórkami nowotworowymi [Almeida i wsp., 2001; Frankenberger i wsp. 1996; Sadeghi i wsp. 1999; Belge i wsp. 2002; Szaflarska i wsp., 2004]. Subpopluacja CD14⁺/CD16⁺ charakteryzuje się wyższą ekspresją CD11a i CD11c i CD18 [Almeida i wsp., 2001], natomiast ekspresja CD11b jest na tych komórkach niższa [Emminger i wsp., 2001; Almeida i wsp., 2001], co może wpływać na mniejszą zdolność do fagocytowania opsonizowanych bakterii. Komórki CD16⁺/HLA-DR⁺/CD14^{-/dim} wykazuja wyraźna aktywność fagocytarna i oksydacyjna, mimo braku aktywności mieloperoksydazy, α -naftyl acetoesterazy i lizozymu [Almeida i wsp., 2001]. Monocyty CD14⁺/CD16⁺ wykazują wyższą ekspresję bardzo późnego antygenu-4 (VLA-4, Very Late Antigen-4, CD49d/CD29), co wskazuje na ich wieksza zdolność do przylegania do śródbłonka naczyniowego i tworzenia puli komórek przyściennych [Passlick i wsp., 1989; Ziegler-Heitbrock i wsp., 1993]. Komórki CD16⁺/HLA-DR⁺/CD14^{-/dim} wykazują niższą ekspresję CD64, CD29, CD32, CD33, CD38, CD35, CD55 [Almeida i wsp., 2001; Tanaka i wsp., 1999], natomiast wyższą ekspresję CD45, CD45RA, CD54, CD86, CD116 i CD123, w porównaniu do monocytów CD14⁺/CD16⁻ [Almeida i wsp., 2001]. Monocyty $CD14^{+}/CD16^{+}$ wykazują wyższą ekspresję receptora CCR5 dla chemokin RANTES i MIP-1 α ,

podczas gdy monocytach CD14⁺⁺ receptora CCR2 (MCP-1) [Weber i wsp., 2000]. Subpopulacja CD14⁺/CD16⁺ wykazuje również wyższą ekspresję TLR-2 (Toll Like Receptor) w porównaniu do "klasycznych" (CD14⁺⁺) monocytów [Belge i wsp., 2002]. Monocyty CD14⁺/CD16⁺ posiadają więc charakterystykę fenotypową komórek prozapalnych. Niska ekspresja CD11b i CD33 oraz wyższa MHC klasy II wskazuje na większy stopień dojrzałości komórek CD14⁺/CD16⁺. Monocyty CD14⁺/CD16⁺ wykazują podobieństwo do makrofagów płucnych pod względem ekspresji molekuł powierzchniowych oraz spektrum produkowanych cytokin, a w zakresie funkcjonalnym komórki te odpowiadają monocytom CD64⁻ [Zembala i wsp., 1984; Ziegler-Heitbrock i wsp., 1993]. W obrębie komórek CD14⁺/CD16⁺ występują prekursory komórek dendrytycznych (DC, Dendritic Cells) identyfikowane przeciwciałem M-DC8 [Siedlar i wsp., 2000]. Monocyty M-DC8 stanowią ok. 40% komórek CD14⁺/CD16⁺ i stanowią komórki prekursorowe dla DC o wysokiej ekspresji HLA klasy I i II [Almeida i wsp., 2001].

Monocyty regulują procesy zapalne poprzez produkcję transformującego czynnika wzrostu (TGF- β , Transforming Growth Factor), który powoduje zahamowanie proliferacji i aktywności limfocytów w miejscu zapalenia, a wraz z IL-1, TNF i PDGF bierze udział w procesach naprawczych tkanek. Regulacja procesu zapalnego może się także odbywać poprzez produkcję inhibitorów enzymów ograniczających proces zapalny (α 2-makroglobulina, α 1-antyproteaza). Wybuch tlenowy, który zachodzi w monocytach podczas fagocytozy, odgrywa istotną rolę w zabijaniu wewnątrzkomórkowym mikroorganizmów. Istnieją doniesienia, że odsetek monocytów CD14⁺CD16⁺ rośnie u chorych z posocznicą lub we wstrząsie septycznym [Blumenstein i wsp., 1997; Skrzeczyńska i wsp., 2002]. Podobne obserwacje dotyczą pacjentów z ostrymi lub przewlekłymi zakażeniami oraz niektórych pacjentów z choroba nowotworową [Ziegler-Heitbrock i wsp., 1996; Saleh i wsp., 1995]. Monocyty i makrofagi są głównym źródłem prozapalnego TNF oraz wykazującej silne działanie przeciwzapalne IL-10. Te dwie cytokiny odgrywają istotną rolę w regulacji procesów zapalnych związanych z zakażeniami drobnoustrojami chorobotwórczymi jak i z rozrostem nowotworowym.

Wiele obserwacji wskazuje na istotną rolę monocytów/makrofagów w odpowiedzi gospodarza na rozwijający się nowotwór. [Leek i wsp., 1996; Mantovani 1989; Zembala i Asherson 1989]. Monocyty/makrofagi naciekające nowotwór, mogą zarówno hamować jak i wzmagać wzrost nowotworów co określane jest pojęciem "macrophage balance" [Balkwill i wsp., 2001]. Makrofagi stanowią zasadniczą komponentę nacieku komórkowego w wielu typach nowotworów [Mantovani i wsp., 1990; 1992; Leek i wsp., 1996; van Ravenswaay i wsp., 1992]. Poza prezentacją antygenów związanych z guzem, regulują funkcje limfocytów pomocniczych oraz cytotoksycznych, i innych komórek nie wchodzących w skład układu immunologicznego, a

obecnych w nacieku okołonowotworowym lub podścielisku guza. Monocyty/makrofagi działają jako komórki efektorowe niszczące komórki nowotworowe na drodze bezpośredniej i zależnej od przeciwciał cytotoksyczności. Mechanizmy niszczenia komórek nowotworowych związane są z sekrecją proteaz obojętnych, aktywacją komórek NK, produkcją ROI i RNI a także niektórych cytokin, np. TNF, IL-12. *In vitro* bezpośrednia stymulacja monocytów niektórymi komórkami nowotworowymi prowadzi do indukcji produkcji TNF [Zembala i wsp., 1993], RNI [Zembala i wsp., 1994a; Siedlar i wsp., 1999] i ROI [Mytar i wsp., 1999]. Do indukcji wymienionych czynników cytotoksycznych wymagany jest kontakt pomiędzy komórkami, a w przekazywaniu sygnału do ich produkcji bierze udział CD44 i HLA-DR [Zembala i wsp., 1994b]. U chorych z różnymi typami nowotworowymi produkcję TNF przez monocyty [Zembala i wsp., 1988; 1994b]. Wykazano także, że różne komórki nowotworowe różnią się zdolnością do stymulacji produkcji TNF przez monocyty [Mytar i wsp., 2003]. Główną populacją monocytów produkujących TNF w odpowiedzi na stymulację LPS lub komórkami nowotworowymi są komórki CD14⁺/CD16⁺ [Frankenberger i wsp., 1996; Szaflarska i wsp., 2004].

Wykorzystanie potencjału efektorowego monocytów/makrofagów wymaga ich aktywacji *in vitro*. Postęp w badaniach klinicznych nad zastosowaniem monocytów/makrofagów jest limitowany ograniczoną dostępnością tych komórek do badań. W chwili obecnej uzyskuje się je z krwi obwodowej dawców lub próbuje się je zastępować liniami nowotworowymi wyprowadzonymi z komórek tego układu (linie THP-1, UT-7, Mono Mac) w badaniach doświadczalnych. Najczęściej stosowaną procedurą do celów doświadczalnych jest izolacja monocytów na zasadzie adherencji po izolacji komórek jednojądrzastych w gradiencie stężeń dirtizoatu/wielocukrów [Benett i wsp., 1994]. Metoda ta, chociaż stosunkowo prosta, obarczona jest błędami wynikającymi z zanieczyszczenia limfocytami, a także prowadzi do aktywacji monocytów, która zachodzi w trakcie izolacji [Benett i wsp., 1994]. Alternatywne metody to sortowanie immunomagnetyczne, które jednak wymaga specjalistycznego sprzętu oraz dużej objętości krwi pobranej od dawcy lub przeciwprądowe wirowanie z zastosowaniem komór do elutriacji [Siedlar i wsp., 1999; Mytar i wsp., 1999]. Ponieważ monocyty stanowią tylko 3-8% leukocytów krwi obwodowej, to uzyskanie wystarczającej ich liczby wiąże się z pobraniem dużej objętości krwi.

Biorąc wszystko powyższe pod uwagę wydaje się, ze opracowanie wydajnej metody namnażania w hodowlach *ex vivo* monocytów z progenitorowych komórek hematopoetycznych umożliwiłoby w sposób wydajny i ekonomiczny uzyskiwanie monocytów do badań. Komórki takie mogłyby również potencjalnie znaleźć zastosowanie w klinice w różnych formach

immunoterapii adoptywnej lub terapii genowej. Monocyty/makrofagi mogłyby być użyte jako nośniki transgenów skonstruowanych do celów terapeutycznych. Ponieważ jednak są to komórki nieproliferujące, to ograniczona jest możliwość wykorzystania większości wektorów jako nośników genów terapeutycznych, stąd transfekcja komórek CD34⁺, a następnie ich proliferacja i różnicowanie do monocytów/makrofagów mogłaby rozwiązać ten problem [Burke i wsp., 2002].

Opracowano już szereg biotechnologii/protokołów pozyskiwania DC z komórek CD34+, które wykorzystywane są tak do celów badawczych jak i klinicznych, to do chwili obecnej brak metodologii pozwalających na uzyskanie dojrzałych monocytów w znaczących ilościach celem zastosowania do badań i ewentualnej immunoterapii. Znaczne heterogenności monocytów i występowanie ich różnych subpopulacji o różnej aktywaności biologicznej i roli fizjologicznej odzwierciedla ich różne stadia rozwojowe. Ma to istotne implikacje dla opracowania nowych strategii terapeutycznych nacelowanych na modyfikację funkcji poszczególnych subpopulacji monocytów lub uzyskiwanie subpopulacji o ściśle określonej aktywności biologicznej [Gordon i Taylor, 2005].

2. ZAŁOŻENIA I CELE PRACY.

Ponieważ hematopoetyczne komórki macierzyste mogą w warunkach *in vitro* różnicować się w kierunku granulocytów, erytrocytów czy megakariocytów założono, iż winno to dotyczyć także różnicowania w kierunku monocytów. Wobec braku takiej metodologii opracowano protokół zbadania różnych metod pozwalających docelowo na uzyskanie monocytów.

2.1. Cele ogólne.

Celem pracy było opracowanie metodologii ekspansji i różnicowania *ex vivo* ludzkich monocytów z hematopoetycznych komórek progenitorowych CD34⁺.

2.2. Cele szczegółowe.

- ✓ Określenie optymalnych metod izolacji komórek CD34⁺ poprzez zbadanie:
 - o liczby komórek po izolacji,
 - o odsetka komórek CD34⁺,
 - o klonogenności izolowanych komórek,
 - o chemotaksji izolowanych komórek do SDF-1.
- ✓ Określenie optymalnych warunków ekspansji komórek CD34⁺, poprzez zbadanie wpływu:
 - o różnych podłoży hodowlanych,
 - o dodatku surowic,
 - o źródła komórek CD34⁺,
 - o czasu trwania hodowli,

na liczbę komórek, odsetek komórek CD34⁺ i stopień ich zróżnicowania liniowego.

- ✓ Ocena funkcjonalna uzyskanych w wyniku ekspansji komórek CD34⁺ poprzez zbadanie ich zdolności repopulacyjnej u myszy SCID.
- ✓ Określenie optymalnych warunków różnicowania hematopoetycznych komórek progenitorowych CD34⁺ do monocytów/makrofagów poprzez zbadanie wpływu:
 - o różnych podłoży hodowlanych,
 - o dodatku surowicy,
 - o kombinacji cytokin i czynników wzrostowych,
 - o czasu trwania hodowli,

na liczbę komórek oraz odsetek komórek CD14⁺.

- ✓ Ocena funkcjonalna uzyskanych monocytów poprzez zbadanie ich zdolności do:
 - o fagocytozy,
 - o produkcji cytokin i ROI,
 - o stymulacji allogenicznych limfocytów (allo-MLR, allogenic mixed lymphocyte reaction).

3. MATERIAŁ I METODY.

3.1. Pozyskiwanie krwi pępowinowej, szpiku kostnego, mobilizowanej krwi obwodowej.

Badania przeprowadzono na komórkach krwi pępowinowej uzyskanych od 70 rodzących. Wszystkie próbki zostały pobrane tzw. metodą otwartą po urodzeniu i odpępnieniu noworodka. Po urodzeniu się łożyska, pepowine dokładnie odkażano 70% alkoholem etylowym, krew siłami grawitacji spływała do sterylnych butelek zawierających 20 ml roztworu antykoagulantu (cytrynian sodu). Do momentu dalszej preparatyki krew przechowywano w temperaturze pokojowej. Średnia objętość uzyskiwanej krwi wynosiła 46,5+26ml, średnia liczba uzyskiwanych komórek jednojądrzastych $92,4+75x10^6$, a średnia liczba komórek CD34⁺ 0.8+0.5x10⁶. Szpik kostny uzyskano od 5 dawców narządowych (współpraca z Dziekanem Wydziału Lekarskiego Pomorskiej Akademii Medycznej w Szczecinie - prof. dr hab. med. Bogusławem Machalińskim). Komórki hematopoetyczne z krwi obwodowej uzyskiwano drogą aferezy poprzedzonej cyklami chemioterapii z następowym podaniem czynnika wzrostu (G-CSF) 5 dzieciom hospitalizowanym w Ośrodku Przeszczepiania Szpiku Kostnego USD w Krakowie. Aferezy przeprowadzono przy użyciu separatora komórkowego (Fenwal CS 300, Baxter, Deerfield, IL). Mobilizowana krew obwodowa uzyskiwano przy okazji pobierania próbek materiału do badań diagnostycznych i wykorzystywano materiał pozostały po wykonaniu badań.

3.2. Izolacja komórek CD 34⁺.

Komórki krwi pępowinowej zawieszone w roztworze antykoagulantu rozcieńczano buforze fosforanowym (PBS, Phosphate Buffer Saline) (Gibco, Wielka Brytania) w stosunku 1:1 i nawarstwiano na gradient gęstości (Ficoll-Histopaque, Sigma, St.Louis, MO). Zawartość probówek wirowano następnie przez 30 minut, przy 400g w temp. pokojowej. Komórki jednojądrzaste znajdujące się w interfazie zbierano i przepłukiwano dwukrotnie w PBS (10min, 200g).

3.2.1. Izolacja immunomagnetyczna.

Komórki jednojądrzaste pozbawiano komórek adherentnych inkubując uzyskaną zawiesinę w plastikowych płytkach Petriego (Sarstedt, Numbrecht, Niemcy) przez 18 godzin. Do izolacji komórek CD34⁺ zastosowano pozytywną selekcję z użyciem kuleczek magnetycznych opłaszczonych przeciwciałami anty-CD34. Izolację przeprowadzano na kolumnach magnetycznych MiniMacs (Milteny Biotec, Bergisch Gladbach, Niemcy) według wskazań

producenta. Oceniano liczbę komórek w komorze Burkera, ich żywotność za pomocą 0,5% roztworu błękitu trypanu (Sigma), oraz czytość cytofluorymetrycznie (FACS Calibur, Becton Dickinson, Mountain View, CA), po barwieniu przeciwciałem monoklonalnym anty-CD34 znakowanym fikoerytryną (PE, Phycoerythrin) (BD PharMingen, San Diego, CA).

3.2.2. Izolacja z zastosowaniem sortowania w cytometrze przepływowym.

Komórki jednojądrzaste pozbawione komórek adherentnych płukano w PBS, a następnie barwiono przeciwciałem monoklonalnym anty-CD34 znakowanym PE (BD), w ilości 20ul/20 x 10⁶ komórek/0,2ml. Po inkubacji w 4°C przez 20 minut, komórki płukano 2-krotnie i zawieszano w PBS. Izolację komórek CD34⁺ przeprowadzano metodą sortowania przy użyciu cytometru przepływowego MoFlo (DakoCytomation, Crapinteria, CA), wyposażonego w niebieski laser INNOVA EnterpriseTM II IonLaser emitujący fale o długości 488 nm (Coherent, Santa Clara, CA) i komputer PC z użyciem programu Summit wersja 3.1. Komórki sortowano w opcji Normal-R (recovery), przy częstości generowania kropli 96704 Hz, stosując dyszę o średnicy 70μm. Sortowane komórki zbierano do opłaszczonych (celem uniknięcia adherencji) FBS (Sigma), polistyrenowych próbówek Falcon 2067 (Becton Dickinson), chłodzonych cieczą o temp. 4°C (Neslab Instruments Inc., Portsmouth, NH). Komórki wirowano, zawieszano w RPMI 1640 i oceniano ich aktywność funkcjonalną.

3.3. Klonogenność komórek CD34⁺.

Liczbę komórek oznaczano w komorze Bürkera z zastosowaniem odczynnika Türka. Żywotność komórek oznaczano w komorze Bürkera z zastosowaniem błękitu trypanu. Klonogenność komórek CD34⁺ oceniano badając wzrost kolonii CFU-GM, BFU-E oraz mieszanych (CFU-GEMM, Colony Forming Unit-Granulocyte, Erytroid, Macrophage, Megakaryocyte). Za kolonie CFU-GM przyjmowano odpowiednio skupiska składające się z co najmniej 40 komórek. Kolonie najczęściej miały charakter rozproszony, z widocznym większym zagęszczeniem komórek w centrum kolonii. Za kolonie BFU-E uważano skupiska składające się z 1 lub więcej gronek zawierających około 200 erytroblastów. Kolonie uzyskiwały czerwonobrunatne zabarwienie. Duże kolonie CFU-GEMM akładają się z wszystkich rodzajów komórek krwiotwórczych. Najczęściej dookoła kulistej masy czerwono-brunatnych erytroblastów widoczne są granulocyty lub makrofagi.

Komórki CD34 ⁺ po izolacji oraz w kolejnych dniach ekspansji hodowano w pożywce zawierającej metylocelulozę. W tym celu $1x10^4$ komórek zawieszano w 1ml półpłynnego podłoża hodowlanego Methocult (Stem Cell Technologies, Vancouver, Kanada) z dodatkiem

EPO (3U/ml), SCF (50ng/ml), IL-3 (10ng/ml), GM-SCF (10ng/ml) (wszystkie R&D, Minneapolis, MN). Hodowle komórkowe prowadzono w duplikatach w 24-dołkowych płytkach (Sarstedt) w 37°C, 5%CO₂ i 95% wilgotności. Po 14 dniach w mikroskopie odwracalnym oceniano liczbę i rodzaj kolonii.

3.4. Chemotaksja komórek CD34⁺

Komórki CD34⁺ zawieszano w podłożu hodowlanym wzbogaconym w 0,5% albuminę bydlęcą (BSA, Bovine Serum Albumin, Sigma) w stężeniu $1x10^6$ /ml. Stosowano 24 dołkowe płytki chemotaksyjne (Transwell, Costar Corning, Cambridge, MA) oraz membranę o wielkości porów 5 µm. Dolną komorę płytki wypełniano 650µl podłoża hodowlanego z 0,5% BSA (kontrola negatywna), 650µl podłoża hodowlanego (0,5% BSA) z 100ng/ml SDF-1 (Peprptech, Rocky Hill, NJ). Do górnej komory "insertu" nakładano $1x10^5$ komórek zawieszonych w 100µl podłoża. Do osobnej studzienki bez "insertu" dodawano 20% liczby komórek nakładanych do górnej komory "insertu" tj. $2x10^4$ (kontrola ilościowa) w objętości 650µl podłoża z 0,5% BSA. Po 3h inkubacji w temperaturze 37° C, 5% CO₂, 95% wilgotności usuwano "inserty", a zawartość dolnych komór poddawano analizie cytometrycznej oceniając liczbę komórek przepływającą w czasie 20 sekund. Następnie obliczano % komórek wyjściowych wykazujących chemotaksję do SDF-1 (na podstawie kontroli ilościowe) wg wzoru:

% komórek wykazujących = (liczba zliczeń próbki badanej w czasie 20s) x 20% liczba zliczeń kontroli ilościowej w czasie 20s

3.5. Ekspansja komórek CD34⁺

W badaniach nad optymalizacją ekspansji *ex vivo*, komórki CD34⁺ uzyskane w wyniku izolacji metodą MiniMacs z krwi pępowinowej, szpiku kostnego i mobilizowanej krwi obwodowej zawieszano w stężeniu 1x10⁵/ml w różnych podłożach hodowlanych: RPMI 1640 (Sigma), Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM, Gibco, Paisley, Wielka Brytania), DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Sigma), MEMalfa (Minimum essentials Medium Eagle Alpha Modification, Sigma), X-VIVO10 (BioWhittaker, Verviers, Belgia), Serum Free Expansion Medium-SFEM (Stem Cell Technologies), Stemline II (Sigma) wzbogaconych w FBS lub autologiczną surowicę krwi pępowinowej oraz odpowiednie czynniki wzrostowe SCF (50ng/ml), IL-3 (30ng/ml), TPO (15ng/ml) oraz FLT-3L (30ng/ml) (R&D). Hodowle prowadzono na płytkach 24 dołkowych (Sarsted), w 37°C, z zachowaniem pełnej wilgotności i 5%CO₂. Po 3-4 dniach hodowli komórki poddawano ocenie, a połowę podłoża

hodowlanego zastępowano świeżym, lub 1×10^5 komórek przenoszono do nowych dołków hodowlanych zawierających świeże podłoże.

3.6. Ocena efektywności ekspansji komórek CD34⁺

3.6.1.Ocena immunofenotypu komórek.

Komórki CD34⁺ bezpośrednio po izolacji lub pochodzące z hodowli zawieszano w buforze PBS $(1 \times 10^{5}/100 \mu l)$ i inkubowano przez 30 minut w 4°C bez dostępu światła z odpowiednim mysim przeciwciałem monoklonalnym (listę stosowanych przeciwciał przedstawia Tab.1) skierowanym przeciwko: CD3-FITC (Flupresecin isothiocyanate), CD5-FITC, CD7-FITC, CD11a-FITC, CD11b-PE, CD13-PE, CD14-FITC, CD14-APC (Allophycocyanin), CD15-PE, CD16-PE, CD16-PE-Cy5 (Phycoerythrin-cyanin 5.5), CD33-PE, CD34-PE, CD38-FITC, CD40-FITC, CD64-FITC, CD79a-PE, CD86-PE, CD117-PE, CD163-PE, HLA-DR-FITC, CCR2-PE, CCR5-PE, CXCR4-PE, oraz z odpowiednią kontrolą izotypową (BD, Pharmingen, San Diego, CA). Komórki były następnie płukane 2x w roztworze PBS i zawieszane w 200µl PBS. Analizę przeprowadzano przy użyciu cytofluorymetru przepływowego (FACSCalibur, Becton Dickinson, Mountain View, CA) wyposażonego w laser argonowy 488nm, współpracującego z komputerem Macintosh, z zastosowaniem programu CellQuest. Analizowano odsetek komórek wykazujących ekspresję danego antygenu oraz średnią intensywność fluorescencji (MFI, Mean Fluorescence Intensity). W przypadku cytoplazmatycznej oceny ekspresji mieloperoksydazy (MPO), komórki (5x10⁵) zawieszano w PBS, wirowano, dodawano 250µl Cytofix/CytopermTM (BD) i inkubowano 20minut w 4°C bez dostępu światła. Po inkubacji dwukrotnie płukano, a następnie zawieszano w 50µl w Perm/WashTM Buffer (BD) i dodawano przeciwciało anty-MPO-FITC i odpowiednia kontrole izotypowa, inkubowano 40 minut w 4°C bez dostępu światła, dwukrotnie płukano w perm wash Buffer, zawieszano w PBS i analizowano jak pozostałe próbki.

3.6.2. Przeszczepianie komórek CD34+ do myszy SCID

Izolowane z krwi pępowinowej komórki CD34⁺ poddawano ekspansji w podłożu hodowlanym X-VIVO 10 z dodatkami jak opisano w pkt. 5.4. Po 3 i 7 dniach ekspansji komórki, zbierano, zawieszano w soli fizjologicznej i podawano 8-10 tygodniowym myszom SCID (CB17/Icr-Prkdc) w splot żylny, w dawce $1x10^5$ do $1x10^6$ komórek/200µl/mysz. Myszy SCID 24 godziny przed przeszczepem naświetlano subletalną dawką promieniowania γ (2krotnie w odstępach 5 godzinnych, każdorazowa dawka 122 cGy). Po 6 tygodniach od podania komórek myszy usypiano i pobierano szpik kostny z kości udowych i barwiono z zastosowaniem następujących przeciwciał monoklonalnych dla ludzkich determinant: CD4-FITC, CD13-PE, CD14-FITC, CD19-PE, CD33-PE, CD34-PE, CD38-FITC, CD45-FITC. Analizę ekspresji determinant przeprowadzano z zastosowaniem cytometru przepływowego (FACS Canto, BD Biosciences Immunocytometry Systems).

3.7. Ekspansja i różnicowanie komórek CD34⁺ do monocytów/makrofagów

W badaniach nad optymalizacją ekspansji *ex vivo* komórki CD34⁺ bezpośrednio po izolacji oraz w 3, 7, 10 dniu ekspansji zawieszano w stężeniu 1x10⁵/ml w różnych podłożach hodowlanych (RPMI, IMDM, DMEM, MEMalfa,) wzbogaconych w surowice: FBS, końską (HS-Horse Serum, Gibco), syntetyczną (SF-Seum Free) [Ratajczak i wsp. 1998], lub ludzką grupy AB (AB) oraz wzbogaconych w odpowiednie czynniki wzrostowe: SCF (25ng/ml), IL-3 (30ng/ml), FLT-3L (30ng/ml) oraz czynnik wzrostu stymulujący tworzenie *in vitro* kolonii makrofagowych (M-SCF Macrophage Colony Stimulating Factor) 30ng/ml (R&D). Hodowle prowadzono na płytkach 24 dołkowych (Sarsted), w 37°C, z zachowaniem pełnej wilgotności i 5%CO₂.

3.8. Izolacja subpopulacji monocytów CD14⁺/CD16⁺ oraz CD14⁺/CD16⁻.

Komórki CD34⁺ po 3-10 dniach ekspansji i 3-14 dniach różnicowania zbierano, płukano i zawieszano w PBS w stężeniu 10x10⁶/ml. Po znakowaniu przeciwciałami anty-CD14-FITC i anty-CD16-PE, izolowano komórki CD14⁺ (populacja wyjściowa) oraz subpopulacje CD14⁺CD16⁻ i CD14⁺⁺CD16⁺ przy użyciu cytometru przepływowego FACS Vantage SE z opcją TurboSort (Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose, CA) wyposażonego w laser Innova Enterprise II emitujący fale o długości 488 nm (Coherent, Santa Clara, CA) i komputer Power Macintosh 7600/120 z użyciem programu Cell Quest v. 3.0. Komórki sortowano w opcji Normal-R (recovery), przy częstości generowania kropli 65kHz, stosując dyszę o średnicy 70µm. Sortowane komórki zbierano do opłaszczonych FBS (celem uniknięcia adherencji) polistyrenowych próbówek Falcon 2057 (Becton Dickinson), chłodzonych cieczą o temp. 4°C (Neslab Instruments Inc., Portsmouth, NH, USA). Komórki wirowano, zawieszano w RPMI 1640 i oceniano ich aktywność funkcjonalną.

3.9. Ocena uwolnienia TNF, IL-10, IL-12 przez subpopulacje monocytów stymulowane LPS/IFNγ i komórkami nowotworowymi (HPC-4).

Sortowane subpopulacje monocytów CD14⁺⁺CD16⁺ oraz CD14⁺CD16⁻ były hodowane w ilości 2 x $10^{5}/200 \mu$ l/dołek, w obecności LPS (1ug/ml) i IFN γ (400U/ml) lub komórek nowotworowych HPC-4 w stosunku 1:0,3 w płaskodennych 96-dołkowych płytkach (Nunc, Roskilde, Dania). Hodowle prowadzono 18 godzin w temp. 37°C, w atmosferze 5% CO₂. Nadsącza z hodowli zbierano, przechowywano w temp. -80° a następnie testowano na obecność TNF i IL-10, IL-12 metoda ELISA. Użyto następujacych przeciwciał: dla TNF klon Mab1(Capture) i Mab11 (Detection); dla IL-10 klon JES3-9D7 (Capture) i JES3-12G8 (Detection); dla IL-12p40 klon C8.3 (Capture) i C8.6 (Detection) (PharMingen). Do każdego dołka płytki hodowlanej do ELISA (Nunc Maxisorb, Roskilde, Dania) dodawano po 50 µl antycytokinowego przeciwciała wiążącego (capture antibody) o stężeniu 2 µg/ml roztworu wiążącego (binding solution, PharMingen). Po całonocnej inkubacji w temp. 4°C i dodaniu buforu blokującego (blocking buffer, PharMingen) w ilości 200 µl na dołek, płytki inkubowano przez 2 godziny w temp. pokojowej, a następnie płukano 3-krotnie w PBS/Tween (Fluka Chemie, Buchs, Szwajcaria). Po dodaniu badanych supernatantów oraz rekombinowanych TNF, IL-10 i IL-12p40 (PharMingen) użytych w stężeniach 0, 15, 50, 150, 500, 1500 pg/ml buforu blokujacego/Tween, płytki inkubowano 12 godzin w temp. 4°C i płukano 4-krotnie w PBS/Tween. Nastepnie dodawano biotynylowanych anty-cytokinowych przeciwciał do detekcji (detection antibodies) o stężeniu 1 µg/ml w ilości 100µl na dołek. Po godzinnej inkubacji w temperaturze pokojowej i 4-krotnym płukaniu w PBS/Tween, do każdego dołka dodawano po 100 µl konjugatu peroksydazy chrzanowej ze streptawidyną (streptavidin-HRP, PharMingen) w rozcieńczeniu 1:500 buforem blokującym/Tween. Po 30-minutowej inkubacji i 5-krotnym płukaniu w PBS/Tween do każedego dołka dodawano po 100 µl substratu o składzie: 5 mg ophenylenediamine dihydrochloride (Sigma, St. Louis, MO), 10 ml roztworu phosphate-citrate buffer with urea hydrogen peroxide (Sigma) w 10 ml wody dejonizowanej. Po 5-minutowej inkubacji w temperaturze pokojowej, do dołków dodawano po 100 µl 1N roztworu H₂SO₄. Odczytu dokonywano na czytniku ELISA (Universal Microplate Reader, Bio-Tek Instruments, Vermont) przy długościach fali 492 vs 630 nm. Poziom detekcji dla TNF i IL-12 wynosił 20pg/ml, dla IL-10: 10pg/ml.

3.10. Fagocytoza i produkcja O₂⁻

Fagocytoza i wewnątrzkomórkowa produkcja aktywnej formy tlenu O₂⁻ (wybuch tlenowy) przez komórki CD14⁺⁺CD16⁺ oraz CD14⁺CD16⁻ była mierzona z zastosowaniem cytometru przepływowego (FACS Canto) używano bakterii *Staphylococcus aureus* znakowane FITC oraz [Baran i wsp. 2001]. Komórki po barwieniu anti-CD14-APC i anti-CD16-PE-Cy5 w ilości 10⁶/ml inkubowano w polistyrenowych próbówkach Falcon 2054 (BD), w 37^oC przez 15 min w podłożu RPMI 1640 zawierającym 10µM hydroetydyny (HE, Sigma). Następnie dodawano znakowane FITC bakterie *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (w stosunku 20:1) opsonizowane w obecności 10% ludzkiej surowicy (pulowana świeża ludzka surowica, przechowywana w -80^oC). Komórki inkubowano przez 0,5 godziny w 37^oC. Ocenę przeprowadzano z użyciem cytometru przepływowego (FACSCanto, BD) i oprogramowania DiVa. Oceniano komórki emitujące zieloną fluorescencję (fagocytujące bakterie) oraz czerwoną (produkcja O₂⁻ na skutek aktywacji NADPH-oxydazy) w subpopulacji komórek - FL4 (CD14⁺CD16⁻), i - FL4/FL3 (CD14⁺⁺CD16⁺).

3.11. Allogeniczna mieszana hodowla limfocytów (allo-MLR).

Komórki jednojądrzaste krwi obwodowej uzyskane od zdrowych dawców użyto jako komórki odpowiadające. Allogeniczne komórki jednojądrzaste $(2x10^5)$ dodawano do napromienionych (2500cGy), uprzednio sortowanych komórek CD14⁺ (populacja wyjściowa) oraz subpopulacji CD14⁺CD16⁺ i CD14⁺CD16⁻ (w stężeniu od 1x10⁴ do 1x10⁵). Komórki hodowano w podłożu RPMI 1640 (200µl/dołek) z dodatkiem 10% ludzkiej surowicy AB przez 6 dni. Następnie dodawano 1µCi/dołek ³H-tymidyny (³HTdR, Amersham, Aylesbury, Wielka Brytania) i inkubowano 18 godzin. Komórki zbierano na filtrach z włókna szklanego. Odpowiedź limfocytów na prezentowany antygen była oceniana na podstawie zliczeń ³H-tymidyny w liczniku scyntylacyjnym (Beckman) [Zembala i wsp 1990]. Wynik podawano jako cmp wbudowania tymidyny.

3.12. Analiza statystyczna.

Wyniki przedstawiono w postaci średnich arytmetycznych +/- odchylenie standardowe (SD). Do oceny znamienności statystycznej zastosowano test t Studenta. Za granicę istotności przyjęto wartość p<0,05.

| Przeciwciało przeciwko determinancie | Występowanie determinanty na komórkach |
|--------------------------------------|---|
| CD1a | prekursory komórek dendrytycznych |
| CD3 | limfocyty T |
| CD4 | dojrzałe limfocyty T |
| CD5 | limfocyty T |
| CD7 | limfocyty T, komórki NK |
| CD11a | monocyty/makrofagi, granulocyty, komórki NK, limfocyty T i B |
| CD11b | monocyty/makrofagi, granulocyty, komórki NK, limfocyty T i B |
| CD13 | komórki szeregu mielomonocytarnego i mieloidalnego |
| CD14 | monocyty/makrofagi |
| CD15 | mranulocyty |
| CD16 | monocyty/makrofagi, granulocyty, komórki NK, limfocyty T |
| CD19 | dojrzałe limfocyty B, komórki dendrytyczne |
| CD33 | szeregu mielomonocytarnego i mieloidalnego |
| CD34 | komórki macierzyste/progenitorowe |
| CD38 | wczesne komórki szeregu limfocytarnego |
| CD40 | monocyty/makrofagi, limfocyty B, komórki macierzyste/progenitorowe |
| CD45 | leukocyty |
| CD64 | monocyty/makrofagi, komórki dendrytyczne, |
| CD79a | limfocyty B |
| CD83 | dojrzałe komórki dendrytyczne, limfocyty B |
| CD86 | monocyty/makrofagi, komórki dendrytyczne |
| CD117 | komórki macierzyste/progenitorowe |
| AC133/CD133 | komórki macierzyste/progenitorowe |
| CD163 | monocyty/makrofagi |
| CXCR4 (CD184) | komórki macierzyste/progenitorowe, monocyty/makrofagi, |
| CCR2 | monocyty/makrofagi, limfocyty T, komórki NK, komórki dendrytyczne |
| CCR5 (CD195) | monocyty/makrofagi, granulocyty, limfocyty T |
| HLA-DR | limfocyt B, limfocyty T, monocyty/makrofagi |
| МРО | granulocyty, monocyty |

Tab.1. Wykaz używanych w pracy przeciwciał.

4. WYNIKI

4.1. Izolacja komórek CD34⁺.

Komórki CD34⁺ izolowano z zawiesiny komórek jednojądrzastych z krwi pępowinowej lub szpiku kostnego. Porównywano 2 metody izolacji:

1-z użyciem sortowania immunomagnetycznego na kolumnach MiniMacs

2-sortowanie komórek znakowanych przeciwciałem anty-CD34-PE w cytometrze przepływowym MoFlo.

4.1.1. Wydajność izolacji.

Przy użyciu kolumn MiniMacs z $1x10^7$ komórek jednojądrzastych uzyskiwano średnio $1,1+/-0,4x10^5$ komórek CD34⁺, a stosując sortowanie uzyskiwano średnio $0,5\pm0,26$ $x10^5$ komórek CD34⁺. Czystość i żywotność komórek była porównywalna, co wskazuje, że izolacja na kolumnach jest bardziej wydajna i stosowano ją w dalszych badaniach.

4.1.2. Klonogenność izolowanych komórek CD34⁺.

Komórki CD34⁺ izolowano z krwi pępowinowej dwoma wyżej opisanymi metodami i badano ich klonogenność, tj. zdolność do tworzenia kolonii w medium półpłynnym. Po 14 dniach hodowli liczba kolonii CFU-GM, BFU-E była nieco wyższa, natomiast liczba kolonii CFU-GEMM była istotnie statystycznie wyższa przy użyciu komórek CD34⁺ izolownych na kolumnach MiniMacs (Rys.1).

4.1.3. Chemotaksja izolowanych komórek CD34⁺.

Komórki CD34⁺ izolowano z krwi pępowinowej dwoma wyżej opisanymi metodami i badano ich aktywność chemotaktyczną do SDF-1 bezpośrednio po izolacji i po 3 godzinnej preinkubacji w podłożu hodowlanym IMDM z dodatkiem 0,5% BSA w 37°C. Bezpośrednio po izolacji większą zdolność chemotaksji do SDF-1 wykazywały komórki sortowane, natomiast po 3 godzinnej inkubacji, tj. po "wyciszeniu" komórek, komórki izolowane obu metodami wykazywały podobną chemotaksję (Rys.2, 3). Zatem komórki CD34⁺ izolowane oboma metodami posiadają zbliżone zdolności chemotaktyczne.

4.1.4. Klonogenność komórek CD34⁺ migrujących do SDF-1.

Oceniano zdolność komórek, które migrowały do SDF-1 do tworzenia kolonii. Nieznacznie większą klonogennością charakteryzowały się komórki CD34⁺ po izolacji na kolumnach MiniMacs (Rys.4). W dalszych doświadczeniach wykorzystywano komórki izolowane tą metodą.

4.2. Ekspansja komórek CD34⁺.

4.2.1. Proliferacja izolowanych komórek CD34⁺ i ich charakterystyka immunofenotypowa w krótkoterminowych hodowlach.

Komórki CD34⁺ izolowano z krwi pępowinowej z zastosowaniem kolumn MiniMacs, a następnie poddawano je ekspansji w hodowlach krótkoterminowych (do 7 dnia) celem szczegółowego określenia kinetyki proliferacji, ekspresji poszczególnych determinantów oraz warunków hodowli.

4.2.1.1. Kinetyka ekspansji i immunofenotyp.

W celu ustalenia kinetyki ekspansji izolowanych komórek CD34⁺, w kolejnych dniach hodowli oceniano ich liczbę oraz immunofenotyp. Liczba komórek wzrastała ekspotencjalnie w kolejnych dniach hodowli (Rys.5). W 7 dniu hodowli uzyskano ok. 20 krotny ich wzrost. Odsetek komórek CD34⁺ utrzymywał się na niezmienionym poziomie w granicach 90-95% do 3 dnia hodowli, a następnie 4 dnia gwałtownie spadał (Rys.6). Proporcja komórek CD33⁺ ulegała niewielkim zmianom i w 7 dniu hodowli wyniosła ok. 80%. Nie obserwowano natomiast występowania komórek CD14⁺ i CD15⁺. Wobec spadku proporcji komórek CD34⁺

4.2.1.2. Klonogenność komórek CD34⁺ bezpośrednio po izolacji oraz po 3 dniowej ekspansji.

Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w zdolności komórek CD34⁺ bezpośrednio po izolacji oraz po 3 dniowej ekspansji *in vitro* do tworzenia kolonii CFU-GM, BFU-E, CFU-GEMM (Rys.7).

4.2.1.3. Wpływ różnych podłoży na ekspansję komórek CD34⁺.

Celem opracowanie optymalnych warunków ekspansji, izolowane komórki CD34+ poddawano ekspansji w 4 różnych podłożach z dodatkiem surowicy FBS: X-VIVO10, RPMI, IMDM, DMEM oraz bez surowicy: X-VIVO10, SFEM, StemLineII. Dodatek czynników wzrostowych był identyczny. Na Rys.8 przedstawiono krotnośc wzrostu liczby komórek CD34⁺ w 3 i 7 dniu hodowli. Ponieważ największy wzrost liczby komórek uzyskano stosując podłoże X-VIVO10 + FBS, wykorzystano je w dalszych badaniach nad ekspansją komórek CD34⁺.

4.2.1.4. Wpływ stężenia czynników wzrostowych na ekspansję.

Celem określenia optymalnego stężenia cytokin i czynników wzrostowych prowadzono hodowle komórek CD34+ w podłożu X-VIVO10 + FBS, stosując wyższe i niższe stężenia SCF, IL3, FLT-3L, TPO. Przy zastosowaniu mniejszego stężenia cytokin i czynników wzrostowych nie obserwowano zmniejszenia liczby komórek w 3 dniu ekspansji, ani spadku odsetka komórek CD34⁺ (Rys.9), dlatego w dalszych badaniach stosowano mniejsze stężenia czynników wzrostowych, co znacznie zmniejszało koszt badań.

4.2.1.5. Ekspansja komórek CD34⁺ pochodzących z różnych źródeł.

Komórki CD34⁺ izolowano z krwi pepowinowej, szpiku kostnego lub mobilizowanej krwi obwodowej z zastosowaniem kolumn MiniMacs, a następnie poddawano je ekspansji w hodowlach krótkoterminowych. W 3 dniu hodowli największą liczbę komórek uzyskano przy użyciu krwi pepowinowej (Rys.10). Na rys. 11-16 przedstwiono immunofenotyp komórek CD34⁺ bezpośrednio po izolacji oraz w 3 dniu ekspansji. Bezpośrednio po izolacji odsetek komórek CD34⁺ i CD34⁺CD38⁺ był porównywalny, natomiast po 3 dniowej hodowli najmniejszy w przypadku szpiku kostnego. Proporcja komórek CD38+ po 3 dniach hodowli była bliska 100%. Największy odsetek komórek CD34⁺/CD38⁻ uzyskano bezpośrednio po izolacji z mobilizowanej krwi obwodowej, natomiast po 3 dniach hodowli ilość tych komórek pochodzących z wszystkich źródeł była znikoma. Podobnie zachowywał się odsetek komórek CD133⁺. Odsetek komórek CXCR4⁺ w przypadku wszystkich trzech źródeł był po izolacji zbliżony, natomiast po 3 dniowej ekspansji dochodziło do jego spadku, przy czym był on najwyższy w przypadku szpiku kostnego (Rys.11,12). Markery liniowo specyficzne (CD3⁺, $CD5^+$, $CD7^+$, $CD15^+$) utrzymywały się na zbliżonych niskich poziomach zarówno po izolacji jak i po hodowli. Odsetek komórek CD33⁺ wzrastał w 3 dniu hodowli (z 84,8<u>+</u>9,7% do 92,9<u>+</u>5,8%), ale był porównywalny na komórkach z 3 źródeł (Rys.13,14). Najniższą ekspresję CD117 bezpośrednio po izolacji znajdowano na komórkach krwi pępowinowej, ale przy jej znaczącym spadku po hodowli 3 dniowej, która na tych komórkach paradoksalnie była najwyższa (Rys.13,14). Ekspresję CD13 obserwowano na około 90-98% komórek CD34+ bezpośrednio po izolacji ze wszystkich źródeł i podobnej proporcji komórek po 3 dniach hodowli. Proporcja

komórek CD34⁺ wykazująca ekspresję CD133 była najwyższa na komórkach pochodzących z krwi obwodowej (statystycznie nieistotne) i obniżała się znacząco po 3 dniach hodowli, zwłaszcza na komórkach pochodzących ze szpiku kostnego (Rys.15, 16). Nie obserwowano występowania komórek T i B (CD3 i CD79a), a proporcja komórek wykazujących ekspresję MPO wynosiła ok. 10% i spadła do ok. 5% hodowanych komórek. Biorąc pod uwagę liczbę uzyskanych komórek w hodowli oraz ich immunofenotyp, stwierdzono, że najlepszym źródłem komórek CD34⁺ do ekspansji jest krew pępowinowa, dlatego w dalszych doświadczeniach stosowano to źródło komórek CD34⁺.

4.2.1.6. Wpływ różnych surowic na ekspansję komórek CD34⁺ izolowanych z krwi pępowinowej.

Porównano immunofenotyp oraz liczbę komórek w 3 dniu ekspansji, w zależności od zastosowanej surowicy (FBS, lub surowica ludzka z krwi pępowinowej). Liczba komórek w obu przypadkach była porównywalna (0,8±0,57x10⁶ oraz 0,9±0,6x10⁶). Podobnie nie stwierdzono różnic w ekspresji CD34⁺, CD38⁺, CXCR4, CD133⁺, CD13⁺, CD15⁺, CD7⁺, MPO i CD79a (Rys.17). Zatem nie stwierdzono istotnej przewagi ludzkiej surowicy z krwi pępowinowej w porównaniu do FBS. Ponieważ jednak stosowanie surowicy obcogatunkowej budzi zastrzeżenia co do możliwości kontaminacji komórek ludzkich nieznanymi/znanymi wirusami, wskazuje to na możliwość stosowania surowicy ludzkiej do ekspansji komórek do celów klinicznych.

4.2.1.7. Wpływ sposobu prowadzenia hodowli na proliferację komórek.

Porównano 2 sposoby prowadzenia hodowli: zmianę połowy podłoża hodowlanego co 3-4 dni hodowli, lub stałe wyjściowe inoculum komórek $(1x10^5)$ przenoszono do nowego podłoża hodowlanego co 3-4 dni hodowli. Ten drugi sposób prowadził do zwiększenia liczby komórek z 4,7 do 5,4 razy, 30 do 34 razy, 75 do 87 razy i 142 do 225 razy odpowiednio w 3, 7 10 i 14 dniu ekspansji (Rys.18).

4.2.2. Proliferacja izolowanych komórek CD34⁺ i ich charakterystyka immunofenotypowa w długoterminowych hodowlach.

Wobec stwierdzenia, że w 7 dniu hodowli komórki pozostają nadal w ekspotencjalnej fazie wzrostu podjęto badania nad ustaleniem kinetyki w hodowlach długoterminowych (-do 21 dnia).

4.2.2.1. Kinetyka ekspansji i immunofenotyp.

Znaczny wzrost liczby komórek obserwowano do 14 dnia hodowli (ok. 35 krotny), a następnie tylko niewielki przyrost ich liczby (Rys.19). Rys. 6-8 przedstawiają immunofenotyp proliferujących komórek w kolejnych dniach hodowli. Odsetek komórek CD34⁺, CD34⁺/CD38⁺ i CD34⁺/CD38⁻ gwałtownie obniżał się po 7 dniach hodowli, a w 21 dniu komórek CD34⁺ nie stwierdzano. Natomiast ekspresja CD38⁺ nie ulegała istotnym zmianom w trakcie 21 dniowej hodowli (Rys.20). Proporcja komórek CD34⁺ wykazujących koekspresję HLA-DR również gwałtownie spadała powyżej 3 dnia hodowli (Rys.21). Odsetek komórek HLA-DR⁺ istotnie obniżał się w 14 dniu hodowli, ale jeszzce w 21 dniu hodowli obserwowano ok. 10% takich komórek. Wskazuje to, iż znacznie dłużej utrzymują się w hodowli takie komórki, a ekspresja HLA-DR dotyczy najprawdopodobniej komórek CD33⁺.W dalszych dniach hodowli główną populację stanowiły komórki wykazujące ekspresję CD33 oraz CD38 (80-100%), natomiast w małym stopniu CD34 (Rys.20, 22). Wysoki odsetek komórek CD13⁺ ulegał obniżeniu po 7 dniach i utrzymywał na poziomie ok. 60% (Rys.22), podczas gdy komórki CD117⁺ stanowiły około 50-60% i ich spadek obserwowano dopiero w 21 dniu hodowli. W tym czasie nie stwierdzono obecności komórek CD5⁺ i CD7⁺ (Rys.22).

4.2.2.2. Klonogenność komórek CD34⁺ bezpośrednio po izolacji oraz w kolejnych dniach ekspansji długoterminowej.

Zdolność komórek CD34⁺ do tworzenia kolonii CFU-GM, BFU-E oraz CFU-GEMM oceniano bezpośrednio po izolacji oraz w kolejnych dniach hodowli. Do 3 dnia nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic (Rys.23). Od 7 dnia hodowli klonogenność uległa obniżeniu. Istotny statystycznie spadek kolonii BFU-E oraz CFU-GEMM obserwowano już w 7 dniu hodowli, natomiast liczba kolonii CFU-GM spadała stopniowo. Istotne obniżenie stwierdzono dopiero w dniu 21. Powyższe wyniki potwierdziły, że optymalny czas do ekspansji komórek CD34⁺ wynosi 3-4 dni.

4.3. Ocena zdolności komórek CD34⁺ po ekspansji do repopulacji u myszy SCID.

Komórki CD34⁺ bezpośrednio po izolacji oraz po 3 i 7 dniach ekspansji podawano uprzednio naświetlanym subletalną dawką promieniowania γ myszom SCID w dawce 1x10⁵ do 1x10⁶ komórek/200ul/mysz. Po 6 tygodniach w szpiku kostnym myszy w obydwu grupach (3 i 7 dzień ekspansji) stwierdzono ludzkie progenitorowe komórki hematopoetyczne CD34⁺ i komórki leukocytarne CD45⁺ (Tab.2), co świadczy o zdolnościach repopulacyjnych komórek uzyskiwanych z ekspansji. Jednakże na podstawie występowania odsetka komórek CD45⁺,

CD38⁺ i CD33⁺ w szpiku kostnym myszy stwierdzono, że największe zdolności repopulacyjne wykazywały komórki bezpośrednio po izolacji. Komórki CD34⁺ po 3 dniowej ekspansji charakteryzowały się większą zdolnością repopulacyjną (stwierdzono dwukrotnie większą liczbę tych komórek w szpiku kostnym myszy SCID). Stwierdzono obecność komórek CD38⁺ (wczesne komórki szeregu limfocytarnego), brak komórek CD19⁺ i CD4⁺ (dojrzałe limf. B i T), natomiast w obydwu grupach nastąpiła odbudowa szeregu mielomonocytarnego i mieloidalnego (obecność komórek CD13⁺, CD33⁺). Proporcja tych ostatnich była wyższa w przypadku podania komórek hodowanych przez 7 dni (Tab.2).

4.4. Różnicowanie komórek CD34⁺ bezpośrednio po izolacji do monocytów/makrofagów.

Komórki CD34⁺ izolowano z krwi pępowinowej z zastosowaniem kolumn MiniMacs, a następnie poddawano je różnicowaniu do monocytów/makrofagów.

4.4.1. Wpływ różnych podłoży hodowlanych na proliferację i różnicowanie komórek CD34⁺ do monocytów/makrofagów.

Hodowle komórek CD34⁺ prowadzono w różnych podłożach (RPMI 1640, IMDM, DMEM, MEMalfa) z dodatkiem 20% FBS oraz czynników wzrostowych i różnicujących (25ng/ml SCF, 30ng/ml IL-3, 30ng/ml FLT-3L, 30ng/ml M-CSF). W 7 dniu hodowli największą liczbę komórek uzyskano stosując podłoże IMDM (wzrost około 35 krotny), w 14 dniu hodowli podobną liczbę uzyskano w przypadku podłoża IMDM oraz RPMI (wzrost około 70-krotny) (Rys.24A). W 7 dniu hodowli największy odsetek komorek CD14⁺ uzyskano stosując podłoże IMDM (Rys. 24B). W 14 dniu hodowli odsetek komórek CD14⁺ był największy przy zastosowaniu podłoże MEMalfa (Rys.24B). Biorąc pod uwagę bezwzględną liczbę komórek CD14⁺ w 7 i 14 dniu hodowli najbardziej optymalne było zastosowanie podłoża IMDM uzyskano bowiem odpowiednio 6 i 8 krotny wzrost liczby komórek CD14⁺.

4.4.2. Wpływ różnych surowic na proliferację i różnicowanie komórek CD34⁺ do monocytów/makrofagów.

Celem opracowania optymalnych warunków proliferacji i różnicowania komórek do monocytów/makrofagów, izolowane komórki CD34⁺ hodowano 14 dni w podłożu z dodatkiem różnych surowic: płodowej bydlęcej, końskiej, syntetycznej i ludzkiej grupy krwi AB. Największą zdolność do proliferacji izolowane komórki CD34⁺ wykazywały w podłożu zawierającym surowicę bydlęcą, bowiem w 7 i 14 dniu hodowli obserwowano około 16 krotny i 25 krotny, odpowiednio, przyrost liczby komórek. (Rys.25A). Podobny, choć mniejszy wzrost obserwowano przy użyciu surowicy końskiej. Surowica syntetyczna i ludzka grupy AB okazały się mało przydatne. Również największy odsetek komórek CD14⁺ obserwowano w przypadku użycia FBS (Rys.25B), stąd w dalszych eksperymentach używano tej surowicy.

4.4.3. Wpływ różnych czynników wzrostowych na proliferację i różnicowanie komórek CD34⁺ do monocytów/makrofagów.

Hodowle komórek CD34⁺ prowadzono w podłożu IMDM z dodatkiem 20% surowicy bydlęcej oraz różnych czynników wzrostowych (25ng/ml SCF, 30ng/ml IL-3, 30ng/ml FLT-3L, 30ng/ml M-CSF) oraz różnych ich kombinacji. Największy odsetek komórek CD14⁺ uzyskano stosując jedynie M-CSF (Rys.26B), jednakże liczba komórek była w tym przypadku najmniejsza (Rys.26A). Zatem, większą liczbę komórek uzyskiwano stosując szerszy zakres czynników wzrostowych. Porównując bezwzględną liczbę komórek CD14⁺ najbardziej optymalne okazało się zastosowanie następujących czynników wzrostowych: M-CSF + SCF + FLT-3L + IL-3 (bezwzględna liczba komórek CD14⁺ wynosiła $3x10^5$ oraz $4x10^5$ odpowiednio w 7 i 14 dniu hodowli). Takie podłoże stosowano w dalszych eksperymentach.

4.5. Dwuetapowe generowanie komórek CD14⁺.

Celem sprawdzenia wpływu wstępnej ekspansji na generowanie monocytów prowadzono różnolegle hodowle komórek CD34⁺ bezpośrednio po izolacji oraz komórek poddanych wstępnej 3 dniowej ekspansji.

4.5.1. Immunofenotyp komórek poddanych różnicowaniu w kierunku monocytów bezpośrednio po izolacji komórek CD34⁺ oraz po 3 dniowej wstępnej ekspansji.

Różnicowanie komórek w kierunku monocytów prowadzono w podłożu IMDM z dodatkiem 20% FBS oraz czynników wzrostowych (25ng/ml SCF, 30ng/ml IL-3, 30ng/ml FLT-3L, 30ng/ml M-CSF). Największy wzrost ilości komórek uzyskano po 14 dniach hodowli (3 dni ekspansji i 11 dni różnicowania) (262±101 krotności) w porówaniu do komórek bezpośrednio po izolacji hodowanych w podłożu różnicującym przez 14 dni (41±20) (Rys.27A). Wstępna 3 dniowa ekspansja komórek CD34⁺, a następnie różnicowanie powodowała zwiększenie odsetka komórek CD14⁺ w porównaniu z użyciem komórek CD34⁺ bezpośrednio po izolacji (Rys.27B). Najwyższy odsetek komórek CD14⁺ obserwowano przy użyciu komórek poddanych 3 dniowej ekspansji a następnie 7 dniowemu różnicowaniu (37%), bezwzgledny wzrost liczby komórek CD14⁺ wynosił średnio 80 razy. W przypadku użycia komórek CD34⁺ bezpośrednio po izolacji bezwzględny wzrost ilości monocytów CD14⁺ był 10 krotnie mniejszy. Podobnie zachowywały się komórki CD16⁺, choć ich proporcje były niższe.
4.5.2. Wpływ różnych podłoży hodowlanych na proliferację i różnicowanie komórek CD34⁺ poddanych 3 dniowej wstępnej ekspansji do monocytów/makrofagów.

W 7 dniu różnicowania po wstępnej ekspansji 3 dniowej, największą liczbę komórek uzyskano stosując podłoże RPMI 1640, a niewiele mniejszą przy użyciu podłoża IMDM (Rys.28A). Największy odsetek komórek CD14+ uzyskano stosując podłoże MEMalfa (Rys.28B), ale bezwzględna liczba komórek była mniejsza niż w przypadku RPMI 1640 i IMDM. Biorąc pod uwagę bezwzględna liczbę komórek CD14⁺ w 7 dniu różnicowania najbardziej optymalne okazało się zastosowanie podłoża RPMI lub IMDM.

4.5.3. Wpływ różnych surowic na proliferację i różnicowanie komórek CD34⁺ poddanych 3 dniowej wstępnej ekspansji do monocytów/makrofagów.

Komórki CD34⁺ po 3 dniowej ekspansji hodowano przez 7 i 14 dni w podłożu IMDM z dodatkiem czynników wzrostowych (25ng/ml SCF, 30ng/ml IL-3, 30ng/ml FLT-3L, 30ng/ml M-CSF) oraz różnych surowic (płodowej bydlęcej, końskiej, ludzkiej grupy AB oraz syntetycznej). Największy przyrost liczby komórek uzyskano stosując FBS (Rys.29A), natomiast odsetek komórek CD14⁺ był porównywalny, jednak wyższy w dniu 7 niż w 14 (Rys.29B). Biorąc pod uwagę bezwzględną liczbę komórek CD14⁺ optymalnym okazało się zastosowanie FBS i 7 dniowy czas hodowli, albowiem uzyskano 55 krotny wzrost, po uwzględnieniu wstępnej ekspansji (Rys.29A i B). Natomiast surowica syntetyczna okazała się nieprzydatna, bowiem zarówno przyrost ilości komórek jak i monocytów CD14⁺ był znikomy.

4.5.4. Wpływ różnych czynników wzrostowych na proliferację i różnicowanie komórek CD34⁺ poddanych 3 dniowej wstępnej ekspansji do monocytów/makrofagów.

Komórki CD34⁺ po 3 dniowej ekspansji hodowano przez 7 i 14 w podłożu IMDM z dodatkiem 20% FBS oraz różnych kombinacji czynników wzrostowych (SCF, IL-3, FLT-3L, M-CSF). Zarówno w 7 jak i 14 dniu hodowli największą liczbę komórek uzyskano stosując czynniki wzrostowe: M-CSF + SCF + FLT-3L + IL-3, odpowiednio 45 i prawie 80 krotny wzrost liczby komórek (Rys.30A). Największy odsetek komórek CD14⁺ uzyskano stosując M-CSF+ IL-3 (Rys.30B), jednakże liczba komórek była w tym przypadku była mniejsza (wzrost 37 krotny w 7 dniu i 48 krotny w 14 dniu). Porównując bezwzględną liczbę komórek CD14⁺ najbardziej optymalne okazało się zastosowanie następujących czynników wzrostowych: M-CSF + SCF + FLT-3L + IL-3 (przyrost 10-krotny oraz 11–krotny odpowiednio w 7 i 14 dniu hodowli). To podłoże stosowano w dalszych badaniach (standardowe podłoże różnicujące).

4.5.5. Klonogenność komórek CD34⁺ bezpośrednio po izolacji oraz po 10 dniach hodowli (3 dni ekspansji + 7 dni różnicowania).

Liczba kolonii CFU-GM bezpośrednio po izolacji oraz w 10 dniu hodowli była porównywalna, natomiast liczba kolonii BFU-E oraz była znacznie mniejsza, nie stwierdzono natomiast kolonii CFU-GEMM (Rys.31). Dane te wskazują, ze uzyskane komórki są bardziej ukierunkowane liniowo do monocytów/granulocytów.

4.5.6. Różnicowanie komórek CD34⁺ poddanych 7 i 10 dniowej wstępnej ekspansji, do monocytów/makrofagów.

Celem sprawdzenia jak wpływa dłuższy okres ekspansji na różnicowanie komórek do monocytów/makrofagów, komórki CD34⁺ poddawano 3, 7 i 10 dniowej wstępnej ekspansji, następnie różnicowaniu przez 4 - 14dni. Niezależnie od czasu trwania ekspansji, największy odsetek komórek CD14⁺ uzyskiwano w 7-10 dniu różnicowania (Rys.32B), natomiast największą bezwzględną liczbę komórek CD14⁺ uzyskano w 14 dniu różnicowania po 10 dniach ekspansji (wzrost blisko 700-krotny, licząc od początku hodowli) (Rys.32A).

4.5.7. Izolacja komórek CD14⁺ i ich dalsza hodowla.

W celu sprawdzenia zdolności do proliferacji zróżnicowanych monocytów po 3 dniach ekspansji i 7 dniach różnicowania izolowano komórki CD14⁺ z zastosowaniem systemu MiniMacs i dalej prowadzono hodowle w standardowym podłożu różnicującym. W kolejnych dniach hodowli liczba komórek CD14⁺ utrzymywała się na stałym poziomie (Rys.33), co wskazuje, że odróżnicowane monocyty nie posiadają zdolności do proliferacji.

4.5.8. Występowanie dwóch subpopulacji monocytów uzyskanych w wyniku dwuetapowej hodowli: ekspansji i różnicowania komórek CD34⁺.

Niezależnie od czasu trwania wstępnej ekspansji i stosując 7-10 dniowe różnicowanie, przy użyciu podwójnego barwienia przeciwciałami anty-CD14 i -CD16 stwierdzono obecność dwóch subpopulacji komórek CD14⁺CD16⁺ oraz CD14⁺CD16⁻ występujących w stosunku 2:1. Subpopulację CD14⁺CD16⁺ charakteryzowała wyższa ekspresja CD14 mierzona MFI (Mean Fluorescence Intensity) niż subpopulację CD14⁺CD16⁻ (Ryc. 34). Stąd subpopulacje te określono jako CD14⁺CD16⁻ i CD14⁺⁺CD16⁺.

Stosując barwienie hematoksyliną-eozyną wykazano różnice w morfologii komórek tych subpopulacji (Fot. 1.). Komórki CD14⁺CD16⁻ były mniejsze, okrągłe, miały nerkowate jądro i gładką powierzchnię, zatem morfologicznie odpowiadały monocytom. Komórki CD14⁺⁺CD16⁺

były większe, miały obfitą cytoplazmę zawierającą wakuole, małe okrągłe jądro i nieregularną powierzchnię, co odpowiada morfologii makrofaga.

4.5.9. Charakterystyka immunofenotypowa subpopulacji monocytów.

Po 3 dniach ekspansji izolowanych komórek CD34⁺ komórki hodowano przez 7-10 dni w standardowym podłożu różnicującym a następnie barwiono stosując technikę potrójnego barwienia. Większość komórek (>90%) była CD11a⁺, CD13⁺, CD33⁺, natomiast nie stwierdzono występowania różnic w ekspresji pomiędzy subpopulacjami CD14⁺⁺CD16⁺ oraz CD14⁺⁺CD16⁻, a także różnic w intensywności fluorescencji. Nie stwierdzono obecności CD1a, CD83, CD80. Subpopulacja CD14⁺⁺CD16⁺ charakteryzowała się większym odsetkiem oraz większą intensywnością fluorescencji komórek CD40+, CD163+, CXCR4+ oraz HLA-DR+, oraz zwiększonym odsetkiem CD11a, CD64, CCR5. Liczba komórek CCR2 (ale nie MFI) na tej subpopulacji była mniejsza (Tab.3). Wskazuje to na różnice między tymi subpopulacjami nie tylko w występowaniu CD16, ale także innych determinant.

4.5.9. Wpływ dodatkowych czynników różnicujących na dojrzewanie komórek do monocytów (1α,25 dihydroxywitaminy D3, CD40L).

Komórki CD34⁺ po wstępnej ekspansji poddawano 14 dniowej hodowli w standardowym podłożu różnicującym oraz dodatkeim VD3 lub CD40L. Dodatek VD3 nie zwiększał proliferacji (Rys.35A), ale powodował zwiększenie odsetka komórek CD14⁺ z 39,6%±27,2 % do 73,0%±16,3% w 7 i z 21,4%±10% do 77,3%±12% w 10 dniu różnicowania (Rys.35B) oraz zmniejszenie odsetka komórek CD14⁺CD16⁺ w 7 dniu różnicowania z 12,8±5% na 2,6±1,3% (Rys.35C) w porównaniu ze standardowym protokołem, przy porównywalnym wzroście liczby komórek (Rys.35A). Dodatek CD40L zwiększał nieznacznie proliferację komórek (Rys.35A), ale nie wpływał istotnie na proporcje subpopulacji monocytów (Rys.35C).

4.6. Ocena funkcjonalna uzyskanych w wyniku ekspansji i różnicowania do monocytów/makrofagów subpopulacji komórek CD14⁺⁺CD16⁺ oraz CD14⁺CD16⁻.

4.6.1. Ocena zdolności do fagocytozy opsonizowanych bakterii Staphylococcus aureus oraz produkcji reaktywnych form tlenu (anionu ponadtlenkowego) przez subpopulacje komórek CD14⁺⁺CD16⁺ oraz CD14⁺CD16⁻.

Subpopulacja monocytów CD14⁺CD16⁻ wykazywała znaczną zdolność do fagocytozy *S. aureus* i niską oksydację HE po fagocytozie (Rys.36). Monocyty CD14⁺CD16⁺ wykazywały mniejszą aktywność fagocytarną i wysoką spontaniczną ekspresję HE, która nie wzrastała po fagocytozie (Rys.36).

4.6.2. Ocena zdolności do produkcji cytokin przez subpopulacje komórek CD14⁺⁺CD16⁺ oraz CD14⁺CD16⁻.

Uzyskane w wyniku ekspansji (3-7 dni) i różnicowania (7-10dni) komórki sortowano (z wyjątkiem 4.5.1) na 2 subpopulacje CD14⁺⁺CD16⁺ oraz CD14⁺⁺CD16⁻, które poddawano testom czynnościowym. Izolowane subpopulacje komórek komórek CD14⁺⁺CD16⁺ oraz CD14⁺⁺CD16⁻ hodowano przez 18 godzin w podłożu z dodatkiem lub bez czynników stymulujących: LPS/IFNγ lub komórek nowotworowych (linia komórkowa HPC-4). Przy użyciu ELISA oceniano stężenie IL-10, IL-12 i TNF w supernatantach z hodowli. Obydwie subpopulacje nie uwalniały TNF ani IL-10, ale produkowały IL-12p40. Subpopulacja CD14⁺⁺CD16⁺ produkowała znacząco więcej IL-12 niż subpopulacja CD14⁺⁺CD16⁻ (Rys.37).

4.6.3. Ocena zdolności indukcji allo-MLR przez subpopulacje komórek CD14⁺⁺CD16⁺ oraz CD14⁺CD16⁻.

Porównując zdolności obydwu subpopulacji do indukcji allo-MLR, stwierdzono, że subpopulacja CD14⁺⁺CD16⁺ charakteryzuje się istotnie większą zdolnością do stymulacji proliferacji allogenicznych komórek jednojądrzastych krwi obwodowej w porównaniu do subpopulacji CD14⁺CD16⁻ (Rys.38).



Rys.1. Liczba kolonii (CFU-GM, BFU-E, CFU-GEMM) uzyskanych w 14 dniu hodowli komórek CD34⁺.

Komórki CD34⁺ izolowane dwoma metodami: sortowanie immunomagnetycznego (MiniMacs) i sortowanie w cytometrze przepływowym (MoFlo) hodowano w podłożu półpłynnym (IMDM, 1%metyloceluloza, 30% płodowa surowica cielęca, 1% albumina wołowa, 10⁻⁴M 2merkaptoetanol, 2mM L-glutamina, oraz cytokiny 3U/ml Epo, 50ng/ml SCF, 10ng/ml IL3, 10ng/ml GM-SCF). W 1 ml podłoża zawieszano 5000 komórek CD34+. Po 14 dniach hodowli w mikroskopie odwracalnym oceniano liczbę kolonii. Wykres przedstawia średnią <u>+</u> SD z 7 eksperymentów przeprowadzonych w duplikatach. * $p \leq 0,05$.



Rys.2. Chemotaksja komórek CD 34⁺ izolowanych z krwi pępowinowej do SDF-1 bezpośrednio po izolacji (czas 0h) oraz po 3 godzinnej preinkubacji. A – izolacja metodą immunomagnetyczną (MiniMacs) B – izolacja w cytometrze przepływowym (MoFlo)

Komórki izolowano w/w metodami. Bezpośrednio po izolacji (czas 0h) oraz po 3h inkubacji w 37°C (czas 3h) badano zdolność do chemotaksji uzyskanych komórek CD 34⁺ do podłoża IMDM (z 0,5% BSA) z dodatkiem SDF-1 (300 ng/ml). Chemotaksję prowadzono przez 3h w 37°C, a ilość komórek w komorze dolnej analizowano za pomocą cytometru przepływowego. Wykres przedstawia wynik jednego, wybranego eksperymentu.



Rys.3. Chemotaksja komórek CD34⁺ izolowanych z krwi pępowinowej do SDF-1. Metodologia jak podano w opisie do Rys.2.

Wykres przedstawia średnią \pm SD z pięciu eksperymentów.



Rys.4. Ocena klonogenności komórek CD34⁺ migrujących do SDF-1.

Komórki CD 34^+ izolowano z krwi pępowinowej na kolumnach MiniMacs oraz za pomocą sortera komórkowego MoFlo. Po chemotaksji do SDF-1 badano klonogenność komórek CD 34^+ z dolnej komory. Metodologia jak na Rys.1. Klonogenność obliczano jako procent komórek tworzących kolonie w porównaniu do komórek migrujących do dolnej komory. Wykres przedstawia średnią ± SD z trzech eksperymentów.





Komórki CD34⁺ izolowano z krwi pępowinowej i hodowano w podłożu X-VIVO 10 z dodatkiem 4% FBS oraz czynników wzrostowych (50ng/ml SCF, 30ng/ml IL-3, 30ng/ FLT-3L, 15ng/ml TPO). Wyjściowa liczba komórek wynosiła 1×10^5 . Wykres przedstawia średnią ± SD z pięciu eksperymentów.



Rys.6. Proliferacja izolowanych komórek CD34+ i ich charakterystyka immunofenotypowa. Metodologia jak na Rys.5. W kolejnych dniach ekspansji oceniano występowanie na komórkach wybranych markerów powierzchniowych (CD34, CD33, CD15, CD14). W cytometrze przepływowym oceniano % komórek dodatnich, stosując technikę pojedynczego znakowania. Wykres przedstawia średnią \pm SD z czterech eksperymentów.



Rys.7. Klonogenność komórek CD34⁺ *bezpośrednio po izolacji oraz po 3 dniowej ekspansji*. Metodologia hodowli jak na Rys.1. Oceniano tworzenie kolonii przez komórki bezpośrednio po izolacji oraz w 3 dniu hodowli prowadzonej jak na Rys.5. Wykres przedstawia średnią \pm SD z 6 eksperymentów przeprowadzanych w duplikatach.



Rys.8. Wpływ różnych podłoży na ekspansję izolowanych komórek CD34.

Izolowane komórki CD34⁺ poddawano 7 dniowej ekspansji w podłożach: X-VIVO 10, RPMI 1640, IMDM, DMEM, SFEM, StemLine, z czynnikami wzrostowymi jak na Rys.5 oraz z dodatkiem (podłoża X-VIVO 10, RPMI 1640, IMDM, DMEM) lub bez FBS (podłoża X-VIVO 10, SFEM, StemLine). W 3 i 7 dniu hodowli oceniano liczbę komórek oraz % komórek CD34⁺. Na wykresie przedstawiono bezwzględną liczbę komórek CD34⁺. Wyjściowa liczba komórek CD34⁺ użytych do hodowli wynosiła 1x10⁵. Wykres przedstawia średnią \pm SD z czterech eksperymentów.



Rys. 9. Porównanie ekspresji markerów powierzchniowych na komórkach CD34⁺ poddanych 3 dniowej ekspansji w podłożu X-VIVO 10 w zależności od stężenia użytych czynników wzrostowych.

Komórki CD34⁺ wyizolowane z krwi pępowinowej poddano 3 dniowej ekspansji w podłożu X-VIVO 10 z dodatkiem 4% FBS oraz cytokin (SCF + IL-3 + FLT-3L + TPO). Czynniki wzrostowe dodawano do hodowli w stężeniach:

| 100ng/ml SCF | 50ng/ml SCF |
|-----------------|--------------|
| 60ng/ml IL-3 | 30ng/ml IL-3 |
| 100ng/ml FLT-3L | 30ng/ FLT-3L |
| 100ng/ml TPO | 15ng/ml TPO |

Liczba komórek w 3 dniu ekspansji wynosiła 0.8 ± 0.18 dla większego i 0.87 ± 0.32 dla mniejszego stężenia czynników wzrostowych. Wykres przedstawia średnią \pm SD z czterech eksperymentów.



Rys.10. Liczba komórek w 3 dniu hodowli.

Komórki CD34⁺ izolowano z krwi pępowinowej, krwi obwodowej lub szpiku kostnego. Hodowle prowadzono jak na Rys.5. W 3 dniu hodowli określano liczbę komórek. Wyjściowa liczba komórek zawsze wynosiła $1x10^5$. Wykres przedstawia średnią <u>+</u> SD z pięciu eksperymentów



Rys.11. Immunofenotyp komórek CD34⁺ *bezpośrednio po izolacji.*

Metodologia jak na Rys. 10. Po izolacji oceniano ekspresję/koekspresję: CD34, CD38, CXCR4. Wykres przedstawia średnią <u>+</u> SD z pięciu eksperymentów.



Rys.12. Immunofenotyp komórek CD34⁺ *w 3 dniu hodowli.*

Metodologia jak na Rys. 10. W 3 dniu ekspansji oceniano ekspesję/koekspresję CD34, CD38, CXCR4. Wykres przedstawia średnią <u>+</u> SD z pięciu eksperymentów.



Rys.13. Immunofenotyp komórek CD34⁺ bezpośrednio po izolacji. Metodologia jak na Rys. 10. Po izolacji oceniano ekspresję: CD15, CD33, CD7,CD117, CD5. Wykres przedstawia średnią <u>+</u> SD z pięciu eksperymentów.



Rys.14. Immunofenotyp komórek CD34⁺ w 3 dniu hodowli.

Metodologia jak na Rys. 10. W 3 dniu ekspanjsi oceniano ekspresję: CD15, CD33, CD7, CD117, CD5. Wykres przedstawia średnią <u>+</u> SD z pięciu eksperymentów.



Rys.15. Immunofenotyp komórek CD34⁺ *bezpośrednio po izolacji.*

Metodologia jak na Rys. 10. Po izolacji oceniano ekspresję: CD13, CD133, CD3, MPO, CD79a. Wykres przedstawia średnią <u>+</u> SD z pięciu eksperymentów.



Rys. 16. Immunofenotyp komórek CD34⁺ w 3 dniu hodowli.

Metodologia jak na Rys. 10. W 3 dniu ekspansji oceniano ekspresję: CD11, CD133, CD3, MPO, CD79a. Wykres przedstawia średnią <u>+</u> SD z pięciu eksperymentów.



Rys. 17. Porównanie ekspresji wybranych markerów powierzchniowych na komórkach CD34⁺ *poddanych 3 dniowej ekspansji, w zależności od zastosowanej surowicy (cielęca lub z krwi pępowinowej).*

Izolowane komórki CD34⁺ poddawano 3 dniowej ekspansji w medium X-VIVO 10 z dodatkiem czynników wzrostowych (50ng/ml SCF, 30ng/ml IL-3, 30ng/ FLT-3L, 15ng/ml TPO) oraz 4% FBS lub 4% surowicy z autologicznej krwi pępowinowej. W 3 dniu hodowli oceniano liczbę komórek oraz występowanie na komórkach niektórych markerów powierzchniowych. Stosowano technikę pojedynczego oraz podwójnego znakowania. Ilość komórek w 3 dniu ekspansji wynosiła przy użyciu FBS $0,8\pm0,57\times10^6$, a przy użyciu surowicy z autologicznej krwi pępowinowej $0,9\pm0,6\times10^6$. Wyjściowe inokulum wynosiło 1×10^5 komórek. Wykres przedstawia średnią ± SD z pięciu eksperymentów.



Rys.18. Wpływ sposobu prowadzenia hodowli na proliferację komórek.

Izolowane komórki CD34⁺ poddawano ekspansji w podłożu X-VIVO 10 z dodatkiem czynników wzrostowych (SCF, IL-3, FLT-3L, TPO) oraz 4% FBS. Co 3-4 dni hodowli liczono komórki i zmieniano połowę podłoża hodowlanego lub przenoszono stałą wyjściową liczbę komórek do świeżego podłoża hodowlanego. Wykres przedstawi średnią krotności wzrostu \pm SD z czterech eksperymentów.



Rys.19. Kinetyka proliferacji komórek CD34+

Metodologia jak na rys. 5. Wykres przedstawia średni
ą \pm SD z dziesięciu eksperymentów.



Rys.20. Immunofenotyp izolowanych komórek CD34+ poddanych ekspansji w hodowlach długoterminowych.

Metodologia jak na Rys.5. W kolejnych dniach ekspansji oceniano ekspresję/koekspresję: CD34 i CD38. Wykres przedstawia średnią <u>+</u> SD z pięciu eksperymentów.



Rys.21. Immunofenotyp izolowanych komórek CD34+ poddanych ekspansji w hodowlach długoterminowych.

Metodologia jak na Rys.5. W kolejnych dniach ekspansji oceniano ekspresję/koekspresję: CD34, HLA-DR, CXCR4. Wykres przedstawia średnią <u>+</u> SD z pięciu eksperymentów.



Rys.22. Immunofenotyp izolowanych komórek CD34+ poddanych ekspansji w hodowlach długoterminowych.

Metodologia jak na Rys.5. W kolejnych dniach ekspansji (0, 3, 7, 14, 21) oceniano ekspresję: CD33, CD7, CD117, CD5, CD13. Wykres przedstawia średnią <u>+</u> SD z pięciu eksperymentów.



Rys.23. Klonogenność komórek CD34⁺ *bezpośrednio po izolacji oraz po 21 dniowej ekspansji.* Metodologia jak na Rys.1. Oceniano klonogenność komórek bezpośrednio po izolacji oraz w 3, 7, 14 i 21 dniu hodowli prowadzonej według protokołu opisanego na Rys.5. Wykres przedstawia średnią \pm SD z sześciu eksperymentów przeprowadzanych w duplikatach. * $p \leq 0,05$.

| | Kom CD34+ | CD34 ⁺ po 3 dniach ekspansji | CD34 ⁺ po 7 dniach ekspansji |
|-------|---------------|--|--|
| CD34 | 2,33+/-3,6 | 4,67+/-3,4 | 1,89+/-2,35 |
| CD45 | 13,62+/-13,28 | 4,67+/-4,5 | 2,78+/-2,79 |
| 34/45 | - | 1,43+/-1,2 | 0,88+/-1,0 |
| CD19 | 0 | 0 | 0 |
| CD38 | 5,96+/-14,6 | 1,37+/-1,5 | 0,28+/-0,3 |
| CD14 | - | 0,5+/-0,2 | 0,1+/-0,14 |
| CD33 | 7,5+/-5,2 | 0,1+/-0,17 | 0,9+/-1,2 |
| CD4 | - | 0 | 0,17+/-0,2 |
| CD13 | - | 1,6+/-0,7 | 4,3+/-2,7 |

Tab. 2. Odsetek ludzkich hematopoetycznych komórek w szpiku kostnym myszy SCID w zależności od czasu ekspansji komórek CD34⁺ (3 lub 7 dni).

Komórki CD34⁺ po 3 i 7 dniach ekspansji podawano uprzednio naświetlano promieniowaniem γ myszom SCID w dawce 1x10⁵ do 1x10⁶ komórek/200ul/mysz. Po 6 tygodniach w szpiku kostnym myszy w trzech grupach (podawane komórki CD34⁺ bezpośrednio po izolacji oraz w 3 i 7 dniu ekspansji) oceniano odsetek komórek wykazujących ekspresję ludzkich determinant CD. Wykres przedstawia średnią <u>+</u> SD z pięciu eksperymentów.



Rys.24. Wpływ różnych podłoży hodowlanych na różnicowanie komórek do monocytów/makrofagów.

Izolowane komórki CD34⁺ (1x10⁵) hodowano przez 7 i 14 dni w różnych podłożach hodowlanych: RPMI, IMDM, DMEM, MEMalfa, z dodatkiem FBS oraz różnych czynników wzrostowych (25ng/ml SCF, 30ng/ml IL-3, 30ng/ml FLT-3L oraz 30ng/ml M-CSF jako czynnika różnicującego. Po zakończeniu hodowli określano liczbę komórek (A) oraz % komórek CD14⁺ (B). Wykres przedstawia średnią \pm SD z pięciu eksperymentów.



Rys.25. Wpływ surowicy na różnicowanie komórek do monocytów/makrofagów.

Izolowane komórki CD34⁺ hodowano przez 7 oraz 14 dni na płytkach 24 dołkowych w podłożu IMDM z dodatkiem czynników wzrostowych (25ng/ml SCF, 30ng/ml IL-3, 30ng/ml FLT-3L oraz 30ng/ml M-CSF jako czynnik różnicujący) oraz różnych surowic (bydlęcej - FBS, końskiej - HS, -syntetycznej - SF oraz surowicy ludzkiej grupy krwi AB - AB). Po zakończeniu hodowli, określano liczbę komórek (A) oraz % komórek CD14⁺ (B). Wyjściowo hodowle zakładano z $1x10^{5}$ komórek. Wykres przedstawia średnią <u>+</u> SD z sześciu eksperymentów.



Rys.26. Liczba komórek (A) oraz procentowa zawartość komórek CD14⁺(B) uzyskiwanych w 7 i 14 dniu hodowli w zależności od kombinacji czynników wzrostowych.

Izolowane komórki CD34⁺ (1x10⁵) poddawano różnicowaniu do monocytów/makrofagów jak na Rys.25. Stosowano różne kombinacje czynników wzrostowych. Po 7 i 14 dniach hodowli, oceniano liczbę komórek (A) oraz % komórek CD14⁺ (B). Wykres przedstawia średnią \pm SD z sześciu eksperymentów.





Izolowane komórki CD34⁺ poddawano różnicowaniu do monocytów/makrofagów jak na Rys. 25 z zastosowaniem FBS. Część komórek CD34⁺ poddawano 3 dniowej ekspansji jak na Rys.5. Po tym czasie komórki przenoszono do podłoża hodowlanego i prowadzono różnicowanie w kierunku monocytów/makrofagów jak wyżej. W kolejnych dniach różnicowania oceniano ekspresję: CD34, CD14, CD16, HLA-DR. Wykresy przedstawiają krotność wzrostu liczby komórek (A) oraz % komórek dodatnich (B). Wykres przedstawia średnią ± SD z sześciu eksperymentów.



Rys.28. Wpływ różnych podłoży hodowlanych na różnicowanie komórek do monocytów/makrofagów.

Po 3 dniach ekspansji izolowanych komórek CD34⁺ komórki hodowano przez 7 dni w różnych podłożach (RPMI 1640, IMDM, DMEM, MEMalfa) z dodatkiem 20% FBS oraz czynników wzrostowych (25ng/ml SCF, 30ng/ml IL-3, 30ng/ml FLT-3L, 30ng/ml M-CSF). W 7 dniu oceniano krotnośc wzrostu liczby komórek (A) oraz ekspresję/koekspresję: CD14⁺ (B). Wykres przedstawia średnią \pm SD z sześciu eksperymentów.





Izolowane komórki CD34⁺ po 3 dniach ekspansji (jak na Rys.5) poddawano różnicowaniu do monocytów/makrofagów przez 7 i 14 dni w podłożu IMDM z dodatkiem czynników wzrostowych (25ng/ml SCF, 30ng/ml IL-3, 30ng/ml FLT-3L oraz 30ng/ml M-CSF jako czynnik różnicujący) oraz różnych surowic (FBS, HS, SF oraz AB). Po zakończeniu hodowli, określano krotnośc wzrostu liczby komórek (A) oraz % komórek CD14⁺ (B). Wykres przedstawia wartość średnią \pm SD z sześciu eksperymentów.



Rys.30. Wpływ czynników wzrostowych na różnicowanie komórek do monocytów/makrofagów.

Izolowane komórki CD34⁺ poddawano 3 dniowej ekspansji (jak na Rys.5), a następnie hodowano w podłożu IMDM z 20% FBS oraz dodatkiem różnych kombinacji czynników wzrostowych. Po 7 i 14 dniach różnicowania oceniano krotność wzrostu liczby komórek (A) oraz % komórek CD14⁺ (B). Wykres przedstawia średnią \pm SD z sześciu eksperymentów.



Rys.31. Klonogenność komórek CD34⁺ *bezpośrednio po izolacji lub po 3 dniach ekspansji i 7 dniach różnicowania do monocytów/makrofagów.*

Metodologia jak na Rys.1. Oceniano klonogenność komórek bezpośrednio po izolacji oraz w 7 dniu różnicowania do monocytów/makrofagów w podłożu IMDM z dodatkiem 20% FBS oraz czynników wzrostowych (25ng/ml SCF, 30ng/ml IL-3, 30ng/ml FLT-3L, 30ng/ml M-CSF), określanym jako standartowe podłoże różnicujące, po 3 dniach ekspansji według protokjołu jak na Rys.5. Wykres przedstawia średnią \pm SD z sześciu eksperymentów przeprowadzanych w duplikatach. * $p \leq 0,05$.



Rys.32. Wpływ czasu trwania ekspansji i różnicowania na dojrzewanie komórek w kierunku monocytów/makrofagów.

Komórki CD34+ poddawano ekspansji przez 3, 7 i 10 dni, następnie przenoszono 1×10^{5} komórek do standartowego podłoża różnicującego w/g protokołu jak na Rys.31. i hodowano 4-14 dni. Oceniano liczbę komórek przedstawioną jako krotność (A) wzrostu (licząc od początku hodowli) oraz % komórek CD14⁺ (B). Rysunek przedstawia średnią <u>+</u> SD z czterech eksperymentów.



Rys.33. Hodowla izolowanych komórek CD14⁺.

Komórki hodowano wg protokołu jak na Rys.31, po 7 dniach różnicowania izolowano komórki $CD14^+$ z zastosowaniem systemu MiniMacs i dalej prowadzono hodowle w standardowym podłożu różnicującym. W kolejnych dniach oceniano liczbę komórek oraz % komórek $CD14^+$. Wykres przedstawia średnią <u>+</u> SD z trzech eksperymentów.


Rys.34. Ekspresja CD14 i CD16 na komórkach CD34⁺ poddanych 3 dniowej ekspansji i 7 dniowemu różnicowaniu w kierunku monocytów/makrofagów.

Po 3 dniach ekspansji izolowanych komórek CD34⁺ komórki hodowano przez 7 dni w standardowym podłożu różnicującym. W 7 dniu różnicowania oceniano ekspresję/koekspresję: CD14⁺, CD16⁺ oraz intensywność fluorescencji. Wykres przedstawia wyniki jednego wybranego eksperymentu.



CD14⁺⁺CD16⁺

CD14⁺CD16⁻

Fot.1. Morfologia komórek CD14⁺ oraz subpopulacji CD14⁺⁺CD16⁺ i CD14⁺CD16⁻ uzyskanych z komórek CD34⁺ poddanych 3 dniowej ekspansji i 7 dniowemu różnicowaniu w kierunku monocytów/makrofagów.

Po 3 dniach ekspansji izolowanych komórek CD34⁺ komórki hodowano przez 7 dni w standardowym podłożu różnicującym. W 10 dniu różnicowania z zastosowaniem srtera komórkowego izolowano populację komórek CD14⁺ a następnie subpopulacje CD14⁺⁺CD16⁺ i CD14⁺CD16⁻. Preparaty cytospinowe barwiono hematoksyliną-eozyną. (pow. 1000x)

| | CD14 ⁺⁺ CD16 ⁺ | | CD14 ⁺ | CD16 | |
|--------|--------------------------------------|----------------------|--------------------|---------------------|--|
| | % | MFI | % | MFI | |
| CD11a | 93,2 <u>+</u> 4,4 | 1686 <u>+</u> 367 | 96,2 <u>+</u> 4,6 | 1744 <u>+</u> 368 | |
| CD11b | 96,3 <u>+</u> 3,2 | 12826 <u>+</u> 3742 | 86,1 <u>+</u> 13,6 | 4580 <u>+</u> 2857* | |
| CD13 | 97,1 <u>+</u> 2,7 | 18466 <u>+</u> 10121 | 88,4 <u>+</u> 2,4 | 4329 <u>+</u> 2039 | |
| CD33 | 64,4 <u>+</u> 6 | 5887 <u>+</u> 3341 | 25 <u>+</u> 10* | 3126 <u>+</u> 1599 | |
| CD40 | 16,8 <u>+</u> 6,1 | 895 <u>+</u> 170 | 6 <u>+</u> 2,2* | 275 <u>+</u> 178* | |
| CD64 | 72,4 <u>+</u> 13,7 | 2189 <u>+</u> 238 | 70 <u>+</u> 8,7 | 859 <u>+</u> 317* | |
| CD86 | 34 <u>+</u> 16,5 | 2050 <u>+</u> 50 | 29,3 <u>+</u> 9,8 | 841 <u>+</u> 157 | |
| CD163 | 77,8 <u>+</u> 24,5 | 8245 <u>+</u> 2337 | 18,8 <u>+</u> 13* | 1549 <u>+</u> 1074* | |
| HLA-DR | 90,1 <u>+</u> 11,1 | 16535 <u>+</u> 6404 | 51,9 <u>+</u> 10,6 | 1237 <u>+</u> 450* | |
| CCR2 | 2,7 <u>+</u> 1,8 | 605 <u>+</u> 248 | 19,6 <u>+</u> 12,6 | 456 <u>+</u> 154 | |
| CCR5 | 7,1 <u>+</u> 4,6 | 1061 <u>+</u> 173 | 10,5 <u>+</u> 11,7 | 482 <u>+</u> 125* | |
| CXCR4 | 38,8 <u>+</u> 10,6 | 3231 <u>+</u> 1003 | 17,2 <u>+</u> 10,2 | 1449 <u>+</u> 683 | |

Tab. 3. Charakterystyka immunofenotypowa subpopulacji monocytów.

Po 3 dniach ekspansji izolowanych komórek $CD34^+$ komórki hodowano przez 7 dni w standardowym podłożu różnicującym. W 7 dniu różnicowania oceniano ekspresję CD11a, CD11b, CD13, CD33, CD40, CD64, CD86, CD163, HLA-DR, CCR2, CCR5, CXCR4 na subpopulacjach CD14⁺⁺CD16⁺ oraz CD14⁺CD16⁻ oraz intensywność fluorescencji (MFI). Wykres przedstawia średnią ± SD z trzech eksperymentów.

**p* ≤0,05.



*Rys.35. Wpływ dodania do podłoża hodowlanego 1α,25 dihydroxywitaminy D3 oraz TNF*α *na różnicowanie komórek do monocytów/makrofagów.*

Metodologia wg protokołu jak na Rys.31, dodatkowo do podłoża dodawano VD3 oraz CD40L. W kolejnych dniach różnicowania oceniano krotność wzrostu liczby komórek (A), ekspresję $CD14^+$ (B) oraz koekspresję $CD14^+$ CD16 $^+$ (C), oraz intensywność fluorescencji (MFI) (E,F,G). Wykresy A-C przedstawiją średnią <u>+</u> SD z trzech eksperymentów, wykresy D-E przedstawiają wyniki jednego wybranego eksperymentu.



Rys.36. Fagocytoza opsonizowanych bakterii Staphylococcus aureus oraz produkcja reaktywnych form tlenu (anionu ponadtlenkowego O_2^{-}).

Komórki hodowano w/g protokołu jak na Rys.31, po 7 dniach barwiono anti-CD14 APC i anti-CD16 PE-Cy5 i inkubowano z HE. Nstępnie poddawano inkubacji z opsonizowanymi bakteriami S. aureus znakowanymi FITC. Z zastosowanem cytometru przepływowego analizowano subpopulacje komórek CD14⁺⁺CD16⁺ i CD14⁺CD16⁻ i w każdej z nich zdolność do fagocytozy (zielona fluorescencja FL1-FITC)) i produkcji O_2^{-} (czerwona fluorescencja FL2-PE). Wykres przedstawia wyniki jednego wybranego eksperymentu.



Rys.37. Produkcja IL-12 przez subpopulacje monocytów CD14⁺⁺CD16⁺ i CD14⁺CD16⁻ po stymulacji HPC-4 oraz IFN/LPS.

Komórki CD34⁺ były hodowane w/g protokołu jak na Rys.31. Po 7 dniach różnicowania podwójnie barwione anti-CD14 i anti-CD16 i sortowane na 2 subpopulacje CD14⁺⁺CD16⁺ i CD14⁺CD16⁻ z zastosowaniem sortera komórkowego FACS. Następnie hodowano komórki przez 18 godzin w podłożu z dodatkiem lub bez czynnika stymulującego LPS/IFNγ lub linii komórkowej (HPC-4). Przy użyciu zestawu ELISA oceniano stężenie IL-12 w supernatantach z hodowli. Wykres przedstawia średnią \pm SD z trzech eksperymentów.



Rys.38. Stymulacja allo-MLR przez subpopulacje monocytów CD14⁺⁺CD16⁺ i CD14⁺CD16.

Subpopulacje monocytów izolowano w/g protokołu jak na Rys.37. Komórki naświetlano i dodawano w różnych ilościach do komórek jednojądrzastych krwi obwodowej (PBL, Peripheral Blood Leukocytes). Hodowle prowadzono przez 6 dni, następnie dodawano tymidyny znakowanej trytem (³H-TdR), po 18 godzinach w liczniku scyntylacyjnym oznaczano stopień wbudowania tymidyny, określający zdolności proliferacyjne komórek. Wykres przedstawia średnią liczbę zliczeń <u>+</u> SD z trzech eksperymentów.

5. DYSKUSJA

Namnażanie (ekspansja) komórek układu krwiotwórczego w hodowlach *ex vivo* stwarza nowe możliwości ich wykorzystania do celów eksperymentalnych i kliniczych. Ekspansji można poddawać hematopoetyczne komórki macierzyste, progenitorowe oraz liniowo zróżnicowane (mieloblasty, erytroblasty i megakarioblasty). Opracowano już metody pozwalające na uzyskiwanie komórek układu megakariocytowego i erytroidalnego w hodowlach *in vitro* w ilościach pozwalających na wykorzystanie ich do celów doświadczalnych i klinicznych [Majka i wsp., 2001; Machaj i wsp., 2002; Stiff i wsp., 2000; Halle i wsp., 2000; Feng i wsp., 2005; Ivanovic i wsp., 2006]. Do chwili obecnej nie opracowano metodologii otrzymywania z macierzystych komórek hematopoetycznych CD34⁺ komórek układu fagocytów jednojądrzastych (monocytów/makrofagów).

Celem niniejszej pracy było opracowanie wydajnej metody ekspansji i różnicowania do monocytów hematopoetycznych komórek progenitorowych CD34⁺, które następnie mogłyby być wykorzystane do badań doświadczalnych i klinicznych w różnych formach immuno- lub genoterapii. Ponieważ ilość uzyskiwanych komórek CD34⁺ jest zawsze ograniczona, w pierwszej części pracy podjęto próbę ekspansji komórek CD34⁺ celem uzyskania jak największej ilości materiału wyjściowego do dalszego różnicowania do monocytów.

W niniejszej pracy wykorzystano komórki CD34⁺ pochodzące z różnych źródeł (krew pępowinowa, szpik kostny i mobilizowana krew obwodowa). W pierwszym etapie badań porównano dwa sposoby ich izolacji: sortowanie z wykorzystaniem cytofluorymetru przepływowego i izolację immunomagnetyczną. Do dalszych badań wybrano metodę immunomagnetycznej selekcji, gdyż cechował ją wyższy odzysk komórek CD34⁺ wykazujących wyższą klonogenność, czyli większe zdolności proliferacyjne, przy porównywalnej czystości, żywotności oraz chemotaksji do SDF-1. Ponieważ celem badań było uzyskanie możliwie dużej liczby monocytów, odzysk komórek podczas izolacji, a także ich zdolność do proliferacji były kluczowe dla wyboru metody.

W badaniach nad ekspansją komórek macierzystych/progenitorowych [Gammaitoni i wsp., 2003], a także ich różnicowaniem w kierunku megakariocytów wykorzystywane są różne źródła komórek [Lefebvre i wsp., 1999]. W przeprowadzonych badaniach własnych porównano komórki CD34⁺ pochodzące z krwi pępowinowej, szpiku kostnego oraz mobilizowanej G-CSF krwi obwodowej. Stwierdzono, że komórki CD34⁺ pochodzące z krwi pępowinowej wykazują największy potencjał proliferacyjny. W 3 dniu ekspansji uzyskano 6, 4.6 oraz 3.5 krotny wzrost liczby komórek pochodzących, odpowiednio, z krwi pępowinowej, szpiku kostnego oraz mobilizowanej G-CSF krwi obwodowej. Potwierdza to wcześniejsze doniesienia o znacznie

80

wyższym potencjale repopulacyjnym oraz dużej zdolności do proliferacji i tworzenia większej liczby koloni w hodowlach in vitro komórek CD34⁺ pochodzących z krwi pępowinowej, w porównaniu z komórkami szpiku kostnego lub mobilizowanej krwi obwodowej [Hao i wsp., 1995, Machaj i wsp., 2002]. Z opublikowanych danych wynika, iż w ciągu 3 dni hodowli in vitro komórek CD34⁺ pochodzących z krwi pepowinowej, szpiku kostnego oraz mobilizowanej krwi obwodowej uzyskiwano odpowiednio 12-krotny, 4 krotny i 5,5 krotny wzrost liczby komórek [Kerre i wsp., 2001]. Biorac pod uwagę powyższe, a także fakt, że krew pępowinowa jest materiałem łatwo dostępnym, bowiem po porodzie pozostaje w naczyniach pepowiny i łożyska a pozyskanie jej (po porodzie) nie stanowi żadnego zagrożenia życia oraz zdrowia dla matki i płodu i nie budzi zastrzeżeń etycznych, wykorzystywano ją do dalszych badań. Prowadzono zarówno krótkoterminowa (do 7 dni) jak i długoterminowa (do 21dni) ekspansje komórek CD34⁺. Do 3 dnia hodowli odsetek komórek CD34⁺ utrzymywał się na wysokim poziomie (86,5+8,6%), po czym gwałtownie spadał, w dniu 7 wynosił 32,4+6,4%, a w 21 dniu poniżej 1%, mimo iż proliferacja komórek zachodziła przez cały czas trwania hodowli. Analizując bezwzględną liczbę komórek CD34⁺, stwierdzono ich mniejszą liczbę w 14 niż w 7 dniu hodowli. Podobnie zdolność komórek CD34⁺ do tworzenia kolonii w półpłynnym podłożu do 3 dnia hodowli była porównywalna do komórek bezpośrednio po izolacji, po czym spadała. Dotyczyło to głównie kolonii CFU-GEMM, które są tworzone przez mniej zróżnicowane komórki. Świadczy to o tym, że dłuższy czas trwania hodowli prowadzi do ukierunkowania liniowego komórek. Stwierdzono, że optymalnym czasem ekspansji komórek CD34⁺ są 3-4 dni. Porównując immunofenotyp komórek CD34⁺, pochodzących z 3 źródeł, bezpośrednio po izolacji oraz po 3 dniach ekspansji stwierdzono, iż bezpośrednio po izolacji odsetek komórek CD34⁺ i CD34⁺CD38⁺ był porównywalny, natomiast po 3 dniowej hodowli najmniejszy w przypadku szpiku kostnego. Podobnie odsetek komórek CXCR4⁺ w przypadku wszystkich trzech źródeł był po izolacji zbliżony, natomiast po 3 dniowej ekspansji dochodziło do jego spadku, przy czym był on najwyższy w przypadku szpiku kostnego, co wskazuje, że ten materiał nie jest najlepszym do Markery liniowo specyficzne (CD3⁺, CD5⁺, CD7⁺, CD15⁺) użycia do takiej ekspanjsi. utrzymywały się na zbliżonych niskich poziomach zarówno po izolacji jak i po hodowli, nie obserwowano także występowania komórek T i B (CD3 i CD79a), czyli tak prowadzona ekspansja nie prowadziła do różnicowania w kierunku granulocytów i limfocytów. Odsetek komórek CD33⁺ oraz CD13⁺ był porównywalny na komórkach pochodzących z 3 źródeł. Ekspresję CD13 obserwowano na około 90-98% komórek CD34⁺ bezpośrednio po izolacji ze wszystkich źródeł i podobnej proporcji komórek po 3 dniach hodowli. Powyższe dane w połaczeniu z liczba komórek uzyskiwanych podczas ekspansji potwierdziły, iż najlepszym

źródłem komórek CD34⁺ do ekspansji jest krew pępowinowa, co jest zgodne z opublikowanymi danymi [Hao i wsp., 1995, Machaj i wsp., 2002], a 3 dni hodowli nie wpływają znacząco na zmianę immuunofenotypu komórek poddawanych ekspansji.

Kluczowym składnikiem podłoża hodowlanego jest surowca, będąca m.in. źródłem lipidów, peptydów i białek. W przypadku ekspansji komórek linii megakariocytowej i erytroidalnej wykazano m.in., że optymalny wzrost ilości tych komórek uzyskuje się w podłożu hodowlanym wzbogaconym w tzw. surowicę syntetyczną będącą mieszaniną albuminy, liposomów i transferyny wysyconej żelazem [Ratajczak i wsp., 1998 a i b]. Opublikowane dane na temat ekspansji hematopoetycznych komórek macierzystych nie określają jednoznacznie warunków hodowli tych komórek. Przy zastosowaniu różnych surowic i ich stężeń stwierdzono, że optymalnym dla ekspansji jest zastosowanie 12,5% HS i 12,5% FBS. Po 2 tygodniach hodowli komórek CD133⁺ uzyskiwano 16,6+6,2 krotność wzrostu ich liczby [Ruzicka i wsp., 2004]. W niniejszych badaniach zastosowanie podłoża hodowlanego zawierającego FBS pozwoliło na uzyskanie 36 - krotnego wzrostu liczby komórek w 14 dniu hodowli. Prowadzenie hodowli w bezsurowiczym podłożu jest stosowane ze względu na możliwość zastosowania klinicznego komórek celem unikniecia ryzyka zakażenia wirusami i występowania różnic pomiędzy indywidualnymi próbkami surowic, a także ustalenie ściśle zdefiniowanych czynników biochemicznych [Chivu i wsp., 2004]. W tych warunkach uzyskano 3,1 krotny wzrost komórek CD34⁺HLA-DR⁻ i 2,9 krotny wzrost liczby komórek CD34⁺CD71⁻ w 3 dniu ekspansji. Hodowle komórek CD34⁺ pochodzących z mobilizowanej krwi obwodowej prowadzone w różnych podłożach bezsurowiczych, pozwalają na uzyskanie w 8 dniu hodowli 3,7 krotnego wzrostu liczby komórek CD34⁺ i 14,4 krotnego komórek CD34⁺/CD38⁻ [Li i wsp., 2005]. Z niniejszych badań wynika, że zastosowanie FBS wpływa korzystnie na zwiększenie podczas ekspansji, jednakże praktycznie wszystkie te komórki liczby komórek CD34⁺ wykazywały koekspresję CD38. Tak uzyskane komórki mogłyby potencjalnie znaleźć zastosowanie w terapii genowej. Ponieważ w ekspansji do celów klinicznych nie stosuje się surowic zwierzęcych, zbadano także wpływ surowicy pochodzącej z autologicznej krwi pępowinowej. W porównaniu do surowicy zwierzęcej nie stwierdzono istotnych różnic zarówno w krotności wzrostu ilości komórek w 3 dniu hodowli jak również w ekspresji wybranych markerów powierzchniowych.

Proliferacja wczesnych komórek hematopoetycznych w szpiku kostnym jest kontrolowana przez szereg cytokin i czynników wzrostowych wydzielanych przez komórki podścieliska. Niektóre czynniki wzrostowe i cytokiny, np. SCF, FLT-3L, TPO, IL-3, IL-6 odpowiedzialne są za proliferację komórek [Devine i wsp. 2003; Ratajczak i wsp. 1998b], podczas gdy inne jak np.

M-CSF, G-CSF, GM-CSF, EPO oraz TPO powodują głównie różnicowanie i dojrzewanie komórek liniowo ukierunkowanych [Geissler i wsp., 2000; Schwarz i wsp. 1991]. TPO odgrywa role nie tylko w megakariopoezie, ale także hamuje apoptoze komórek [Borge i wsp., 1997], a we wczesnej hematopoezie i w połączeniu z innymi cytokinami wzmacnia ekspansję komórek CD34⁺ [Ramstiell i wsp., 1997; Tang i wsp., 2003]. Wykazano synergistyczne działanie TPO z FLT-3L i SCF [Lues i wsp., 1998], natomiast użycie samej TPO lub TPO z IL-3 powoduje, że większość komórek różnicuje się w kierunku megakariocytów [Tang i wsp., 2003; Ratajczak i wsp., 1998; Borge i wsp., 1997]. Zastosowanie TPO, SCF i FLT-3L w 6 dniowej hodowli w IMDM z 10% FBS prowadzi do uzyskania 4,7 krotnego wzrostu ilości komórek, w tym 3,4 krotnego wzrostu CD34⁺. Użycie kombinacji różnych czynników wzrostowych z TPO powoduje znaczącą ekspansję komórek CD34⁺ [Liu i wsp., 1999; Pranke i wsp., 2005]. TPO, SCF i FLT-3L stymuluje proliferację komórek, w tym komórek CD34⁺CD38⁻, co wskazuje na indukcję liniowo niezróżnicowanych komórek macierzystych. Charakterystyka ekspansji immunofenotypowa komórek CD34⁺ krwi pepowinowej wykazuje na duże zróżnicowanie zarówno komórek CD34⁺ (0,4-4,9%), jak i CD34⁺CD38⁻ (0,55-5,57%) [Pranke i wsp., 2005], co może wpływać na zdolności proliferacyjne komórek CD34⁺ pochodzących z różnych porcji krwi pępowinowej.

W niniejszej pracy zastosowano TPO i uzyskano w kolejnych dniach ekspansji znaczny wzrost całkowitej liczby komórek przy utrzymującym się odsetku komórek CD34⁺, co potwierdzilło jej znaczącą rolę w ekspansji wczesnych hematopoetycznych prekursorów. Celem optymalizacji sposobu prowadzenia hodowli stosuje się hodowle w podłożach płynnych z udziałem podścieliska szpiku kostnego [Foquenne i wsp., 2005] lub bez [Levac i wsp., 2005, Levebvre i wsp., 1999], perfuzyjne bioreaktory z ze stałą wymianą podłoża hodowlanego [Stiff i wsp., 2000; Engelhardt i wsp., 2001] i zamknięte systemy do ekspansji jak np. DIDECO "Pluricell System" [Astori i wsp., 2005]. Niniejsze badania miały także na celu określenie optymalnego sposobu prowadzenia hodowli. Zakładanie hodowli co 3-4 dni zawsze ze stałego wyjściowego inoculum w świeżym podłożu hodowlanym w porównaniu do zmiany połowy podłoża co 3-4 dni wpływało na zwiększenie odzysku komórek.

Wybór optymalnych podłoży hodowlanych jak również różnych kombinacji czynników wzrostowych jest nadal nieustalony [Balducci i wsp., 2003; Kohler i wsp., 1999]. W niniejszej pracy do ekspansji komórek CD34⁺ zastosowano różne podłoża hodowlane: X-VIVO 10+/-FBS, SFEM and STEMLINE II. Badania wykazały, że w 7 dniu hodowli największą liczbę komórek (ok. 20 krotny wzrost) uzyskano stosując podłoże X-VIVO 10 wzbogacone w FBS. Dlatego to podłoże użyto do dalszych badań nad ekspansją komórek CD34⁺. Stwierdzono spadek odsetka

komórek CD34⁺ hodowanych w tym podłożu powyżej 3 dni hodowli, podczas gdy w innych utrzymywał się on przez dłuższy czas. Prawie wszystkie komórki hodowane w podłożu X-VIVO 10 + FBS były CD33⁺ i CD38⁺, natomiast nie stwierdzono komórek CD14⁺ i CD15⁺. Potwierdza to inne obserwacje mówiące o szybkim spadku ilości komórek CD34⁺ hodowanych w podłożu IMDM z FBS i różną kombinacją czynników wzrostowych [Grande i wsp., 2002].

Wobec stwierdzenia, że w 7 dniu hodowli komórki pozostaja nadal w ekspotencjalnej fazie wzrostu podjęto badania nad ustaleniem kinetyki w hodowlach długoterminowych. Ukazały się doniesienia możliwość wskazujące na hodowli hematopoetycznych komórek macierzystych/progenitorowych przez 3 [Martinez – Jaramillo i wsp., 2004; Engel i wsp., 1999], 4 [Bohbot i wsp. 1995; Bruno i wsp., 2003], 6 [Flores-Guzman i wsp., 2005], a nawet 10 tygodni [Gammaitoni i wsp., 2003, Lazzari i wsp., 2001]. W niniejszych badaniach prowadzono hodowle w podłożu X-VIVO 10 z dodatkiem FBS, SCF, FLT-3L, IL-3, TPO do 21 dnia. Znaczny wzrost liczby komórek obserwowano do 14 dnia hodowli (ok. 30-40 krotny), a następnie tylko niewielki przyrost ich liczby. Badania immunofenotypu a także klonogenność komórek CD34+ bezpośrednio po izolacji i w kolejnych dniach długoterminowych hodowli wykazały, iż odsetek komórek CD34⁺, CD34⁺/CD38⁺ i CD34⁺/CD38⁻ gwałtownie obniżał się po 7 dniach hodowli, a w 21 dniu nie stwierdzano komórek CD34⁺, również proporcja komórek CD34⁺ wykazujących koekspresję HLA-DR gwałtownie spadała powyżej 3 dnia hodowli. Także od 7 dnia hodowli liczba kolonii BFU-E i CFU-GEMM uległa obniżeniu, a kolonii CFU-GM od 14 dnia hodowli. Powyższe wyniki potwierdziły, że optymalny czas do ekspansji komórek CD34⁺ wynosi 3-4 dni.

Komórki pochodzące z krwi pępowinowej posiadają większe zdolności do wszczepienia do myszy SCID niż pochodzące z innych źródeł [Wang i wsp., 1997]. Inne doniesienia wykazują, że komórki krwi pępowinowej po 12 dniowej ekspansji *in vitro* charakteryzują się większą zdolnością repopulacyjną niż komórki CD34⁺ bezpośrednio po izolacji ponieważ w szpiku myszy SCID stwierdzono dwukrotnie więcej komórek CD45⁺ ($3.4\pm2.01\%$), a odsetek komórek CD34⁺ wynosił 1,5±0,6 oraz 3,4±2,01 odpowiednio przed oraz po 12 dniowej ekspansji [Astori i wsp., 2005]. Niniejsze badania dowiodły, że komórki uzyskane w wyniku 3 i 7 dniowej ekspansji posiadają zdolności repopulacyjne. Po 6 tygodniach od przeszczepienia ich myszom SCID uprzednio naświetlonym subletalną dawką promieniowania γ , w szpiku kostnym myszy stwierdzono ludzkie komórki hematopoetyczne (CD45⁺) w ilości 4,6±4,5% oraz 1,9±2,3% odpowiednio dla komórek po 3 i 7 dniach ekspansji. Nie stwierdzono odbudowy dojrzałych komórek Szeregu limfocytarnego (brak komórek CD4⁺ i CD19⁺), ale obecność wczesnych komórek T i B (CD38⁺). W obydwu grupach nastąpiła odbudowa szeregu mieloidalnego

(obecność komórek CD13⁺, CD33⁺). Z innych badań wynika, że możliwa jest odbudowa wszystkich linii hematopoetycznych [Astori i wsp., 2005; Ueda i wsp., 2000; Bruno i wsp., 2004; Piacibello i wsp., 1999; Levac i wsp., 2005]. Istnieją dane wskazujące, iż zdolności repopulacyjne zależą od kombinacji cytokin użytych do ekspansji komórek CD34⁺, np. zastosowanie TPO zwiększa odsetek komórek CD45⁺ w szpiku myszy SCID z 2,32 do 6,69% [Ueda i wsp., 2000]. Podobne zdolności repopulacyjne posiadają także komórki uzyskane z mobilizowanej krwi obwodowej i hodowane 8 dni w podłożu bezsurowiczym – u myszy SCID stwierdzono 5,8 \pm 3,34% komórek CD45⁺[Li i wsp., 2005]. Inne doniesienia sugerują, iż możliwe jest rekonstytucja megakariocytów u myszy SCID po przeszczepie komórek CD34⁺ z krwi pępowinowej po 4 tygodniowej ekspansji [Bruno i wsp., 2004].

Zasadniczym celem badań była próba zróżnicowania progenitorowych komórek hematopoetycznych CD34⁺ do monocytów. Do chwili obecnej nie opracowano metodologii uzyskiwania monocytów z komórek CD34⁺. Możliwe jest różnicowanie, ale nie ekspansja, komórek CD34⁺ do dojrzałych monocytów w obecności M-CSF lub M-CSF, IL-6 [Kamps i wsp., 1999]. Z drugiej strony zastosowanie SCF i IL-2 w hodowli komórek CD34⁺ pochodzących z mobilizowanej G-CSF krwi obwodowej prowadzi do uzyskania komórek o fenotypie CD56⁺CD33⁺, które stanowią niewielki odsetek monocytów [Sconocchia i wsp., 2004]. Jak wiadomo na różnicowanie komórek wpływa sekwencja podawania cytokin [Ratajczak i wsp., 1998c]. W niniejszej pracy porównano 2 sposoby prowadzenia hodowli: różnicowanie komórek CD34⁺ bezpośrednio po izolacji lub ich różnicowanie po wstępnej ekspansji komórek CD34⁺ (hodowla 2 etapowa). Stwierdzono, że wstępna ekspansja z zastosowaniem cytokin wpływających głównie na proliferację komórek, a nie na ich różnicowanie jest bardzo korzystna. Porównując hodowle w podłożu IMDM z dodatkiem 20% FBS oraz koktajlem cytokin (M-CSF + FLT-3L + IL-3 + SCF) komórek CD34⁺ krwi pepowinowej oraz komórek CD34⁺ po 3 dniowej ekspansji w podłożu X-VIVO 10 z dodatkiem FBS oraz SCF, IL-3, FLT-3L i TPO okazało się, że ta wstępna hodowla wpływa korzystnie na bezwzględną liczbę komórek CD14⁺. Komórki z podłoża do ekspansji, zawierające prekursory monocytarne (CD13⁺, CD33⁺, HLA-DR⁺, częściowo CD64⁺), ale nie CD15⁺, były przenoszone do podłoża różnicującego na 3-14 dni. Obserwowano szybki wzrost liczby komórek (aż do 300-krotnego w dniu 14). Nie obserwowano w tych hodowlach prekursorów limfoidalnych. W 7 dniu hodowli różnicującej stwierdzono $45\pm18\%$ komórek CD14⁺, i $22\pm11\%$ CD16⁺. Większość (> 90%) komórek wykazywała ekspresję CD11a, CD29, CD33, podczas gdy CD38⁺ i HLA-DR⁺ występowały w granicach 64 -72%. Wykrywano także niewielki odsetek komórek CD34⁺. Z niniejszych badań wynika także, że na odsetek komórek CD14⁺ największy wpływ ma czas różnicowania, bez względu na

długość trwania ekspansji, bowiem największy przyrost komórek CD14⁺ uzyskano między 7 a 10 dniem różnicowania. Biorąc pod uwagę bezwzględną liczbę komórek CD14⁺ korzystna okazała się 10 dniowa ekspansja, bowiem wpływała ona istotnie na zwiększenie ich liczby. W niniejszej pracy uzyskano 29±5, 180,6±45, 580,2±112 oraz 692±100 krotny wzrost liczby komórek CD14⁺ po 10 dniach ekspansji i odpowiednio 3, 7, 10 i 14 dniach różnicowania. Niektóre obserwacje wskazują na $53,3\pm20,5$, $307,1\pm119,5$ oraz $1117,2\pm335,4$ krotności wzrostu całkowitej liczby komórek, a także $21,4\pm16,7, 143,2\pm60,35$ oraz $150,8\pm42,16$ krotności wzrostu liczby komórek o fenotypie CD1a odpowiednio po 7, 10 i 14 dniach ekspansji i różnicowania w kierunku komórek dendrytycznych [Wang i wsp., 2004].

W dostępnej literaturze brak danych dotyczących wpływu różnych podłoży hodowlanych, różnych surowic, na różnicowanie komórek CD34⁺ w kierunku monocytów/makrofagów. W wykonanych badaniach porównano wpływ płodowej surowicy bydlęcej, końskiej, ludzkiej grupy krwi AB i tzw. surowicy syntetycznej na ekspansję i różnicowanie komórek linii monocytowomakrofagowej. Stwierdzono, że w przeciwieństwie do wyników uzyskanych nad ekspansją komórek linii erytroidalnej i megakariocytowej, gdzie nie można zastosować surowicy zwierzęcej ze względu na występujące w niej czynniki (np. TGFβ), które hamują różnicowanie komórek do megakariocytów, najbardziej optymalną ekspansję i różnicowanie komórek monocytarnych umożliwiały podłoża hodowlane z dodatkiem surowic zwierzęcych. W niniejszej pracy porównano także wpływ różnych kombinacji czynników wzrostowych na dojrzewanie komórek CD34⁺ w kierunku monocytów. Z przeprowadzonych badań wynika, że przy różnicowaniu komórek do monocytów zastosowanie M-CSF lub M-CSF+SCF, prowadzi do uzyskania komórek o wysokiej ekspresji CD14, lecz ogólna ich liczba jest jednak niewielka. Dodatek FLT-3L lub IL-3 do M-CSF lub M-CSF + SCF zwiększa natomiast całkowitą liczbę komórek, zmniejszając tylko nieznacznie odsetek komórek CD14⁺. Z przeprowadzonych badań wynika więc, że do różnicowania komórek CD34⁺, poddanych uprzednio ekspansji, do monocytów najbardziej optymalne wydaje się zastosowanie następujących czynników wzrostowych i różnicujących: M-CSF + SCF + IL-3 + FLT-3L w okresie 7-10 dni hodowli.

Uzyskane wyniki wskazują, iż możliwe jest nawet 1000 krotne zwiększenie liczby wyjściowych komórek, z których ok. 40-60% stanowią komórki CD14⁺, a zatem około 400-600-krotne namnożenie komórek CD14⁺. Z uzyskanych komórek można następnie pozyskać za pomocą ich izolacji na kolumnach immunomagnetycznych lub sortowania FACS czystą frakcję komórek CD14⁺. Izolowane komórki CD14⁺ dalej nie proliferowały, co oznacza, iż w tych warunkach hodowli mogą jedynie podlegać różnicowaniu, zatem zachowują się jak monocyty krwi obwodowej (przynajmniej w warunkach *in vitro*).

Stosując technikę podwójnego barwienia anti-CD14 i - CD16 stwierdzono obecność dwóch subpopulacji monocytów CD14⁺CD16⁻ oraz CD14⁺CD16⁺ występujących w proporcji ok. 2:1. Nie odpowiadają one jednak klasycznym subpopulacjom monocytów krwi obwodowej. Na podstawie MFI CD14 można je określić jako CD14⁺(MFI 964) CD16⁻ oraz CD14⁺⁺(MFI 2756) CD16⁺, podczas gdy subpopulacje monocytów krwi obwodowej występują jako CD14^{dim}CD16⁺ oraz CD14⁺⁺CD16⁻ [Ziegler-Heitbrock 2000]. Wykazano także różnice w morfologii uzyskanych dwóch subpopulacji. Komórki CD14⁺CD16⁻ były mniejsze, okrągłe, miały nerkowate jądro i gładką powierzchnię, zatem morfologicznie odpowiadały monocytom. Komórki CD14⁺⁺CD16⁺ były większe, miały obfitą cytoplazmę zawierającą wakuole, małe okrągłe jądro i nieregularną powierzchnię, co odpowiada morfologii makrofaga. W literaturze brak doniesień dotyczących występowania takich subpopulacji monocytów w krwi obwodowej, czy też różnicowania takich komórek z komórek progenitorowych.

Monocyty krwi obwodowej są populacją heterogenną. Wyróżnia się 2 główne subpopulacje monocytów: komórki CD64⁺ i CD64⁻ [Zembala i wsp., 1984] oraz CD14⁺⁺ (tzw. klasyczne monocyty) i monocyty CD14⁺CD16⁺ [Weber i wsp., 2000], które mają pewne cechy wspólne. Mniejsza ilościowo subpopulacje stanowia monocyty CD14⁺CD33⁺⁺ i CD14⁺⁺CD16⁺ [Rother i wsp., 1996, Ancuta i wsp., 2003]. Jakkolwiek subpopulacje monocytów uzyskane w wyniku ekspansji i różnicowania komórek CD34⁺ krwi pepowinowej mają pewne cechy immunofenotypowe zbliżone do komórek CD14⁺⁺CD16⁻, CD14⁺CD16⁺ i CD14⁺⁺CD16⁺ krwi obwodowej, to wykazują nie tylko różnice w ekspresji CD14⁺ ale również innych determinant (por. Tab. 4.). Komórki CD14⁺CD16⁺ krwi obwodowej charakteryzuje niska ekspresja CD33, CD64 i brak CCR2, co różni je od monocytów CD14⁺⁺CD16⁺. Z drugiej strony, zarówno komórki CD14⁺CD16⁺ pochodzące z krwi obwodowej (w porównaniu z CD14⁺⁺) oraz komórki CD14⁺⁺CD16⁺ pochodzace z komórek CD34⁺ (w porównaniu do CD14⁺CD16⁺) wykazuja zwiększoną ekspresję HLA-DR, natomiast zwiększoną ekspresję CD11b wykazują tylko komórki CD14⁺⁺CD16⁺ [Emminger i wsp., 2001; Almeida i wsp., 2001, Passlick i wsp., 1996]. Subpopulacja CD14⁺⁺CD16⁺ wykazuje również zwiększoną ekspresję CXCR4, co może wskazywać na większą zdolność migracyjną tych komórek do SDF-1, a także zwiększoną ekspresję cząsteczek kostymulujących (CD86). Subpopulacja CD14⁺CD16⁺ monocytów krwi obwodowej (w porównaniu do subpopulacji CD14⁺⁺CD16⁻) również wykazuje zwiększoną ekspresję CD86. Subpopulacja CD14⁺⁺CD16⁺ charakteryzowała się także zwiększoną ekspresją CD163, który należy do rodziny "scavenger receptor" (eliminuje z krażenia hemoglobine związaną z haptoglobiną), a jego ekspresja jest związana z różnicowaniem monocytów do makrofagów, które charakteryzuje jego wysoka ekspresja [Walter i wsp., 2003]. Zatem wysoka

ekspresja CD163 na monocytach CD14⁺⁺CD16⁺ otrzymanych z komórek CD34⁺ dodatkowo wskazuje, że te komórki mają cechy zbliżone do makrofagów [Moestrup i wsp., 2004]. Jest to zgodne z ich obrazem morfologicznym. Zwiększona ekspresja HLA-DR i kostymulujacych molekuł CD86 może wskazywać na większą zdolność monocytów CD14⁺⁺CD16⁺ do prezentacji antygenów, a zwiększona ekspresja CD40 na ich większa zdolność do interakcji z limfocytami T i B. Zatem, uzyskane z komórek CD34⁺ subpopulacje monocytów różnią się od monocytów CD14⁺⁺CD16⁻ i CD14⁺CD16⁺ krwi obwodowej. Nie stwierdzono także ekspresji CD56 na obydwu subpopulacjach monocytów, co wskazuje, iż różnią się także od małej subpopulacji monocytów krwi obwodowej o fenotypie CD56^{low}, CD33⁺, CD14⁺, HLA-DR⁺, CD11b^{high} [Sconoccia i wsp., 2005], jak i subpopulacji monocytów indukowanych CSF-1, która nie wykazuje ekspresji CD80 i CD86 [Finnin i wsp., 1999]. Komórki te różnią się także od niewielkiej subpopulacji (2.5%) monocytów morfologicznie odpowiadających makrofagom, o fenotypie CD56^{dim}, CD33⁺ uzyskanych w wyniku 3 tygodniowej hodowli komórek CD34⁺ mobilizowanych z krwi obwodowej, w obecności IL-2 and SCF [Sconocchia i wsp., 2004]. Aczkolwiek opisano różnicowanie, ale nie ekspansję, monocytów z komórek CD34⁺ w obecności M-CSF lub kombinacji z MGF i IL-6, to jednak nie zaobserwowano występowania subpopulacji monocytów [Kamps i wsp., 1999]. Uzyskano natomiast ekspansję progenitorów mieloidalnych hodując komórki CD34⁺ z krwi pepowinowej w obecności SCF, IL-6, GM-CSF and G-CSF [Flores-Guzman i wsp., 2002].

Istnieją dane wskazujące, iż dodatek do hodowli 1a,25 dihydroxywitaminy D3 (VD3) prowadzi do różnicowania, ale nie ekspansji, komórek CD34⁺ w kierunku komórek CD14⁺CD11b⁺⁺ [Grande i wsp., 2002], natomiast dodanie CD40L prowadzi do dojrzewania komórek dendrytycznych z monocytów [Koya i wsp., 2003]. W niniejszej pracy wykazano, że dodatek VD3 powoduje zwiększenie odsetka komórek CD14⁺CD16⁻ oraz zmniejszenie odsetka komórek CD14⁺⁺CD16⁺ przy porównywalnym wzroście liczby komórek. VD3 nie wpływała na proliferację komórek ale zwiększała ekspresję HLA-DR and CD11b na obydwu subpopulacjach, co jest zgodne z wcześniejszymi doniesieniami [Grande i wsp., 2002]. Nowym elementem było stwierdzenie, że także zmniejszała ekspresję CD16. Stąd, wydaje się, że VD3 w badanym układzie reguluje wzajemne proporcje tych subpopulacji monocytów lub ich dojrzewanie. Z kolei CD40L zwiększał proliferację komórek, ale nie wpływał znacząco na ekspresję CD14 czy CD16.

Subpopulacje monocytów uzyskane w wyniku ekspansji komórek CD34⁺ i ich różnicowania wykazują także istotne różnice funkcjonalne. Obydwie subpopulacje stymulowane zarówno LPS/IFNγ jak i komórkami nowotworowymi nie uwalniają znaczących ilości TNF i IL-10 co różni je od subpopulacji monocytów krwi obwodowej [Szaflarska i wsp., 2004; Mytar i wsp., 2003] ale produkują IL-12p40. IL-12 jest wydzielana głównie przez subpopulację CD14⁺⁺CD16⁺. Biorąc pod uwagę produkcję tej cytokiny subpopulacja CD14⁺⁺CD16⁺ jest porównywalna do występującej we krwi obwodowej subpopulacji CD14⁺CD16⁺ [Szaflarska i wsp., 2004].

Subpopulacja komórek CD14⁺⁺CD16⁺ jest lepszym stymulatorem reakcji allo-MLR, co czyni ją podobną do CD14⁺CD16⁺ [Gordon i Taylor, 2005]. Większe zdolności stymulujące allogenicznych limfocytów przez subpopulację CD14⁺⁺CD16⁺ mogą być związane z wyższą ekspresją HLA-DR i molekuły kostymulującej CD86. Natomiast większą zdolność do fagocytozy wykazuje subpopulacja CD14⁺CD16⁻, co czyni te komórki zbliżone do "klasycznych" monocytów CD14⁺⁺CD16⁻ krwi obwodowej [Passlick i wsp., 1989] i subpopulacji CD14⁺⁺CD16⁺ monocytów krwi obwodowej [Roth i wsp., 1996]. Zastanawiające jest natomiast, że obydwie subpopulacje nie produkowały O_2^- po fagocytozie bakterii, co różni je od monocytów krwi obwodowej, w szczególności CD14⁺⁺ [Baran i wsp., 2001; Szafarska i wsp., 2004].

Sumując, przeprowadzone badania udowodniły, iż komórki CD34⁺ krwi pępowinowej mogą proliferować *in vitro* i różnicować się do monocytów. Opracowany protokół pozwala na uzyskanie znaczącej liczby komórek CD14⁺, które składają się z 2 subpopulacji: CD14⁺⁺CD16⁺ i CD14⁺CD16⁻ różniących się zarówno immunofenotypowo jak i funkcjami biologicznymi od subpopulacji monocytów krwi obwodowej. Stanowią one zatem nowe, do tej pory nieopisane, subpopulacje monocytów. Otwartym pozostaje pytanie, czy opisane subpopulacje stanowią rzeczywiście podlinie monocytów, czy też reprezentują ich inny stopień dojrzałości. Znaczna heterogenność monocytów i występowanie ich odmiennych subpopulacji o różnej aktywaności biologicznej i roli fizjologicznej ma istotne implikacje dla opracowania nowych strategii terapeutycznych nacelowanych na modyfikację funkcji poszczególnych subpopulacji monocytów lub uzyskiwanie subpopulacji o ściśle określonej aktywności biologicznej [Gordon i Taylor, 2005].

| Immunofenotyp/CD | 14++ | $14^{+}16^{+}$ | 14++ | 14 ⁺⁺ 16 ⁺ | $14^{+}16^{+}$ | 14++ | 14 ⁺⁺ 16 ⁺ | $14^{+}16^{+}$ |
|------------------|--|----------------|-----------------|----------------------------------|------------------|-----------------|----------------------------------|------------------|
| % monocytów | >80% | <10% | 29 <u>+</u> 2,8 | 55 <u>+</u> 8,5 | 74 <u>+</u> 15,6 | 61,3 <u>+</u> 6 | 25,6 <u>+</u> 5 | 9,4 <u>+</u> 1,7 |
| CD11a | | | ++ | ++ | ++ | +++ | + | ++ |
| CD11b | ++ | + | ++ | | ++ | +++ | ++ | + |
| CD14 | ++ | + | | | | +++ | ++ | + |
| CD15 | + | - | | | | | | |
| CD16 | - | + | | | | + | ++ | ++ |
| CD33 | ++ | + | | | | +++ | ++ | + |
| CD38 | ++ | - | | | | | | |
| CD40 | | | | | | +++ | ++ | + |
| CD43 | ++ | +++ | | | | | | |
| CD64 | + | - | +++ | ++ | + | +++ | ++ | + |
| CD86 | ++ | +++ | | | | | | |
| CD163 | ++ | - | | | | | | |
| HLA-DR | + | ++ | + | ++ | + | ++ | + | + |
| CCR2 | ++ | - | +++ | ++ | + | | | |
| CCR5 | - | + | + | ++ | + | | | |
| CXCR4 | | | ++ | ++ | + | | | |
| | Ziegler-Heitbrock nieopublikowane Gordon Taylor 2005 Passich 1989 Weber 2000 | | Ancuta 2003 | | | Rothe 1996 | | |

Tab.4. Subpopulacje monocytów krwi obwodowej.

6. WNIOSKI:

- Stwierdzono, że izolacja komórek CD34⁺ na kolumnach immunomagnetycznych MiniMacs jest bardziej wydajna niż izolacja z zastosowaniem cytometru przepływowego.
- Optymalnym czasem prowadzenia ekspansji izolowanych komórek CD34⁺ jest hodowla 3-4 dniowa, później liczba komórek CD34⁺ ulega istotnemu obniżeniu.
- Największy wzrost całkowitej liczby komórek w trakcie 7 dniowej ekspansji uzyskano stosując podłoże hodowlane X-VIVO 10 oraz FBS.
- Krew pępowinowa okazała się najbardziej efektywnym źródłem izolowanych komórek CD34⁺ wykorzystywanych następnie do ekspansji.
- Uzyskane w drodze ekspansji *in vitro* komórki CD34⁺ posiadają zdolności do repopulacji u myszy SCID naświetlonych uprzednio subletalną dawką promieniowania γ.
- Zastosowanie w pierwszych 3 10 dniach hodowli podłoża zawierającego 4% FBS oraz SCF + IL-3 + FLT-3L + TPO, a następnie przeniesienie komórek poddanych wstępnej ekspansji do podłoża IMDM wzbogaconego 20% FBS oraz M-CSF, FLT-3L, IL-3, SCF i ich hodowla w okresie 7 - 10 dni , pozwala na zwiększenie efektywności ekspansji i różnicowania komórek do monocytów.
- Stwierdzono, że przy zastosowaniu powyższego protokołu jest możliwe 800-1500 krotne zwiększenie liczby komórek, z których ok. 40-60% stanowią CD14⁺.
- Dodatek do hodowli VD3 powoduje wzrost odsetka komórek CD14⁺ do ok. 80%.
- Komórki CD14⁺ wykazują obecność dwóch subpopulacji monocytów: CD14⁺CD16⁻, CD14⁺⁺CD16⁺, które wykazują istotne różnice immunofenotypowe i morfologiczne. Komórki CD14⁺CD16⁻ wykazują cechy morfologiczne monocytów, natomiast CD14⁺⁺CD16⁺ makrofagów.
- Monocyty/makrofagi, głównie subpopulacja CD14⁺⁺CD16⁺, uwalniają IL-12, ale nie TNF i IL-10, indukują allo-MLR (głównie CD14⁺⁺CD16⁺), fagocytują znakowane bakterie (głównie subpopulacja CD14⁺CD16⁻), ale nie produkują wewnątrzkomórkowego O₂⁻.
- Monocyty generowane z komórek CD34⁺ krwi pępowinowej różnią się istotnie od opisanych subpopulacji monocytów krwi obwodowej innymi proporcjami komórek CD14 i CD16, występowaniem subpopulacji CD14⁺CD16⁻ oraz brakiem subpopulacji CD14⁺⁺CD16⁻.

Przeprowadzone badania udowodniły, iż komórki CD34⁺ krwi pępowinowej ulegają ekspansji i różnicują się do monocytów w warunkach *in vitro*. Opracowana metodologia dwuetapowej hodowli pozwala na uzyskanie dużej liczby komórek CD14⁺, które składają się z 2 subpopulacji: CD14⁺CD16⁻ i CD14⁺⁺CD16⁺ różniących się immunofenotypem oraz funkcjami biologicznymi od opisanych subpopulacji monocytów krwi obwodowej. Stanowią zatem nowe, do tej pory nie opisane subpopulacje monocytów człowieka, które reprezentują różny stopień różnicowania tych komórek.

7. STRESZCZENIE

Namnażanie (ekspansja) komórek układu krwiotwórczego w hodowlach *ex vivo* stwarza możliwości ich wykorzystania do celów eksperymentalnych i terapeutycznych. Ekspansji można poddawać komórki macierzyste, progenitorowe oraz liniowo zróżnicowane (mieloblasty, erytroblasty i megakarioblasty).

Stosunkowo łatwo udaje się namnażać w hodowlach *ex vivo* komórki układu krwiotwórczego, które są zróżnicowane liniowo (megakarioblasty, mieloblasty i erytroblasty). Opracowano metody pozwalające na uzyskiwanie komórek układu megakariocytowego i erytroidalnego w hodowlach *in vitro* w ilościach pozwalających na wykorzystanie ich do celów doświadczalnych i klinicznych. Do chwili obecnej brak metodologii ekspansji i różnicowania komórek układu fagocytów jednojądrzastych (monocytów/makrofagów) z macierzystych komórek hematopoetycznych CD34⁺. Nie znaleziono także dobrej, taniej, łatwej, a także niewymagającej drogiej aparatury i skomplikowanej technologii metody izolacji z krwi obwodowej monocytów, która pozwoliłaby na uzyskanie dużej liczby komórek o wysokiej czystości i nieaktywowanych. W związku z tym wydaje się, że opracowanie wydajnej metody namnażania (ekspansji) monocytów z komórek progenitorowych CD34⁺ umożliwiłoby wydajną i ekonomiczną metodę uzyskiwania monocytów do badań, a także do celów klinicznych w różnych formach immuno- lub geno-terapii.

Celem badań było opracowanie metodologii ekspansji i różnicowania hematopoetycznych komórek macierzystych CD34⁺ do monocytów/makrofagów. Porównanie dwóch metod izolacji komórek CD34⁺ doprowadziło do wniosku, że izolacja immunomagnetyczna cechuje się wyższym odzyskiem komórek niż sortowanie FACS. Czystość, żywotność i klonogenność izolowanych komórek były porównywalne. Optymalnym podłożem do ekspansji komórek CD34⁺ okazało się X-VIVO 10 z dodatkiem SCF+IL-3+FLT-3L+TPO oraz 3-4 dniowa hodowla. Po tym czasie hodowli odsetek komórek CD34⁺ gwałtownie spadał. Komórki CD34⁺ po 3 i 7 dniowej ekspansji przeszczepiano myszom SCID naświetlanym subletalną dawką promieniowania γ , po 6 tygodniach od przeszczepu w szpiku kostnym myszy stwierdzono ludzkie komórki hematopoetyczne (CD45⁺). Świadczy to o zdolnościach repopulacyjnych uzyskiwanych w wyniku ekspansji komórek CD34⁺.

Zastosowanie M-CSF lub M-CSF+SCF do różnicowania komórek do monocytów/makrofagów, prowadziło do uzyskania komórek o wysokiej ekspresji CD14, lecz ogólna ich liczba była jednak niewielka. Dodatek FLT-3L lub IL-3 do M-CSF lub M-CSF + SCF zwiększał natomiast całkowitą liczbę komórek, zmniejszając tylko nieznacznie odsetek komórek CD14⁺. Z przeprowadzonych badań wynika więc, że do ekspansji komórek CD34⁺ w kierunku

monocytów najbardziej optymalne wydaje się zastosowanie następujących czynników wzrostowych i cytokin: M-CSF + SCF + IL-3 + FLT-3L w okresie 7-10 dni. Uważa się, że istotną rolę w ekspansji odgrywa nie tylko rodzaj czynników wzrostowych, lecz także ich stężenie oraz sekwencja podania. Zastosowanie w pierwszych 3 dniach ekspansji SCF + IL-3 + FLT-3L + TPO oraz podłoża hodowlanego zawierającego 4% FBS, a następnie przeniesienie komórek poddanych wstępnej ekspansji do podłoża IMDM z 20% FBS oraz M-CSF, FLT-3L, IL-3, SCF, pozwalało na zwiększenie efektywności ekspansji komórek CD14⁺. Porównując 2 sposoby prowadzenie hodowli (zmiana połowy podłoża co 3-4 dni lub stałe wyjściowe inoculum co 3-4 dni hodowli-celem uzyskania maksymalnej ekspansji) stwierdzono, że optymalne było prowadzenie hodowli ze stałego wyjściowego inoculum w świeżym podłożu i pasaż komórek co 3-4 dni hodowli. Uzyskane wyniki wskazuja, iż możliwe jest nawet 1000 - krotne zwiększenie liczby wyjściowych komórek, z których ok. 40-60% stanowią komórki CD14⁺, a zatem około 600-krotne namnożenie komórek CD14⁺. Z uzyskanych hodowli izolowano na kolumnach immunomagnetycznych lub w drodze sortowania FACS czystą frakcję komórek CD14⁺. Izolowane komórki CD14⁺ dalej nie proliferowały, co wskazuje, iż w tych warunkach hodowli moga jedynie podlegać różnicowaniu, zatem zachowują się jak dojrzałe monocyty krwi obwodowej (przynajmniej w warunkach in vitro).

Komórki CD14⁺ zarówno morfologicznie jak i immunofenotypowo wykazywały obecność dwóch subpopulacji CD14⁺/CD16⁻ oraz CD14⁺/CD16⁺ występujących w proporcjach około 2:1. Nie odpowiadają one jednak klasycznym subpopulacjom monocytów krwi obwodowej. Na podstawie ekspresji CD14 zdefiniowano je jako CD14⁺⁺/CD16⁺ i CD14⁺/CD16⁻, podczas gdy główne subpopulacje monocytów krwi obwodowej stanowia komórki CD14^{dim}/CD16⁺ oraz CD14⁺⁺/CD16⁻. Dodatek VD3, w porównaniu ze standardowym protokołem do różnicowania, powodował zwiększenie odsetka komórek CD14⁺ oraz zmniejszenie odsetka komórek CD14⁺⁺CD16⁺ przy porównywalnym wzroście liczby komórek. Monocyty/makrofagi, głównie subpopulacia CD14⁺⁺/16⁺, uwalniały IL-12, ale nie TNF α i IL-10, indukowały allo-MLR (głównie CD14⁺⁺CD16⁺), fagocytowały znakowane *Staphylococcus aureus* (głównie subpopulacja CD14⁺CD16⁻), ale nie produkowały wewnątrzkomórkowego O₂⁻. Opisane komórki stanowią zatem nowe, do tej pory nieopisane, subpopulacje monocytów człowieka. Znaczne heterogenności monocytów i występowanie ich różnych subpopulacji o różnej aktywności biologicznej i roli fizjologicznej ma istotne implikacje dla opracowania nowych strategii terapeutycznych nacelowanych na modyfikację funkcji poszczególnych subpopulacji monocytów lub uzyskanie subpopulacji o ściśle zdefiniowanej funkcjji biologicznej

94

8. SUMMARY

In the past decade significant advances in *ex vivo* haematopoietic stem cells expansion were made. *Ex vivo* expanded haematopoietic stem and progenitor cells can be used for clinical and experimental purposes. Haematopoietic stem cells, progenitor and committed cells, have been used as the initial populations for *ex vivo* expansion. *In vitro* expansion and generation of megakaryocytes, granulocytes and erytrocytes from their progenitors in the numbers enabling their clinical and experimental usages were obtained. However, little is known about *in vitro* differentiation of CD34⁺ cells to monocytes/macrophages. In particular no methodology for *in vitro* expansion and differentiation of CD34⁺ cells to monocytes/macrophages was described. There is also no cheap, easy, not involving highly specialized technology of isolation of monocytes from peripheral blood, which would yield a large number of pure and no activated cells. The effective method for *ex vivo* expansion monocytes from CD34⁺ cells would allow the use of such cells in research and in the clinic for different forms of immuno- or genotherapy. The aim of this study was to design the methodology of expansion and differentiation of CD34⁺ cells to monocytes/macrophages.

Comparison of two methods of CD34⁺ cells isolation: immunomagnetic and FACS sorting showed, that the former results in a higher recovery of cells. The purity, viability and clonogenicity of cells obtained by both methods were comparable. The present study shows that optimal medium for expansion of CD34⁺ cells was X-VIVO 10 supplemented with 4% FBS, SCF+IL-3+FLT-3L+TPO and 3-4 days culture. After this time the percentage of CD34⁺ cells rapidly decreased. The CD34⁺ cells expanded *in vitro* for 3 and 7 days were transplanted into subletally irradiated SCID mice and after 6 weeks the presence of human CD45⁺ cells in their bone marrow was documented. It indicates the repopulating ability of the expanded CD34⁺ cells. The optimal medium and combination of cytokines/growth factors for expansion and differentiation of CD34⁺ cells to monocytes/macrophages were IMDM supplemented with 20% FBS and M-CSF + SCF + IL-3 + FLT-3L and culture for 7-10 days. Using M-CSF or M-CSF+SCF yielded a high percentage of CD14⁺ cells, but the increase in the number of expanded cells was lower than in other cytokine combinations. Supplementation with FLT-3L or IL-3 to M-CSF or M-CSF + SCF + SCF increased the total number of cells and only slightly decreased the

Using two step approach: expansion of CD34⁺ progenitors isolated from cord blood in X-

percentage of CD14⁺ cells.

VIVO10 medium with 4% FBS and addition of SCF + IL-3 + FLT-3L + TPO and then differentiating them in IMDM medium supplemented with 20% FBS, M-CSF, FLT-3L, IL-3, SCF, it was possible to increase the efficiency of expansion CD14⁺ cells. Comparison of two

culture systems (half medium exchange every 3-4 days or transfer to new plates with constant initial inoculum every 3-4 days in order to obtain maximal proliferation) showed a higher efficiency of the latter protocol. Using this protocol it was possible to obtain 1000 - fold increase in number of expanded cells, of which 40-60% were CD14⁺, i.e. 600 - fold increase in the number of CD14⁺ cells. Pure CD14⁺ population of cells was further isolated by immunomagnetic or FACS sorting. Isolated CD14⁺ cells were not proliferating which indicated that these cells resemble mature blood monocytes.

The presence of two subpopulations of monocytes: $CD14^+CD16^-$ and $CD14^{++}CD16^+$, which occurred at the ratio of about 2:1 was observed. These subpopulations showed the differences in morphology and immunophenoptype. They are clearly distinct from known main subpopulations of blood monocytes $CD14^+CD16^+$ and $CD14^{++}$. Supplementation of cultures with VD3 increased the percentage of $CD14^+CD16^-$ and decreased the proportion of $CD14^{++}CD16^+$ cells with similar increase in cell number. Monocytes/macrophages, mainly $CD14^{++}/16^+$ subpopulation, secreted IL-12, but not TNF and IL-10, induced allo-MLR (mainly $CD14^{++}/16^+$ subpopulation), phagocytosed *Staphylococcus aureus* (mainly $CD14^+/16^-$ subpopulation), but did not produce intracellular O_2^- .

Hence, this study shows that it is possible to generate from CD34⁺ haematopoietic progenitors two subpopulations of human monocytes. They are clearly distinct from those present in the peripheral blood implicating the existence of novel monocyte subsets with distinct biological function that represent different stages in monocyte differentiation. This may have implications for the development of therapeutic strategies targeted to modify subpopulations of monocytes.

8. WYKAZ UŻYWANYCH SKRÓTÓW

APC (Allophycocyanin)

BFU-E (Burst Forming Unit – Erythroid) – wczesna komórka układu czerwonokrwinkowego tworząca i*n vitro* duże kolonie erytroidalne

BSA (Bovine Serum Albumin) - albumina bydlęca

CFU-GEMM (Colony Forming Unit – Granulocytes, Erythroids, Macrophages, Megakaryocytes) – wczesna komórka układu krwiotwórczego tworząca *in vitro* kolonie składające się z krwinek czerwonych, granulocytów, monocytów i megakariocytów

CFU-GM (Colony Forming Unit – Granulocytes and Macrophages) – wczesna komórka układu krwiotwórczego tworząca i*n vitr*o kolonie granulocytarno-makrofagowe

DC (Dendritic Cells) – komórki dendrytyczne

DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) - podłoże hodowlane

EPO (Erythropoietin)-erytropoetyna

FACS (Fluorescence Activated Cell Sorting) – metoda oceny antygenów powierzchniowych komórek i ich izolacji za pomocą przystosowanego w tym celu fluorocytometru przepływowego.

FBS (Foetal Bovine Serum) - surowica płodowa bydlęca

FITC (Fluprescein Isothiocyanate) - fluoresceina

G-CSF (Granulocyte Colony Stimulating Factor)- czynnik wzrostu stymulujący tworzenie *in vitro* kolonii granulocytarnych

GM-CSF (Granulocyte-Monocyte Colony Stimulating Factor) - czynnik wzrostowy stymulujący wzrost kolonii granulocyto-makrofagowych.

HE (Hydroethidinum) - hydroetydyna

HS (Horse Serum) - surowica końska

IFN (Interferon) - interferon

IL (Interleukin) - interleukina

IMDM (Iscove Modified Dulbecco's Medium)- podłoże hodowlane

LPS (Lipopolisacharide) - lipopolisacharyd

LTC-IC (Long Term Colony Initiating Cells) - długoterminowe hodowle komórek krwiotwórczych, w których warstwa komórek podścieliska szpiku utrzymuje proliferację komórek macierzystych in vitro nawet do kilkunastu tygodni.

MCP-1 (Monocyte Chemoattractant Protein-1) - białko chemotaktyczne dla monocytów

M-CSF (Monocyte-Colony Stimulating Factor) – czynnik stymulujący tworzenie kolonii monocytów

M-CSF (Macrophage Colony Stimulating Factor)- czynnik wzrostu stymulujący tworzenie *in vitro* kolonii makrofagowych

MEM-alfa (Minimum essentials Medium Eagle Alpha Modification) - podłoże hodowlaneMGDF (Megakaryocyte Development and Growth Factor)- czynnik wzrostu stymulującytworzenie *in vitro* kolonii megakariocytarnych

MFI (Mean Fluorescence Intensity) – średnia intensywność fluorescencji

MIP (Macrophage Inflammatory Protein) – białko zapalne makrofagów

MLR (Mixed Lymphocyte Reaction) - mieszana hodowla limfocytów

MPO (Myeloperoxidase) - mieloperoksydaza, peroksydaza krwinek białych

PBL (Peripheral Blood Leukocytes) - komórki jednojądrzaste krwi obwodowej

PBS (Phosphate Buffered Saline) - bufor fosforanowy

PDGF (Platelet Derived Growth Factor)- płytkowy czynnik wzrostu

PE (Phycoerythrin) – fikoerytryna

PE-Cy5 (Phycoerythrin-cyanin 5.5)

RNI (Reactive Nitrogen Intermediates) - reaktywne formy azotu

ROI (Reactive Oxygen Intermediates) - reaktywne formy tlenu

SCF (Stem Cell Factor)- czynnik wzrostu hematopoetycznych komórek macierzystych

SCID (Severe Combined Immunodeficiency) - ciężki złożony niedobór odporności

SD (Standard Deviation) - odchylenie standartowe

SDF-1 (Stromal Cell Derived Factor) - czynnik podścieliska szpiku kostnego

SFEM (Serum Free Expansion Medium) - podłoże hodowlane, bezrurowicze do ekspansji

SRC (SCID mouse repopulating cell) – komórka zdolna do odbudowy krwiotwórczej u myszy SCID

TGF (Transforming Growth Factor) - transformujący czynnik wzrostu

TLR (Toll-Like Receptors) - receptory Toll-podobne

TNF (Tumor Necrosis Factor) – czynnik martwicy nowotworu)

TPO (Trombopoietin)- trombopoetyna

VD3 - 1α,25 dihydroxywitamina D3

VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor)- czynnik wzrostu śródbłonka naczyń

9. PIŚMIENNICTWO

• Almeida J, Bueno C, Alguero MC, Sanchez ML, de Santiago M, Escribano L, Diaz-Agustin B, Vaquero JM, Laso FJ, San Miguel JF, Orfao A: Comparative analysis of the morphological, cytochemical, immunophenotypical, and functional characteristic of normal human peripheral blood lineage(-)/CD16(+)/HLA-DR(+)/CD14(-/lo) cells, CD14(+) monocytes, and CD16(-) dendritic cells. Clin Immunol. 2001, 100:325-338.

• Ancuta P, Weiss L, Haeffner-Cavaillon N: CD14+CD16+cells derived in vitro from peripheral blood monocytes exhibit phenotypic and functional dendritic cell-like characteristics. Eur J Immunol. 2000, 30: 1872-1883.

• Ancuta P., Rao R., Moses A., Mehle A., Shaw S.K., Luscinskas W., Gabuzda D., Fractalkine preferentially mediates arrest and migration of CD16+ monocytes. J Exp Med. 2003, 197(12):1701-1707.

• Andreesen R, Scheibenbogen C, Brugger W, Krause S, Leser HG, Kopf S, Engler H, Schumichen C, Lohr GW. A new approach to adoptive immunotherapy of cancer using tumorcytotoxic macrophages grown from peripheral blood monocytes. Cancer Detect Prev. 1991,15(5):413-21.

• Andreesen R, Hennemann B, Krause SW. Adoptive immunotherapy of cancer using monocytederived macrophages: rationale, current status, and perspectives. J Leukoc Biol. 1998, 64(4):419-426.

• Astori G., Adami V., Mambrini G., Bigi L., Cilli M., Facchini A., Falasca E., Malangone W., Panzani I., Degrassi A., Evaluation of ex vivo expansion and engraftment in NOD-SCID mice of umblical cord blood CD34+ cells using DIDECO "Pluricell System". Bone Marrow Transpl. 2005, 35:1101-1106.

• Balducci E, Azzarello G, Valenti MT, Capuzzo GM, Pappagallo GL, Pilotti I, Ausoni S, Bari M, Rosetti F, Sartori D, Ciappa A, Porcellini A, Vinante O. The impact of progenitor enrichment, serum, and cytokines on the ex vivo expansion of mobilized peripheral blood stem cells: a controlled trial. Stem Cells. 2003, 21(1):33-40.

• Balkwill F, Mantovani A. Inflammation and cancer: back to Virchow? Lancet. 2001, 357(9255):539-45.

• Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu YJ, Pulendran B, Palucka K. Immunobiology of dendritic cells. Annu Rev Immunol. 2000, 18:767-811.

• Baran J, Węglarczyk K, Mysiak M, Guzik K, Ernst M, Flad H-D, Pryjma J: Fas (CD95)-Fas ligand interactions are responsible for monocyte apoptosis occurring as a result of phagocytosis and killing of Staphylococcus aureus. Inf Immunity 2001, 69:1287-1297.

• Barnett MJ, Eaves CJ, Phillips GL, Kalousek DK, Klingemann HG, Lansdorp PM, Reece DE, Shepherd JD, Shaw GJ, Eaves AC. Successful autografting in chronic myeloid leukaemia after maintenance of marrow in culture. Bone Marrow Transplant. 1989, 4:345-351.

• Belge K-U, Dayyani F, Horelt A, Siedlar M, Frankenberger M, Frankenberger B, Espevik T, Ziegler-Heitbrock HWL: The proinflammatory CD14⁺CD16⁺DR⁺⁺ monocytes are a major source of TNF. J Immunol. 2002, 168:3536-3542.

• Belvedere O., Feruglio C., Malangone W., Bonora M.L., Donini A., Dorotea L., Tonutti E., Rinaldi C., Pittino M., Baccarani M., Del Frate G., Biffoni F., Sala P., Hilbert D.M., Degrassi A., Phenotypic characterization of immunomagnetically purified umblical cord blood CD34+ cells, Blood Cells, Molecules, and Diseases, 1999, 25:141-146.

• Benett S., Breit S.N.: Variables in the isolation and culture of human monocytes that are of particular relevance to studies of HIVJ.Leukoc Biol. 1994, 56:236-240.

• Blumenstein M, Boekstegers P, Fraunberger P, Andreesen R, Ziegler-Heitbrock HWL, Fingerle-Rowson G: Cytokine production precedes the expansion of CD14⁺/CD16⁺ monocytes in human sepsis: a case report of a patient with self-induced septicemia. Shock 1997, 8:73-75.

• Bohbot A., Feugeas O., Cuillerot J.M., Grosse A., Rusciani I., Faradji A., Oberling F., Peripheral blood CD34+ cells: method of purification and ex vivo expansion., Nouv Rev Fr Hematol. 1995, 37:359-365.

• Borge OJ, Ramsfjell V, Cui L, Jacobsen SE. Ability of early acting cytokines to directly promote survival and suppress apoptosis of human primitive CD34+CD38- bone marrow cells with multilineage potential at the single-cell level: key role of thrombopoietin. Blood. 1997, 90(6):2282-92.

• Broxmeyer H.E. 1989, Human umblical cord blood as a potential source of transplantable hematopoietic stem/progenitor cells., Proc.NatlAcad.Sci.USA, 1989, 86:3828-3832.

• Broxmeyer H.E., Cord Blood transplantation and biology. 26th Congress of ISH 1996, 295-299.

• Brugger W., Heimfeld S., Berenson RJ. Reconstitution of hematopoiesis after high dose hemotherapy by autologous progenitor cells generated ex vivo. N Engl J Med. 1995, 333:283-287.

• Brugger W., Kreutz M., Andreesen R.: Macrophage colony – stimulating factor is required for human monocyte survival and acts as a cofactor for their terminal differentiation to macrophages in vitro. J.Leukoc. Biol. 1991a; 49:483-488.

• Brugger W, Scheibenbogen C, Krause S, Andreesen R. Large-scale production of human tumorcytotoxic macrophages grown from blood monocytes of cancer patients. Cancer Detect Prev. 1991b;15(5):407-412.

• Bruno S, Gunetti M, Gammaitoni L, Dane A, Cavalloni G, Sanavio F, Fagioli F, Aglietta M, Piacibello W., In vitro and in vivo megakaryocyte differentiation of fresh and ex-vivo expanded cord blood cells: rapid and transient megakaryocyte reconstitution., Haematologica, 2003, 88, 379-387.

• Bruno S, Gunetti M, Gammaitoni L, Perissinotto E, Caione L, Sanavio F, Fagioli F, Aglietta M, Piacibello W. Fast but durable megakaryocyte repopulation and platelet production in NOD/SCID mice transplanted with ex-vivo expanded human cord blood CD34+ cells. Stem Cells. 2004, 22(2):135-143.

• Burke B, Sumner S, Maitland N, Lewis CE: Macrophages in gene therapy: cellular delivery vehicles and in vivo targets. J Leuk Biol. 2002, 72:417-428.

• Case J, Hicks C, Trickett A, Kwan YL, Manoharan A. The Expansion of Megakaryocyte Progenitors from CD34(+)-Enriched Mobilized Peripheral Blood Stem Cells Is Inhibited by Flt3-L. J Interferon Cytokine Res. 2006, 26(2):76-82.

• Cavaillon J.M.: Cytokines and macrophages. Biomed. Pharmacother. 1994; 48:445-453.

• Cella M., Jarrossay D., Facchetti F., Alebardi O., Nakajima H., Lanzavecchia A, Colonna M.: Plasmocytoid monocytes migrate to inflamed lymph nodes and produce large amounts of type I interferon. Nature Med. 1999, 5:919-923.

• Chang J, Coutinho L, Morgenstern G, Scarffe JH, Deakin D, Harrison C, Testa NG, Dexter TM. Reconstitution of haemopoietic system with autologous marrow taken during relapse of acute myeloblastic leukaemia and grown in long-term culture. Lancet. 1986, 8;1(8476):294-5.

• Charbord P., Newton I., Schaal J.P., Herve P., The separation of human cord blood by density gradient do not induce a major loss of progenitor cells. Bone marrow Transpalant. 1992, 9:109-110.

• Chivu M, Diaconu CC, Bleotu C, Alexiu I, Brasoveanu L, Cernescu C. The comparison of different protocols for expansion of umbilical-cord blood hematopoietic stem cells. J Cell Mol Med. 2004, 8(2):223-31.

• Conneally E., Cashman A., Petzer A., Eaves C. Expansion in vitro of transplantable human cord blood stem cells demonstrated using a quantitative assay of their lympho-myeloid repopulating activity in nonobese diabetic-scid/scid mice. Proc. Natl. Acad. Sci. 1997, 94:9836-9841.

• Cutler S.C., Lee S.J., Greenberg P., H. Deeg J., Pérez W.S., Anasetti C., Bolwell B.J, Cairo M.S., Gale R.P., Klein J.P., Lazarus H.M., Liesveld J.L., McCarthy P.L., Milone G.A., Rizzo J. D., Schultz K.R., Trigg M.E., Keating A., Weisdorf D.J., Antin J.H., Horowitz M.M., A decision analysis of allogeneic bone marrow transplantation for the myelodysplastic syndromes: delayed transplantation for low-risk myelodysplasia is associated with improved outcome., Blood 2004, 104:579 - 585.

• da Silva CL, Goncalves R, Crapnell KB, Cabral JM, Zanjani ED, Almeida-Porada G. A human stromal-based serum-free culture system supports the ex vivo expansion/maintenance of bone marrow and cord blood hematopoietic stem/progenitor cells. Exp Hematol. 2005, 33(7):828-835.

• De Bruyn C, Delforge A, Martiat P, Bron D. Ex vivo expansion of megakaryocyte progenitor cells: cord blood versus mobilized peripheral blood. Stem Cells Dev. 2005, 14(4):415-424.

• Denning-Kendall P.A., Donaldson C., Nicol A., Nieda M., Hows J.M., Optimal processing of human cord blood for clinical banking. Exp.Hematol. 1996, 24:1394-1401.

• Devine S.M., Lazarus H.M., Emerson S.G., Clinical Application of hematopoietic progenitor cell expansion: current satus and future prospects., Bone Marrow Transplant. 2003, 31:241-252.

• de Wynter E.A., Emmerson J.B., Testa N.G., Properties of peripheral and cord blood stem cells., Baill Clin Hematol. 1999, 12:1-17.

• Dexter TM, Allen TD, Lajtha LG, Schofield R, Lord BI. Stimulation of differentiation and proliferation of haemopoietic cells in vitro. J Cell Physiol. 1973, 82(3):461-73.

• Dorrell C., Gan O.I., Pereira D.S., Hawley R.G., Dick J.E., Expansion of human cord blood CD34+CD38- cells in ex vivo culture during retroviral transduction without a corresponding increase in SCID repopulating cell (SRC) frequency: dissociation of SRC phenotype and function, Blood 2000, 95:102-110.

• Douglas S.D., Musson r.a.: Phagocytic defects – monocytes/macrophages. Clin. Immunol. Immunophatol. 1986, 40:62.

• Emmerson S.: Ex Vivo Expansion of Hematopoietic Precursors, Progenitors, and Stem Cells: The Next Generation of Cellular Therapeutics. Blood 1996, 87 (8):3082-3088.

• Emminger W., Zlabinger G.J., Fritsh G., Urbanek R.: CD14^{dim}/CD16^{bright} monocytes in hemophagocytic lymphohistiocytosis. Eur J Immunol 2001, 31:1716-1719.

• Engelhardt M, Douville J, Behringer D, Jahne A, Smith A, Henschler R, Lange W. Hematopoietic recovery of ex vivo perfusion culture expanded bone marrow and unexpanded peripheral blood progenitors after myeloablative chemotherapy. Bone Marrow Transplant. 2001, 27(3):249-59.

• Engel H., Kaya E., Bald R., Kolhagen H., Grecu O., Schondorf T., Brenne U., Kurbacher C.M., Gohring U.J., Kleine M., Mallmann P.: Fetal Cord Blood as an Alternative Source of Haematopoietic Progenitor Cells: Immunophenotype, Maternal Cell Contamination, end Ex Vivo Expansion., The Journal of Hematotherapy 1999, 8: 141-155.

• Eun-Seon Yoo, Kyung-Ha Ryu, Hae-Young Park, Chu-Myung Seong, Wha-Soon Chung, Seung-Cheol Kim, Yong-Mook Choi, Myong-Joon Hahn, So-Youn Woo, Ju-Young Seoh: Myeloid differentiation of human cord blood CD34+ cells during ex vivo expansion using thrombopoietin, flt3-ligand and/or granulocyte-colony stymulating factor. Br J Haematol 1999, 105:1034-1040.

• Faradji A, Bohbot A, Frost H, Schmitt-Goguel M, Siffert JC, Dufour P, Eber M, Lallot C, Wiesel ML, Bergerat JP, et al. Phase I study of liposomal MTP-PE-activated autologous monocytes administered intraperitoneally to patients with peritoneal carcinomatosis. J Clin Oncol. 1991, 9(7):1251-1260.

• Feng Y, Zhang L, Xiao ZJ, Li B, Liu B, Fan CG, Yuan XF, Han ZC.: An effective and simple expansion system for megakaryocyte progenitor cells using a combination of heparin with thrombopoietin and interleukin-11. Exp Hematol. 2005, 33(12):1537-1543.

• Fidler IJ, Jessup JM, Fogler WE, Staerkel R, Mazumder A. Activation of tumoricidal properties in peripheral blood monocytes of patients with colorectal carcinoma. Cancer Res. 1986, 46(2):994-998.

• Finnin M, Hamilton JA, Moss ST: Characterization of a CSF-induced proliferating subpopulation of peripheral blood monocytes by surface marker expression and cytokine production. J Leuk Biol 1999, 66:953-960.

• Flores-Guzman P, Gutierrez-Rodriguez M, Mayani H: In vitro proliferation, sion and differentaition of a CD34(+) cell-enriched hematopoietic cell population from human umbilical cord blood in response to recombinant cytokines. Arch Med Res 2002, 33:107-114.

• Flores-Guzman P., Flores-Figueroa E., Martinez-Jaramillo G., Mayani H., In vitro characterization of two lineage-negative CD34+ cell-enriched hematopoietic cell populations from human UC blood., Cytotherapy 2005, 7:334-344.

• Foguenne J, Huygen S, Greimers R, Beguin Y, Gothot A. Modulation of homing properties of primitive progenitor cells generated by ex vivo expansion. Haematologica. 2005, 90(4):445-51.

• Frankenberger M., Sternsdorf T., Pechumer H., Pforte A., Ziegler-Heitbrock H.W.L.: Differential cytokine expression in human blood monocyte subpopulations: a polymerase chain reaction analysis. Blood 1996, 87:373-377.

• Fu S.Q., Abboud C.N., Brennan J.K., Ifthikharuddin J.J., Nicholas D., Liesveld J.L., Impact of mobilized blood progenitor cell Quality determined by the CFU-GM/CD34+ ratio on rapid engraftment after blood stem cell transplantation., Blood Cells, Molecules, and Deseases 2002, 28:315-321.

• Gammaitoni L., Bruno S., Sanavio F., Gunetti M., Kollet O., Cavalloni G., Falda M., Fagioli F., Lapidot T., Aglietta M., Piacibello W., Ex vivo expansion of human adult stem cells capable of primary and secondary hematopoietic reconstitution., Exp Hematol. 2003, 31:261-270.

• Geissler K., Wagner T.: Cytokine combination for in vivo and ex vivo expansion of hematopoietic progenitor cells. Acta Med. Austriaca 2000, 27, suppl.52:21-24.

• Gluckman E., Broxmeyer HA., Auerbach AD.: Hematopoietic reconstitution in a patient with Fanconi's anemia by means of umbilical cord blood from HLA-identical sibling. N Engl J Med 1989, 321:1174-1178.

• Gordon S., Taylor P.R., Monocyte and macrophage heterogeneity. Nat. Rev. Immunol. 2005, 5 (12):953-964.

• Grage-Gribenow E, Lorenzen D, Fetting R, Flad HD, Ernst M: Phenotypical and functional characterization of Fcγ receptor I (CD64)-negative monocytes, a minor human monocyte subpopulation with high accessory and antiviral activity. Eur J Immunol 1993, 23:3126-3135.

• Grage-Griebenow E, Flad HD, Ernst M, Bzowska M, Skrzeczyńska J, Pryjma J: Human MO subsets as defined by expression of CD64 and CD16 differ in phagocytic activity and generation of oxygen intermediates. Immunobiology 2000, 202:42-50.

• Grage-Griebenow E, Flad HD, Ernst M: Heterogenity of human peripheral blood monocyte subsets. J Leukoc Biol. 2001a, 69:11-20.

• Grage-Griebenow E, Zawatzky R, Kahlert H, Brade L, Flad H, Ernst M: Identification of a novel dendritic cell-like subset of CD64(+)/CD16(+) blood monocytes. Eur J Immunol. 2001b, 31:48-56.

• Grande A., Montanari M., Tagliafico E., Manfredini R., Marani Z.T., Siena M., Tenedini E., Gallinelli A., Ferrari S., Physiological levels of 1- α , 25 dihydroxyvitamin D3 induce the monocytic commitment of CD34+ hematopoietic progenitors., J Leukoc Biol. 2002, 71: 641-651.

• Halle P., Rouzier C., Kanold J., Boiret N., Rapatel C., Mareynat G., Tchirkov A., Berger M., Travade P., Bonhomme J., Demeocq F.: Ex vivo expansion of CD34+/CD41+ late progenitors from enriched peripheral blood CD34+ cells. Annals of Hematology 2000, 79(1):13-19.

• Hao Q-L., Shah A.J., Thiemann F.T., Smogorzewska E.M., Crooks G.M., A functional comparison of CD34+CD38- cells in cord blood and bone marrow. Blood 1995, 86:3745-3753.

• Hao SG, Sun GL, Wu WL, Wu YL. Studies on the dynamics of biological characteristics of CD133+ cells from human umbilical cord blood during short-term culture. Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi. 2003, 11(6):569-75.

• Haylock D.N., To L.B., Dowse T.L., Juttner C.A., Simmons P.J. Ex vivo expansion and maturation of peripheral blood CD34+ cells into the myeloid lineage., Blood 1992, 80:1405-1412.

• Huang S., Law P., Young D., Ho A.D., Candidate hematopoietic stem cells from fetal tissues, umblical cord blood vs. adult bone marrow and mobilized peripheral blood. Exp. Hematol. 1998, 26:1162-1171.

• Iscove N.N., Schaw A.R., Keller G.: Net increase of pluripotential hematopoietic precursors in suspension cultures in response to IL-1 and IL-3. 1989, J Immunol. 142:2332-2337.

• Ivanovic Z, Duchez P, Dazey B, Hermitte F, Lamrissi-Garcia I, Mazurier F, Praloran V, Reiffers J, Vezon G, Boiron JM., A clinical-scale expansion of mobilized CD 34+ hematopoietic stem and progenitor cells by use of a new serum-free medium. Transfusion. 2006, 46(1):126-131.

• Kamps AW, Hendriks D, Smit JW, Vellenga E: Role of macrophage colony-stimulating factor in the differentiation and expansion of monocytes and dendritic cells from CD34⁺ progenitor cells. Med Oncol 1999, 16:46-52.

• Kapinsky M, Torzewski M, Buchler C, Duong CQ, Rothe G, Schmitz G. Enzymatically degraded LDL preferentially binds to CD14(high) CD16(+) monocytes and induces foam cell formation mediated only in part by the class B scavenger-receptor CD36. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2001, 21(6):1004-1010.

• Kawano Y, Kobune M, Chiba H, Nakamura K, Takimoto R, Takada K, Ito Y, Kato J, Hamada H, Niitsu Y., Ex vivo expansion of G-CSF-mobilized peripheral blood CD133(+) progenitor cells on coculture with human stromal cells. Exp Hematol. 2006;34(2):150-158.

• Kerre TC, De Smet G, De Smedt M, Offner F, De Bosscher J, Plum J, Vandekerckhove B. Both CD34+38+ and CD34+38- cells home specifically to the bone marrow of NOD/LtSZ scid/scid mice but show different kinetics in expansion. J Immunol. 2001;167(7):3692-3698.

• Kimura T., Minamiguchi H., Wang J., Kaneko H., Nakagawa H., Furii H., Sonoda Y., Impaired stem cell function of CD34+ cells by two different immunomagnetic beads systems, Leukemia 2003:1-9. • Kinnburg D., Russell N.H., Comparative study of CD34+ cells and subpopulations in human umblical cord blood and bone marrow. Bone Marrow Transplant. 1993, 12:498-494.

 Knopińska-Posłuszny W., Zaucha J.M., Hellmann A., Wpływ liczby poszczególnych typów progenitorów hematopoezy na regenerację układu krwiotwórczego po zabiegu alotransplantacji komórek macierzystych z krwi obwodowej (alloPBSC)., Acta Haematologica Polonica 1997, 28, 199.

• Kogler G., Callejas J., Sorg R.V., Fischer J., Migliaccio A.R., Wernet P.: The effect of different throwing methods, growth factor combinations and media on the ex vivo expansion of umbilical cord blood primitive and committed progenitors. Bone Marrow Transplant. 1998, 21(3):233-241.

• Kohler T, Plettig R, Wetzstein W, Schaffer B, Ordemann R, Nagels HO, Ehninger G, Bornhauser M. Defining optimum conditions for the ex vivo expansion of human umbilical cord blood cells. Influences of progenitor enrichment, interference with feeder layers, early-acting cytokines and agitation of culture vessels. Stem Cells. 1999, 17(1):19-24.

• Kohn D.B., Weinberg K.I., Nolta J.A., Heiss L.N., Lenarsky C., Crooks G.M., Hanley M.E., Annett G., Brooks J.S., El-Khoureiy A., Lawrence K., Wells S., Moen R.C., Bastian J., Wiliams-Herman D.E., Elder M., Wara D., Bowen T., Hershfield M.S., Mullen C.A., Blaese R.M., Parkman R., Engraftment of gene-modified umbilical cord blood cells in neonates with adenosine deaminase deficiency. Nat.Med. 1996, 1:1017-1023.

• Kopec-Szlezak J., Podstawka U., Komórki hematopetyczne CD34+ krwi pępowinowej, Acta hematologica 2001, 32:61-69.

• Koya RC, Kasahara N, Favaro PM, Lau R, Ta HQ, Weber JS, Stripecke R: Potent maturation of monocyte-derived dendritic cells after CD40L lentiviral gene delivery. J Immunother 2003, 26:451-460.

• Lazzari L., Lucchia S., Rebulla P., Porretti L., Puglisi G., Lecchi L., Sirchia G., Long-term expansion and maintenance of cord blood haematopoietic stem cells using thrombopoietin, Flt3-ligand, interleukin (IL)-6,and IL-11 in a serum-free and stroma-free culture system., Br J haematol 2001, 112:397-404.

• Lee B., Ratajczak J., Doms R.W., Gewirtz A.M., Ratajczak M.Z., Coreceptor/chemokine receptor expression on human hematopoietic cells: Biological implications for HIV-1 infection. Blood 1999, 93:1145-1156.

• Leek RD, Lewis CE, Whitehouse R, Greenall M, Clarke J, Harris AL: Association of macrophage infiltration with angiogenesis and prognosis in invasive breast carcinoma. Cancer Res 1996, 56:4625-4629.

• Lefebvre P, Winter JN, Kahn LE, Giri JG, Cohen I. Megakaryocyte ex vivo expansion potential of three hematopoietic sources in serum and serum-free medium. J Hematother. 1999, 8(2):199-208.

• Levac K, Karanu F, Bhatia M. Identification of growth factor conditions that reduce ex vivo cord blood progenitor expansion but do not alter human repopulating cell function in vivo. Haematologica. 2005, 90(2):166-72.

• Li G., Hangoc G., Broxmeyer H.E. Interleukin-10 in combination with M-CSF and IL-4, contributes to development of the rare population of CD14+CD16++ celle derived from human monocytes. Biochem Biophys Res Commun 2004, 322 (2): 637-643.

• Li K, Li CK, Chuen CK, Tsang KS, Fok TF, James AE, Lee SM, Shing MM, Chik KW, Yuen PM. Preclinical ex vivo expansion of G-CSF-mobilized peripheral blood stem cells: effects of serum-free media, cytokine combinations and chemotherapy. Eur J Haematol. 2005, 74(2):128-135.

• Liu J, Li K, Yuen PM, Fok TF, Yau FW, Yang M, Li CK. Ex vivo expansion of enriched CD34+ cells from neonatal blood in the presence of thrombopoietin, a comparison with cord blood and bone marrow. Bone Marrow Transplant. 1999, 24(3):247-252.

• Luens K.M., Travis M.A., Chen B.P., Hill B.L., Scollay R., Murray L.J., Thrombopoietin, kit Ligand, and flk/flt3 Ligand Together Induce Increased Numbers of Primitive Hematopoietic Progenitors From Human CD34⁺Thy-1⁺Lin⁻ Cells With Preserved Ability to engraft SCID-hu Bone. Blood 1998, 91:1206-1215.

• Machaj E.K, Gajkowska A, Jastrzewska M., Oldak T., Kruszewski M., Pojda Z., Short term stimulation of megakaryopoiesis in cord blood derived hematopoietic stem cells in ex vivo model, Pol Arch Med Wewn. 2002, 4(10):959-964.

• Majka M, Baj M, Kijowski J, Reca R, Ratajczak J, Ratajczak MZ. In vitro expansion of human megakaryocytes as a tool for studying megakaryocytic development and function, Platelets 2001,12(6):325-332.

• Majka M., Janowska-Wieczorek A., Ratajczak J., Kowalska M.A., Vilaire G., Pan Z.K., Honczarenko M., Marquez L.A., Poncz M., Ratajczak M.Z., Stroma derived factor-1 and thrombopoietin regulate distinct aspects of human megakaryopoiesis, Blood 2000, 96:4142-4151.

• Mantovani A, Bottazzi B, Sozzani S, Peri G, Allavena P, Dong QG, Vecchi A, Colotta F. Cytokine regulation of monocyte recruitment. Arch Immunol Ther Exp (Warsz). 1995; 43(2):149-52.

• Mantovani A: Tumor- associated macrophages. Current Opinion Immunol 1990, 2:689-692.

• Mantovani A: w Zembala M, Asherson G:"Human monocytes" Academic Press, London, 1989, 303-311.

• Mantovani A, Bottazzi B, Colotta F, Sozzani S, Ruco L: The origin and function of tumorassociated macrophages. Immunol Today 1992, 13:265-270.

• Martinez-Jaramillo G., Flores-Guzman P., Montesinos J.J., Quintana S., Bautista J., Sanchez-Valle E., de Jesus Nambo M., Mayani H., In vitro proliferation and expansion of hematopoietic progenitors in mobilized peripheral blood from normal subjects and cancer patients., Stem Cells Dev. 2004, 13:382-389.

• McNiece I, Jones R, Bearman SI, Cagnoni P, Nieto Y, Franklin W, Ryder J, Steele A, Stoltz J, Russell P, McDermitt J, Hogan C, Murphy J, Shpall EJ. Ex vivo expanded peripheral blood progenitor cells provide rapid neutrophil recovery after high-dose chemotherapy in patients with breast cancer. Blood 2000a, 96(9):3001-3007.

• McNiece I, Kubegov D, Kerzic P, Shpall EJ, Gross S. Increased expansion and differentiation of cord blood products using a two-step expansion culture. Exp Hematol. 2000b, 28(10):1181-1186.

• Moestrup SK, Moller HJ. CD163: a regulated hemoglobin scavenger receptor with a role in the anti-inflammatory response. Ann Med., 2004, 36(5):347-354.

• Mytar B., Siedlar M., Wołoszyn M., Ruggiero I., Pryjma J., Zembala M.: Induction of reactive oxygen intermediates in human monocytes by tumour cells and their role in spontaneous monocyte cytotoxicity. British Journal of Cancer 1999, 79(5/6):737-743.

• Mytar B, Wołoszyn M, Baj-Krzyworzeka M, Szatanek R, Ruggiero I, Więckiewicz J, Zembala M: Tumour cell-induced deactivation of human monocytes. J leuk Biol 2003, 74:10941101.

• Nagler A, Peacock M, Tantoco M, Lamons D, Okarma TB, Okrongly DA.., Separation of hematopoietic progenitor cells from human umbilical cord blood., J. Hematother 1993, 2:243-245.

• Naparstek E, Hardan Y, Ben-Shahar M, Nagler A, Or R, Mumcuoglu M, Weiss L, Samuel S, Slavin S. Enhanced marrow recovery by short preincubation of marrow allografts with human recombinant interleukin-3 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. Blood 1992, 80(7):1673-8.

• Ng YY, Bloem AC, van Kessel B, Lokhorst H, Logtenberg T, Staal FJ. Selective in vitro expansion and efficient retroviral transduction of human CD34+ CD38- haematopoietic stem cells. Br J Haematol. 2002, 117(1):226-37.

• Nicol A.J., Hows J.M., Bradley B.A.: Cord blood transplantation: A practical option? Brit. J. Haematol. 1994, 87:1-5.
• Pafumi C., Bosco P., Cavallaro A., Farina M., Leonardi I., Pernicone G., Bandiera S., Russo A., Giardina P., Chiarenza M., Calogero A.E., Two CD34+ stem cells from umblical cord blood enrichment methods, Pediatric Hematology and Oncology 2002, 19:239-245.

• Paquette RL, Dergham ST, Karpf E, Wang HJ, Slamon DJ, Souza L, Glaspy JA. Ex vivo expanded unselected peripheral blood: progenitor cells reduce posttransplantation neutropenia, thrombocytopenia, and anemia in patients with breast cancer. Blood 2000, 96(7):2385-90.

• Passlick B, Flieger D, Ziegler-Heitbrock HWL: Identification and charakterisation of novel monocyte subpopulation in human peripheral blood. Blood 1989, 74:2527-2534.

• Petengell R., Luft T., Henschler R., Hows J.M., Dexter T.M., Ryder D., Testa N.G., Direct comparison by limiting dilution analysis of long term culture initiating cells in human bone marrow, umblical cord blood and blood stem cells. Blood 1994, 84:3653-3659.

• Piacibello W., Gammaitoni L., Bruno S., Gunetti M., Fagioli F., Cavalloni G., Aglietta M.: Negative influence of IL-3 on the expression of human cord blood in vivo long-term repopulaing stem cells., J Hematother Stem Cell Res. 2000, 9(6):945-956.

• Piacibello W., Sanavio F., Garetto L., Severino A., Bergandi D., Ferrario J., Fagioli F., Berger M., Alietta M., Extensive amplification and self-reneval of human primitive hematopoietic stem cells from cord blood. Blood 1997, 89:2644-2653.

• Piacibello W, Sanavio F, Severino A, Dane A, Gammaitoni L, Fagioli F, Perissinotto E, Cavalloni G, Kollet O, Lapidot T, Aglietta M. Engraftment in nonobese diabetic severe combined immunodeficient mice of human CD34(+) cord blood cells after ex vivo expansion: evidence for the amplification and self-renewal of repopulating stem cells. Blood. 1999, 93(11):3736-3749.

• Pick M, Eldor A, Grisaru D, Zander AR, Shenhav M, Deutsch VR. Ex vivo expansion of megakaryocyte progenitors from cryopreserved umbilical cord blood. A potential source of megakaryocytes for transplantation. Exp Hematol. 2002, 30(9):1079-1087.

• Peled A., Petit I., Kollet O., Magid M., Ponomaryov T., Byk T., Nagler A., Ben-Hur H., Many A., Shultz L., Lider O., Alon R., Zipori D., Lapidot T., Dependence of human stem cells engraftment and repopulation of NOD/SCID mice on CXCR4. Science 1999, 283:845-848.

• Pranke P, Hendrikx J, Debnath G, Alespeiti G, Rubinstein P, Nardi N, Visser J. Immunophenotype of hematopoietic stem cells from placental/umbilical cord blood after culture. Braz J Med Biol Res. 2005, 38(12):1775-1789.

• Qiu L., Meagher R., Welhausen S., Heye M., Brown R., Herzig R.H.: Ex vivo expansion of CD34+ umblical cord blood cells in a defined serum-free medium (QBSF-60) with early effect cytokines. Hematother Stem Cell Res. 1999, 8(6):609-618.

• Qureol S., Capmany G., Cancelas J.A., Garcia J.: Expansion of cord blood progenitor cells. Bone Marrow Transplantation 1998, 21, suppl.3, 77-80.

• Ramsfjell V, Borge OJ, Cui L, Jacobsen SE. Thrombopoietin directly and potently stimulates multilineage growth and progenitor cell expansion from primitive (CD34+ CD38-) human bone marrow progenitor cells: distinct and key interactions with the ligands for c-kit and flt3, and inhibitory effects of TGF-beta and TNF-alpha. J Immunol. 1997, 158(11):5169-5177.

• Ratajczak J., Machalinski B., Samuel A., Pertusini E., Majka M., Czajka R., Ratajczak M.Z.: A novel serum free system for cloning human megakaryocytic progenitors (CFU-Meg): The role of thrombopoietin and other cytokines on bone marrow and cord blood CFU-Meg growth under serum free conditions. Folia Histochem. et Cytobiol. 1998a, 36:55-60.

• Ratajczak J., Marlicz W. Machalinski B., Pertusini E., Czajka R., Ratajczak MZ.: An improved serum free system for cloning human "pure" erythroid colonies. The role of the different growth factors and cytokines on BFU-E formation by the bone marrow and cord blood CD34+ cells. Folia Histochem. et Cytobiol. 1998b, 36:61-66.

• Ratajczak M.Z., Ratajczak J., Machaliński B., Mick R., Gewirtz A.M., In vitro and in vivo evidence that ex vivo cytokine priming of donor marrow cell may ameliorate post-transplant thrombocytopenia. Blood 1998c, 91:353-359.

• Reiffers J, Cailliot C, Dazey B, Attal M, Caraux J, Boiron JM. Abrogation of postmyeloablative chemotherapy neutropenia by ex-vivo expanded autologous CD34-positive cells. Lancet. 1999, 354(9184):1092-1093.

• Robinson SN, Ng J, Niu T, Yang H, McMannis JD, Karandish S, Kaur I, Fu P, Del Angel M, Messinger R, Flagge F, de Lima M, Decker W, Xing D, Champlin R, Shpall EJ. Superior ex vivo cord blood expansion following co-culture with bone marrow-derived mesenchymal stem cells. Bone Marrow Transplant. 2006, 37(4):359-366.

• Ross JA, Auger MJ: The biology of the macrophage. In the Macrophage, 2 nd ed. (B.Burke, C.E. Lewis, eds.), Oxford University Press, Oxford, UK 2002.

• Rothe G, Gabriel H, Kovacs E, Klucken J, Stohr J, Kindermann W, Schmitz G. Peripheral blood mononuclear phagocyte subpopulations as cellular markers in hypercholesterolemia. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 1996, 16(12):1437-1447.

• Rubinstein P, Dobrila L, Rosenfield RE, Adamson JW, Migliaccio G, Migliaccio AR, Taylor PE, Stevens CE. Processing and cryopreservation of placental/umbilical cord blood for unrelated bone marrow reconstitution. Proc Natl Acad Sci U S A. 1995, 92(22):10119-10122.

• Ruzicka K, Grskovic B, Pavlovic V, Qujeq D, Karimi A, Mueller MM. Differentiation of human umbilical cord blood CD133+ stem cells towards myelo-monocytic lineage. Clin Chim Acta. 2004, 343(1-2):85-92.

• Sadeghi HM, Schnelle JF, Thoma JK, Nishanian P, Fahey JL: Phenotypic and functional characteristics of circulating monocytes of elderly persons. Exp Gerontol 1999, 34:959-970.

• Saeland S., Caux C., Favre C., Duvert V., Pebusque M.J., Mannoni P., de Vries J.E.: Combined and sequential effects of human IL-3 and GM-CSF on proliferation of CD34+ hematopoietic cells from cord blood. Blood 1989, 73(5):1195-1201.

• Sakabe H., Yahata N., Kimura., Human cord blood-derived primitive progenitors are enriched In CD34+c-kit cells. Leukemia 1998, 10:728-734.

• Saleh MN, Goldman SJ, LoBugilo AF, Beali AC, Sabio H, McCord MC, Minasian L, Alpaugh RK, Weiner LM, Munn DH: CD16+ monocytes in patients with cancer: spontaneous elevation and pharmacologic induction by recombinant human macrophage colony-stimulating factor. Blood 1995, 85:2910-2917.

• Sanders J., Buckner C.D., Bensinger W.I., Levy W., Chard R., Thomes E.D., Experience with marrow harvesting from donors less than two years of age. Bone Marrow Transplant. 1987, 2: 45-50.

• Schwartz R.M., Emerson S.G., Clarke M.F., Palsson B.O., In vitro myelopoiesis stimulated by rapid medium exchange and supplementation with hematopoietic growth factor., Blood 1991, 78: 3155-3161.

• Schwinger W., Bebesch M., Lackner H., Kerbl R., Walcher M., Urban C.: Comparison of different methods of separation and ex vivo expansion of cord blood progenitor cells. Annals of Hematology 1999, 78(8):364-370.

• Sconocchia G, Fujiwara H, Rezvani K, Keyvanfar K, El Ouriaghli F, Grube M, Melenhorst J, Hensel N, Barrett AJ: G-CSF-mobilized CD34⁺ cells cultured in interleukin-2 and stem cell factor generate a phenotypically novel monocyte. J Leukoc Biol 2004, 76:1214-1219.

• Sconocchia G, Keyvanfar K, Ouriaghli EI, Grube M, Rezvani K, Fujiwara H, McCoy JP, Hensel NBarrett AJ: Phenotype and function of a CD56+ peripheral blood monocyte. Leukemia 2005, 19:69-76.

• Siedlar M, Frankenberger M, Ziegler-Heitbrock HWL, Belge KU: The M-DC8-psitive leukocytes are a subpopulation of the CD14⁺/CD16⁺ monocytes. Immunobiol 2000, 202:11-17.

• Siedlar M., Mytar M., Hyszko M., Zembala M.: Involvment of protein kinases in signalling for nitric oxide (NO) and tumour necrosis factor alpha (TNF) production by monocytes stimulated

with colorectal DeTa cancer cells: the lack of evidence for thr role of TNF in the regulation of NO production. Immunology Letters 1999, 65:189-195.

• Skrzeczynska J, Kobylarz K, Hartwich Z, Zembala M, Pryjma J. CD14+CD16+ monocytes in the course of sepsis in neonates and small children: monitoring and functional studies. Scand J Immunol. 2002, 55(6):629-38.

• Smogorzewska E.M., Zastosowanie macierzystych komórek krwiotworzenia w terapii genowej., Pol. Arch. Med. Wewn. 1996, 96:511-519.

• Smogorzewska E.M., Barsky L.W., Crooks G.M., Weinberg K.I., Purification of hematopoietic stem cells from humane bone marrow and umblical cord blood. Journal of Immunol, 1997, 22: 232-239.

• Spooncer E., Dexter T.M., Transplantation of long term cultured bone marrow cells., Transplantation, 1983, 35:624-627.

• Srour E.F., Abonour R., Cornetta K., Traycoff C.: Ex Vivo Expansion of Hematopoieic Stem and Progenitor Cells: Are We There Yet? The Journal of Hematotherapy 1999, 8:93-102.

• Stiff P., Chen B., Franklin W., Oldenberg D., Hsi E., Bayers R., Shpall E., Douville J., Mandalam R., Malhotra D., Muller T., Armstrong D., Smith A.: Autologus transpalantation of ex vivo expanded bone marrow cells grown from small aliquots after high-dose chemotherapy for breast cancer. Blood 2000, 95(6):2169-2174.

Szaflarska A, Baj-Krzyworzeka M, Siedlar M, Węglarczyk K, Ruggiero I, Hajto B, Zembala M: Antitumour response of CD14⁺/CD16⁺ monocyte subpopulation. Exp Hematol 2004, 32:748-755.

• Tanaka M, Honda J, Imamura Y, Shiraishi K, Tanaka K, Oizumi K: Surface phenotype analysis of CD16+ monocytes from leukapheresis collections for peripheral blood progenitors. Clin Exp Immunol 1999, 116:57-61.

• Tang S, Li Y, Wang M, Yang C. Research on expansion of CD34+ cells from umbilical cord blood using different cytokine groups in vitro. Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban. 2003, 34(3):398-400.

• Tarach J.S., Hematopoetyczne komórki macierzyste szpiku kostnego i antygen CD34, Aca Hematologica 1999, 30:225-233.

• Testrapen L.W., Huang S., Safford M., Landsdorp P.M., Loken M.R., Sequential generations of hematopoietic colonies derived from single non lineage commited progenitor cell. Blood 1991, 77:1218-1226.

• Thomas R, Lipsky PE: Human peripheral blood dendritic cell subsets. Isolation and characterisation of precursor and mature antigen-presenting cells. J Immunol 1994, 153:4016-4028.

• To L.B., Haylock D.N., Simmson P.J., Jytter C.A., The biology and clinical uses of blood stem cells. Blood 1997, 89:2233-2258.

• Tsai V., Firestein G.S., Arend W., Zvaifler N.J.: Cytokine – induced differentiation of cultured nonadherent macrophages. Cell. Immunol. 1992; 144:203-216.

• Ueda T, Tsuji K, Yoshino H, Ebihara Y, Yagasaki H, Hisakawa H, Mitsui T, Manabe A, Tanaka R, Kobayashi K, Ito M, Yasukawa K, Nakahata T. Expansion of human NOD/SCID-repopulating cells by stem cell factor, Flk2/Flt3 ligand, thrombopoietin, IL-6, and soluble IL-6 receptor. J Clin Invest. 2000, 105(7):1013-21.

• Ulloa-Montoya F, Verfaillie CM, Hu WS. Culture systems for pluripotent stem cells. J Biosci Bioeng. 2005, 100(1):12-27.

• Valledor A.F., Borras F.E., Cullell-Young M., Celada A.: Transcription factors that regulate monocyte/macrophage differentiation. J. leukoc. Biol. 1998; 63:405-417.

• Walter R.B., Bächli E.B., Schaer D.J., Rüegg R., Schoedon G.: Expression of the hemoglobin scavenger receptor (CD163/HbSR) as immunophenotypic marker of monocytic lineage in acute myeloid leukemia. Blood 2003, 101, 3755-3756.

• Van den Oudenrijn S., von dem Borne A.E., de Haas M, Difference in megakaryocyte expansion potential between CD34+ stem cels derived from cord blood, eripheral blood, and bone marrow from adults and children., Exp.Hematol. 2000, 28:1054-1061.

• Wang J.C.Y., Doedens, Dick J.E., Primitive human hematopoietic cells are enriched in cord blood compared with adult bone marrow or mobilized peripheral blood as measured by the quantitative in vivo SCID repopulating cell assay. Blood 1997, 89:3919-3924.

• Wang YF, Li Q, Meng HX, Yu Z, Liu JH, Cui W, Zhou Y, Mai YJ, You SG, Qiu LG. Preliminary study on extensive amplification of human dendritic cells differentiated from cord blood CD34+ progenitor cells by two-step culture. Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi. 2004, 25(2):70-73.

• van Ravenswaay Claasen HH, Kluin PM, Fleuren GJ: Tumor infiltrating cells in human cancer. On the possible role of CD16+ macrophages in antitumor cytotoxicity. Lab Invest 1992, 67(2):166-174.

• Vavrova J., Vokurkova D., Marekova M., Blaha M., Jebavy L., Filip S.: Antiapoptotic Cytokine IL-3 + SCF + FLT3L Influence on Proliferation of Gamma-Iradiated AC133+/CD34+ Progenitor Cells., Folia Biologica 2002, 48:51-57.

• Vincent F., Eischen A., Bergerat J.P., Faradji A., Bohbot A., Oberling F.: Human bloodderived macrophages: differentiation in vitro of a large quantity of cells in serum-free medium. Exp. Hematol. 1992, 20:17-23.

• Voermans C., Gerritsen W., Borne A., Increased migration of cord blood cells, as compared to the bone marrow and mobilized peripheral blood CD34+ cells. Exp Hematol. 1999, 27:806-814.

• Weber C, Belge KU, von Hundelshausen P, Draude G, Steppich B, Mack M, Frankenberger M, Weber KSC, Ziegler-Heitbrock HWL: Differential chemokine receptor expression and function in human monocyte subpopulations. J Leuk Biol 2000, 67:699-704.

• Weekx E., Bockstale D., Plum J., CD34++ CD38- and CD34+ CD38+ human hematopoietic progenitors from fetal liver, cord blood, and adult bone marrow respond differently to hematopoietic cytokines depending on the ontogenic source. Exp Hematol. 1998, 26(11):1034-42.

• Williams SF, Lee WJ, Bender JG, Zimmerman T, Swinney P, Blake M, Carreon J, Schilling M, Smith S, Williams DE, Oldham F, Van Epps D. Selection and expansion of peripheral blood CD34+ cells in autologous stem cell transplantation for breast cancer. Blood. 1996, 87(5):1687-91.

• Wu A.G., Michejda M., Mazumder A., Meechan K.R., Tchabo J.G., Slack R., Jonson M.P., Bellanti J.A., Analysis and characterization of hematopoietic progenitor cells from fetal bone marrow, adult bone marrow, peripheral blood, and cord blood, Pediatr. Res. 1999, 46:163-169.

• Zembala M, Buckle A: Monocytes in malignant disease. Zembala M, Asherson G: "Human monocytes" Academic Press, London 1989, 514-528.

• Zembala M, Czupryna A, Więckiewicz J, Jasiński M, Pryjma J, Ruggiero I, Siedlar M, Popiela T: Tumour-cell-induced production of tumour necrosis factor by monocytes of gastric cancer patients receiving BCG immunotherapy. Cancer Immunol Immunother 1993, 36:127-132.

• Zembala M, Mytar B, Woloszyn M, Popiela T, Uracz W, Czupryna A. Monocyte TNF production in gastrointestinal cancer. Lancet. 1988, 2(8622):1262-1264.

• Zembala M, Siedlar M, Marcinkiewicz J Pryjma J: Human monocytes are stimulated for nitric oxide release in vitro by some tumor cells but not by cytokines and lipopolisaccharide. Eur J Immunol 1994a, 24:435-439.

• Zembala M, Siedlar M, Ruggiero I, Więckiewicz J, Mytar B, Mattei M, Colizzi V: The MHC class-II and CD44 molecules are involved in the induction of tumour necrosis factor (TNF) gene expression by human monocytes stimulated with tumour cells. Int J Cancer 1994b, 56:269-274.

• Zembala M, Uracz W, Ruggiero I, Mytar B, Pryjma J: Isolation and functional charakteristic of FcR+ and FcR- human monocyte subsets. J Immunol 1984, 133:1293-1299.

• Ziegler-Heitbrock HWL: Definition of human blood monocytes. J Leuk Biol 2000, 67:603-606.

• Ziegler-Heitbrock HWL, Fingerle G, Strőbel M, Schraut W, Stelter F, Schűt C, Passlick B, Pforte A: The novel subset of CD14⁺/CD16⁺ blood monocytes exhibit features of tissue macrophages. Eur J Immunol 1993, 23:2053-2058.

• Ziegler-Heitbrock HWL: Heterogeneity of human blood monocytes: the CD14+/CD16+ subpopulation. Immunol Today 1996, 17:424-428.