



УДК 57; 576; 576.5; 57.085.23

ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ ГИПОКСИИ НА ОБРАЗОВАНИЕ ЭРИТРОЦИТОВ ИЗ ИНДУЦИРОВАННЫХ ПЛЮРИПОТЕНТНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА

Семенова А.Е.^{1,2}, Кумашева В.Т.¹, Мухлис Ш.Е.¹, Огай В.Б.¹

¹Национальный центр биотехнологии,

Коргальжинское шоссе, 13/5, г. Нур-Султан, 010000, Казахстан

²Евразийский национальный университет им. Л.Н. Гумилева

ул. Сатпаева, 2, г. Нур-Султан, 010000, Казахстан.

ogay@biocenter.kz

АБСТРАКТ

Получение эритроцитов из гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) человека рассматривается одним из решений недостатка донорской крови в трансфузиологии. Недостатком использования ГСК являются сложности в размножении в необходимом количестве для применения в трансфузии. В связи с этим, плюрипотентные стволовые клетки, имеющие возможность быть размноженными в достаточном количестве, могут стать источником получения функциональных эритроцитов. Цель работы заключалась в изучении эффектов гипоксии на образование эритроцитов из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК) человека в условиях *ex vivo*. Для получения эритроидных телец (ЭТ), ИПСК человека культивировали в индукционной среде, содержащей плазму человека и SCF, VEGF, BMP-4, TPO, EPO, интерлейкины IL-3 и IL-6 (20 дней). ЭТ, обработали коллагеназой и культивировали в 96-луночном планшете для суспензионных культур в условиях нормоксии (21% O₂) и гипоксии (2% O₂) в среде ИМДМ, содержащей 20% плазмы человека, SCF, IL-3, EPO, инсулин и гепарин. Эритроидное созревание проводили окрашиванием по Гимза и анализом CD235a в проточной цитометрии. В результате дифференцировки ПСК были получены ЭТ со сферической морфологией и размером от 120 до 300 мкм. Анализ на эритроидное созревание показал, что количество зрелых эритроцитов с экспрессией CD235a после гипоксии составляло в среднем 56%, а после нормоксии 19,3% от общего числа анализируемых клеток. Размер эритроцитов, образовавшихся из ИПСК, составлял в среднем 7 мкм, что соответствует зрелой форме этого типа клеток. Таким образом, полученные результаты исследования указывают на то, что гипоксия играет существенную роль в эритропоэзе, повышая уровень образования эритроцитов из ИПСК человека.

Ключевые слова: индуцированные плюрипотентные стволовые клетки, дифференцировка, эритроциты, гипоксия

ВВЕДЕНИЕ

Трансфузия эритроцитов является одной из наиболее распространенных процедур, используемых клиниками для спасения жизней людей. Эта процедура необходима для восполнения потерянного объема крови вследствие травм или операций, а так же она используется для пациентов перенесших трансплантацию органов от донора, пациентов страдающих лейкоемией и серповидно-клеточной анемией. С появлением новых технологий в области лечения и старения населения спрос на продукты крови продолжает расти. В настоящее время все компоненты крови, использующиеся для трансфузионной медицины, получены от добровольных доноров, которых периодически бывает недостаточно, к тому же

существует определенный риск для реципиента, касающийся переноса инфекций таких как: ВИЧ, гепатит и т.д. [1].

Для решения проблемы, связанной с дефицитом донорской крови, были разработаны методы получения эритроцитов из гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) человека, выделенных из различных источников - костный мозг, периферическая и пуповинная кровь. Однако, как показала практика, ГСК трудно размножить в необходимом количестве, что ограничивает возможность использования клеток для высоко-масштабного промышленного производства эритроцитов [2]. Недавно было показано, что альтернативным источником клеток крови могут быть плюрипотентные стволовые клетки (ПСК), которые могут быть размножены в неограниченном количестве, представляя тем самым неисчерпаемый источник получения эритроцитов.

К настоящему времени, несколько групп исследователей уже разработали методы для получения эритроцитов как из эмбриональных стволовых клеток (ЭСК), так из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК) [3, 4]. Эти методы можно разделить на две главные категории: 1) получение эритроцитов посредством культивирования и дифференцировки ПСК человека на ксеногенных фидерных клетках [4], 2) получение эритроцитов посредством культивирования ПСК в суспензии для формирования эмбриоидных тел (ЭТ), используя определенные ростовые факторы и цитокины [5]. К сожалению, несмотря на то, что первый методологический подход получения эритроцитов из ПСК показал потенциал для крупномасштабного производства эритроцитов, использование ксеногенных фидерных клеток является основным препятствием для трансляции этой технологии в клиническую практику. Вторым методом состоит из двух главных этапов: 1) формирование ЭТ из ИПСК человека и их индукция в эритроидном направлении в присутствии цитокинов и факторов роста без использования фидерных клеток и 2) дифференциация/созревание до стадии эритроцитов в присутствии определенных цитокинов факторов роста [6]. Благодаря простой методологии, не требующей стромальных фидерных клеток и ксеногенных белков, Н. Lapillonne впервые сообщил о получении зрелых культивируемых эритроцитов, содержащих фетальный гемоглобин в функциональной тетрамерной форме. Однако, несмотря на эти технологические достижения, высокая стоимость, связанная с культивированием и дифференцировкой ИПСК, остается основным препятствием на пути промышленного производства эритроцитов.

Хорошо известно, что концентрация кислорода является важным фактором в поддержании функциональной активности стволовых клеток. Было показано что, пониженное содержание кислорода (5% O₂) способствует росту и размножению мезенхимальных стволовых клеток, полученных из костного мозга, выживанию клеток нервного гребня, гемопоэтических стволовых клеток и предотвращает спонтанную дифференциацию ЭСК человека [7-9]. В других случаях, гипоксия может быть использована в качестве стимулятора способствующая эффективной дифференцировке стволовых клеток в различные типы клеток. Более того, было обнаружено, что гипоксия оказывает существенное влияние на продукцию ростовых факторов и цитокинов, вовлеченных в регуляцию эритропоэза у млекопитающих в частности эритропоэтина. Действительно недавно было показано, пониженное содержание кислорода существенно повышает *ex vivo* продукцию эритроцитов из CD34⁺ клеток пуповинной крови человека [10].

Принимая во внимание вышеуказанные литературные данные, мы предположили, что использование низких концентраций кислорода может способствовать эффективной дифференцировке ИПСК человека в функционально активные эритроциты, содержащие зрелые формы гемоглобина.

В связи с этим, цель проекта заключается в изучении эффектов гипоксии на образование эритроцитов из ИПСК человека в условиях *ex vivo*.

Эритропоэз - это сложный многостадийный процесс, который начинается с дифференцировки плюрипотентных гемопоэтических стволовых клеток в костном мозге и заканчивается формированием эритроцитов. Было показано, что у позвоночных данный

динамический процесс регулируется уровнем кислорода и требует организованного действия определенных молекулярных механизмов регулирующих пролиферацию клеток, апоптоз и блокировку клеточного цикла в терминальной стадии созревания. Принимая во внимание эти данные, мы предположили, что использование низких концентраций кислорода может способствовать дифференцировке ИПСК в эритроциты. Для того, чтобы проверить наше предположение, в данном научном проекте ИПСК были индуцированы и дифференцированы в эритроидные клетки в условиях гипоксии в присутствии соответствующих ростовых факторов и цитокинов. Данное исследование может дать новые сведения по регуляции эритропоэза в условиях гипоксии, и будет полезным для оптимизации технологии получения эритроцитов из ИПСК в условиях *ex vivo*. В настоящее время, данного рода исследования не проводились в Казахстане и других странах. В литературе имеются данные только о влиянии гипоксии на *ex vivo* продукцию эритроцитов из CD34+ клеток пуповинной крови человека [10, 11].

Материалы и методы

Культивирование плюрипотентных стволовых клеток человека. Для культивирования и размножения ИПСК использовали специальный матрикс Geltrex™ LDEV-Free hESC-qualified Basement Membrane Matrix (Life Technologies, UK), который подготавливался и наносился на культуральную посуду, согласно рекомендации производителя. ИПСК после пассирования наносили на заранее подготовленный матрикс и культивировали в безсывороточной среде E8 (Life Technologies, USA), содержащая 2 мМ L-глутамакса, 1% смеси второстепенных аминокислот, 4 нг/мл основного фактора роста фибробластов человека (b-FGF), 50 Ед./мл пенициллина и 50 мкг/мл стрептомицина (все из Life Technologies, UK). Смену среды проводили через день. Пассирование ИПСК проводили с помощью обработки колоний 0,1% раствором коллагеназы тип IV (Life Technologies, UK). Пересев ИПСК осуществляли по мере роста колоний, в среднем, через каждые 7 дней. Излишки клеток замораживали в среде для ЭСК с добавлением 20% ДМСО при -70°C в криозамораживающем контейнере (Nalgene, USA) в течение суток, а затем переносили в сосуд Дьюара с жидким азотом на длительное хранение.

Иммунофлуоресцентный анализ плюрипотентных стволовых клеток. Клетки фиксировали свежеприготовленным раствором 4% параформальдегида в фосфатно-солевом буфере (ФСБ). После пятиминутной обработки тритоном X-100 клетки отмывали ФСБ три раза в течение 5 мин. После отмывки ФСБ, добавляли 1 % раствор альбумина на 30 мин. Далее клетки инкубировали с антителами против OCT3/4, SOX2, TRA-1-60 и SSEA-4. Для приготовления необходимой концентрации антитела разводили в растворе, содержащем 1% альбумина и 0,1% Tween 20 в ФСБ. Первичные антитела разводили в следующем соотношении: моноклональные мышинные антитела против OCT3/4 – 1:50 (BD Pharmigen, USA), поликлональные кроличьи антитела против SOX2 – 1:200 (Life Technologies, UK), моноклональные мышинные антитела против SSEA-4 – 1:100 (BD Pharmigen, USA), моноклональные мышинные антитела против TRA-1-60 – 1:100 (BD Pharmigen, USA). Инкубирование препаратов клеток в растворе антител проводили при 37°C в течение 1 часа. После трех пятиминутных отмывок в растворе 0,2% Tween 20 к препаратам клеток наносили раствор козжих анти-кроличьих (1:500) и анти-мышинных антител (1:500), конъюгированных с флуорохромом Alexa Fluor 488 и 555 и инкубировали 1 час при комнатной температуре в темноте. Клетки отмывали от раствора антител три раза по 5 мин. раствором 0,2% Tween 20, после чего промывали в ФСБ и сушили на воздухе в темноте. После высушивания под покровное стекло наносили по 10 мкл анти-выгорающего раствора с красителем DAPI для окрашивания ядер клеток (Life Technologies, UK). Препараты анализировали с помощью флуоресцентного микроскопа Axio Observer (Carl Zeiss, Germany). Снимки получали с помощью CDD-камеры (CarlZeiss, Germany) и программного обеспечения Zen 2012. Обработку полученных снимков осуществляли с помощью программы Image J.



Эритроидная индукция и дифференцировка в эритроциты. Для получения эритроидных телец (ЭТ), недифференцированные ИПСК человека обрабатывали с помощью 0,05М ЭДТА (Life Technologies, UK), считали в гемоцитометре и рассевали в круглодонный 96-луночный планшет с ультранизкой адгезией (Nunc, USA) в среде IMDM, содержащей 10% плазму человека, фактор стволовых клеток (SCF, 100 нг/мл), тромбopoэтин (ТРО, 100 нг/мл), FLT3-лиганд (FLT3, 100 нг/мл), рекомбинантный человеческий васкулярный эндотелиальный ростовой фактор (VEGF-A; 5 нг/мл), рекомбинантный человеческий костный морфогенный протеин-4 (BMP4; 10 нг/мл), интерлейкин-3 (IL-3; 5 нг/мл), интерлейкин-6 (IL-6; 5 нг/мл) и эритропоэтин (Еро; 3 Ед./мл) (все реагенты из Life Technologies, UK). ИПСК человека культивировались в течение 20 дней при 37°C и 5% CO₂ со сменой среды каждые 4-5 дней. Затем полученные ЭТ диссоциировали до одноклеточной суспензии с помощью 0,1% коллагеназы I типа (Life Technologies, UK) в течение 30 мин, и 0,05М ЭДТА в течение 10 мин. Одна часть диссоциированных клеток культивировалась в 96-луночных планшетах в условиях нормоксии: при 37°C и 5% CO₂, а вторая часть в условиях гипоксии: в гипоксической камере (Stem Cell Technologies) с низким содержанием кислорода 2% при 37°C. В период 0-8 дней клетки в количестве 10⁶ кл/мл культивировали в среде IMDM, содержащей 10% плазмы фактор стволовых клеток (SCF, 100 нг/мл), интерлейкин-3 (IL-3; 5 нг/мл), эритропоэтин (Еро; 3 Ед./мл), инсулин 10 мг/мл и гепарин 3 Ед./мл. В период 8-11 дней дифференцирующиеся эритроидные клетки переводили в среду IMDM с фактором стволовых клеток (SCF, 100 нг/мл) и эритропоэтином (Еро; 3 Ед./мл). В период 11-26 дней эритроидные клетки культивировались в среде IMDM включающий только эритропоэтин (3 Ед./мл). На 26 день дифференцировки, полученные клетки анализировали окрашиванием по Гимза и с помощью проточной цитометрии.

Иммуноцитохимический анализ эритроидных клеток. Клетки фиксировали свежеприготовленным раствором 4% параформальдегида в фосфатном буфере. После пятиминутной обработки тритоном X-100 клетки отмывали ФСБ три раза в течение 5 мин. После отмывки ФСБ, добавляли 1 % раствор бычьего сывороточного альбумина (БСА) на 30 мин. Далее клетки инкубировали с антителами против CD71 и CD235α (BD Pharmingen, USA). Для приготовления необходимой концентрации антитела разводили в растворе, содержащем 1% БСА и 0,1% Tween 20 в ФСБ. Первичные антитела разводили в следующем соотношении: мышинные моноклональные антитела к CD71 в разведении 1:50, а к CD235α в разведении 1:100 и инкубировали 37°C в течение 1 часа. После трех пятиминутных отмывок в растворе 0,2% Tween 20 к препаратам клеток наносили раствор козьих анти-мышинных антител (1:500), конъюгированных с флуорохромом Alexa Fluor 488 или 555 и инкубировали 1 час при комнатной температуре в темноте. Клетки отмывали от раствора антител три раза по 5 мин. раствором 0,2% Tween 20, после чего промывали в ФСБ и сушили на воздухе в темноте. После высушивания под покровное стекло наносили по 10 мкл анти-выгорающего раствора с красителем DAPI для окрашивания ядер клеток (Life Technologies, UK). Препараты анализировали с помощью флуоресцентного микроскопа Axio Observer (Carl Zeiss, Germany). Снимки получали с помощью CCD-камеры (Carl Zeiss, Germany) и программного обеспечения Zen 2012. Обработку полученных снимков осуществляли с помощью программы Image J.

Проточная цитометрия. Для определения экспрессии поверхностных антигенов CD235α и CD71, клетки осаждали центрифугированием, удаляли супернатант и отмывали промывочным буфером для проточной цитометрии. Затем 5 × 10⁵ клеток переносили в 5 мл конические центрифужные пробирки и центрифугировали 5 минут при 1500 об./мин. Далее клетки инкубировали с антителами CD71-FITC в разведении 1:50 и CD235α-PE в разведении 1:20 при 4°C в течение 30 минут. Клетки отмывали от раствора антител и добавили 300 мкл промывочного буфера. Клетки были проанализированы на проточном цитофлуориметре FACS AriaTM III (BD Biosciences, USA).

Метод окрашивания клеток по Гимзе. Для окраски клетки были промыты ФСБ и зафиксированы метанолом на 2 минуты. Затем вносили 1-2 мл краситель Гимзе на 1 минуту

и равное количество дистиллированной воды на 3 минуты. После промывали окрашенные клетки дистиллированной водой 3 раза и просушивали на воздухе. Наблюдали под световым микроскопом эритроциты, окрашенные розово-оранжевым цветом и базофильные клетки, окрашенные темно-синим цветом.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Получение эритроцитов из плюрипотентных стволовых клеток человека в условиях нормоксии и гипоксии. Для получения эритроцитов из плюрипотентных стволовых клеток был использован двухстадийный метод дифференцировки ПСК в эритроциты: I стадия – получение эритроидных телец и дифференцировка в эритроидные прогениторные клетки, II стадия - дифференцировка в эритроциты. Схема получения эритроцитов из ПСК человека представлена на рисунке 1.

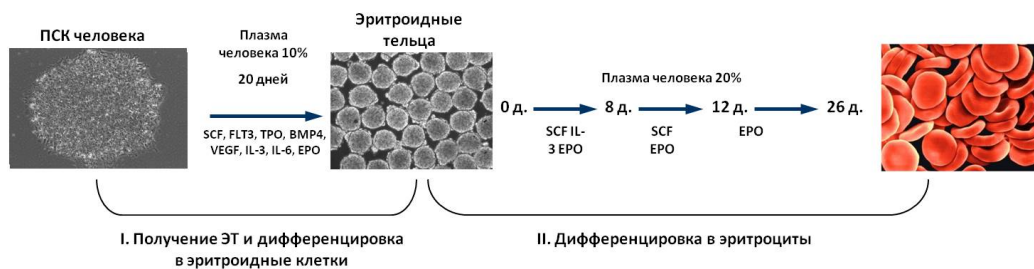


Рис. 1. Схема получения эритроцитов из ПСК человека

Перед началом эксперимента по дифференцировке ИПСК человека в эритроциты был проведен иммуноцитохимический анализ для того, чтобы подтвердить, что культура ИПСК сохраняет экспрессию плюрипотентных маркеров. Как видно на рисунке 2, колонии ИПСК достоверно экспрессировали все четыре специфических маркера: Oct4, Sox2, SSEA-4 и Tra-1-60, что указывает на то, что ИПСК являются плюрипотентными.

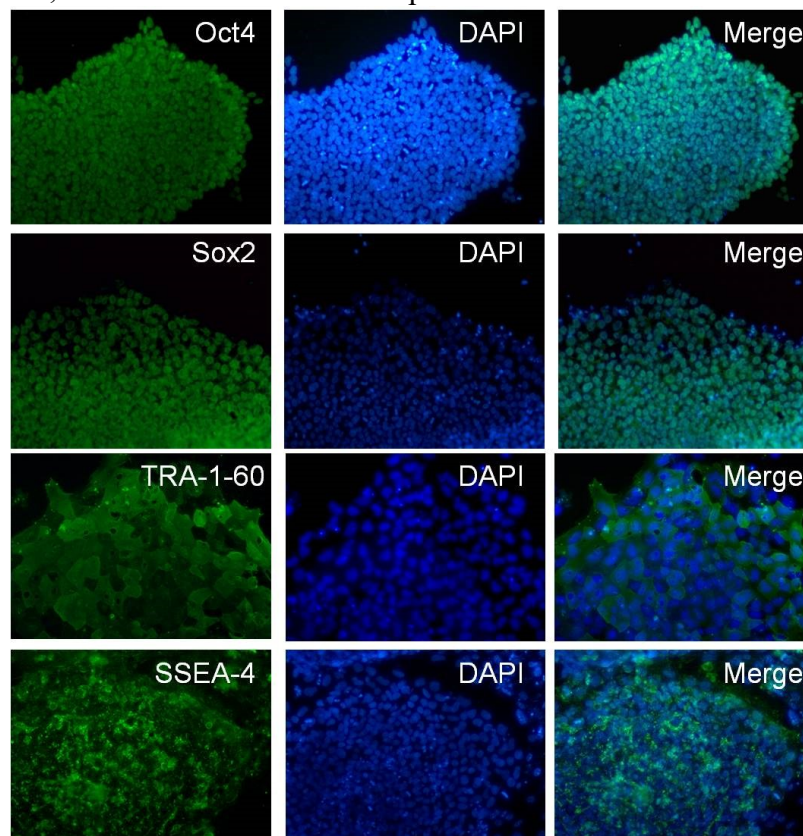
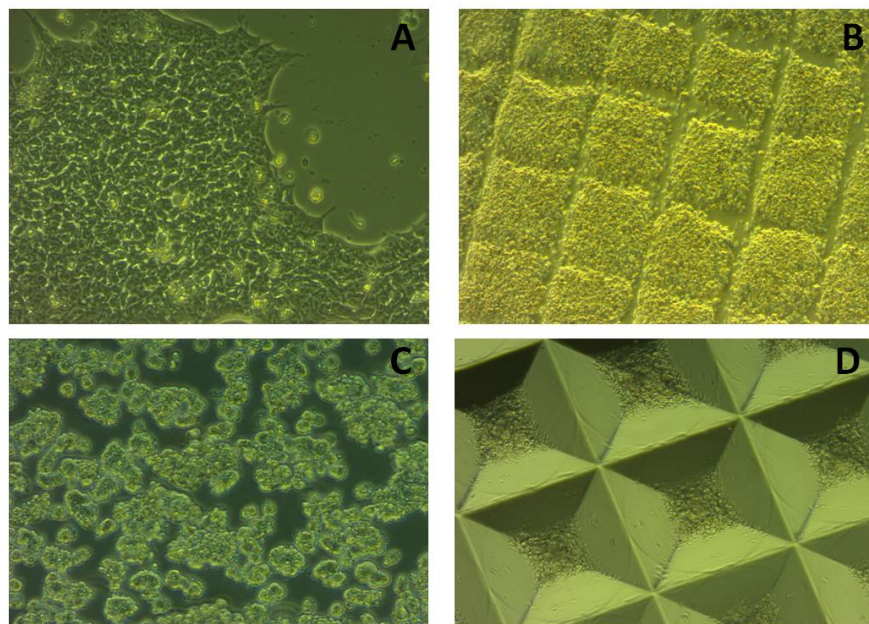


Рис. 2. Иммуноцитохимический анализ ПСК человека

После проведения иммуноцитохимического анализа, колонии ИПСК были пропассированы и перенесены на микролунки планшета Aggrewell 400 для формирования ЭТ, как показано на рисунке 3.



А – колония ИПСК до пассирования; **В** – колония ИПСК разделена на равномерные куски с помощью специального роликового ножа; **С** – суспензия ИПСК после пассирования; **Д** – ИПСК в микролунках планшета Aggrewell 400 для формирования ЭТ

Рис. 3. Этапы подготовки ИПСК для формирования ЭТ

Далее, для индукции в эритроидном направлении к ЭТ была добавлена индукционная среда содержащая плазму человека, фактор роста SCF, ростовой фактор васкулярных эндотелиальных клеток (VEGF), костный морфогенный протеин (BMP-4), тромбопоэтин (ТРО), эритропоэтин (ЕРО), интерлейкины IL-3 и IL-6 для культивирования в течение 20 дней. Результаты формирования ЭТ из ИПСК представлены на рисунке 4.

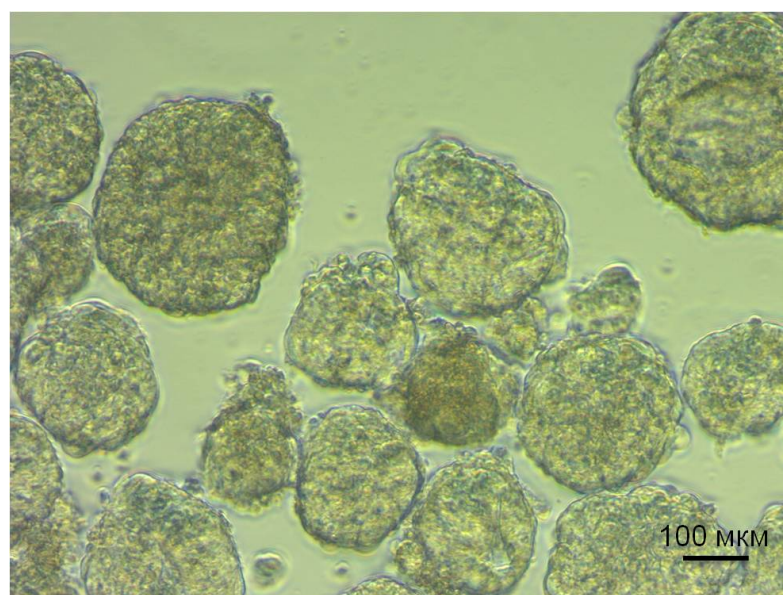


Рис. 4. Морфология сформировавшихся эритроидных телец на 20 день

Большинство ЭТ имели сферическую морфологию, а их размер варьировал от 120 до 300 мкм. Более того, иммуноцитохимический анализ показал, что клетки ЭТ экспрессируют

CD71, который является специфическим маркером эритроидных прогениторных клеток (рисунок 5).

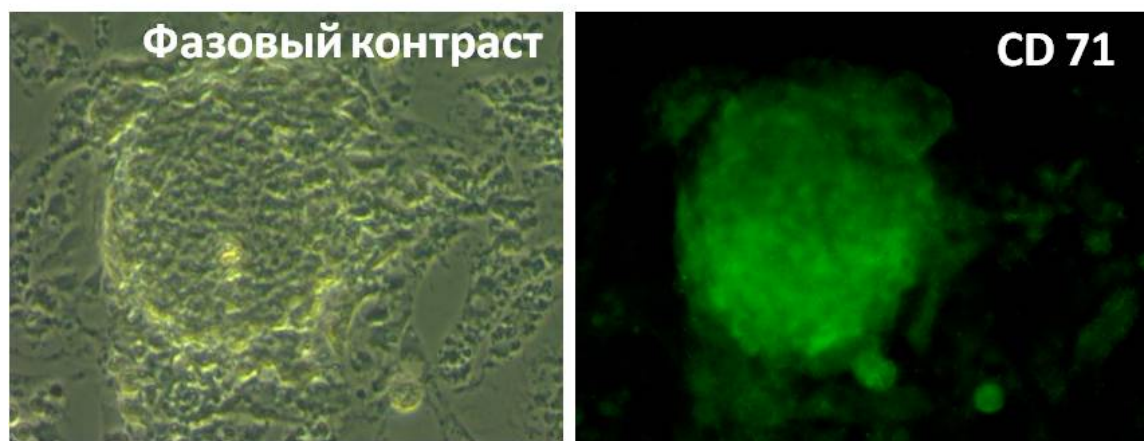


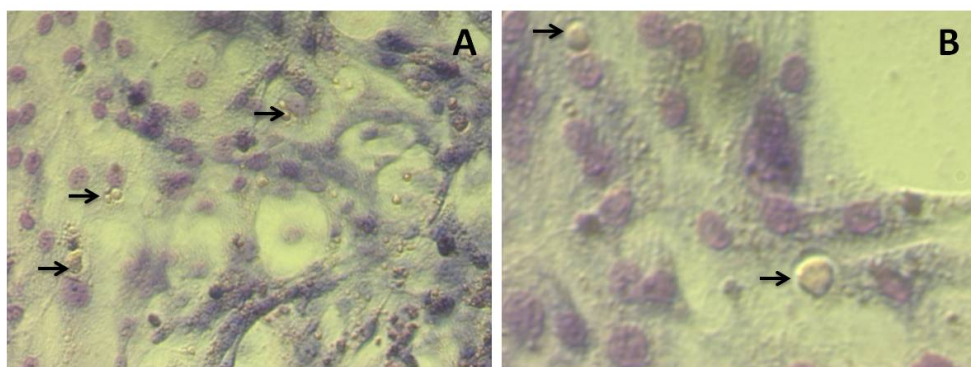
Рис. 5. Экспрессия CD71 (маркер эритроидных прогениторных клеток) в ЭТ на 20 день

Далее для дальнейшей дифференцировки в эритроциты полученные на I-стадии ЭТ были обработаны коллагеназой для получения одноклеточной суспензии эритроидных клеток, которые были перенесены в лунки 96-луночного планшета для суспензионных культур для культивирования в условиях нормоксии (21% O₂) и гипоксии (2% O₂). В каждой лунке планшета инкубировались по 5×10^4 клеток в среде ИМДМ, содержащей 20% плазмы человека, фактор стволовых клеток (SCF, 100 нг/мл), интерлейкин-3 (IL-3; 5 нг/мл), эритропоэтин (Еро; 3 Ед/мл), инсулин (10 мг/мл) и гепарин 3 Ед/мл. Для культивирования в условиях гипоксии была использована гипоксическая камера-инкубатор (Stem Cell Technologies), как показано на рисунке 6. Культивирование клеток проводили в CO₂-инкубаторе при 37°C. Анализ на эритроидное созревание оценивали по клеточной морфологии после окрашивания красителем Гимза и по экспрессии поверхностного эритроидного маркера CD235α с помощью проточной цитометрии.



Рис. 6. Гипоксическая камера-инкубатор

Результаты морфологического анализа показали, что на 26 день культивирования в условиях нормоксии образуется относительно небольшое количество безъядерных эритроидных клеток, которые были определены по окрашиванию Гимзой в розоватый или оранжевый цвет, как видно на рисунке 7. Полученные в условиях нормоксии эритроидные клетки имели дисковидную морфологию и размер 6-8 мкм. Более того, иммуноцитохимический анализ и проточная цитометрия показали, что безъядерные эритроидные клетки экспрессируют поверхностный маркер CD235α, который характерен для зрелых эритроцитов человека (рисунок 8). Количество CD235α⁺ клеток образовавшиеся в результате дифференцировки ИПСК в условиях нормоксии составило 19,3 % от общего числа клеток.



А – морфология эритроидных клеток. Окрашивание по Гимза. Стрелки указывают на безъядерные клетки (эритроциты). Увеличение 100х.

В - морфология эритроидных клеток. Увеличение 400х.

Рис. 7. Морфологический анализ эритроидных клеток на 26 день дифференцировки в эритроциты в условиях нормоксии.

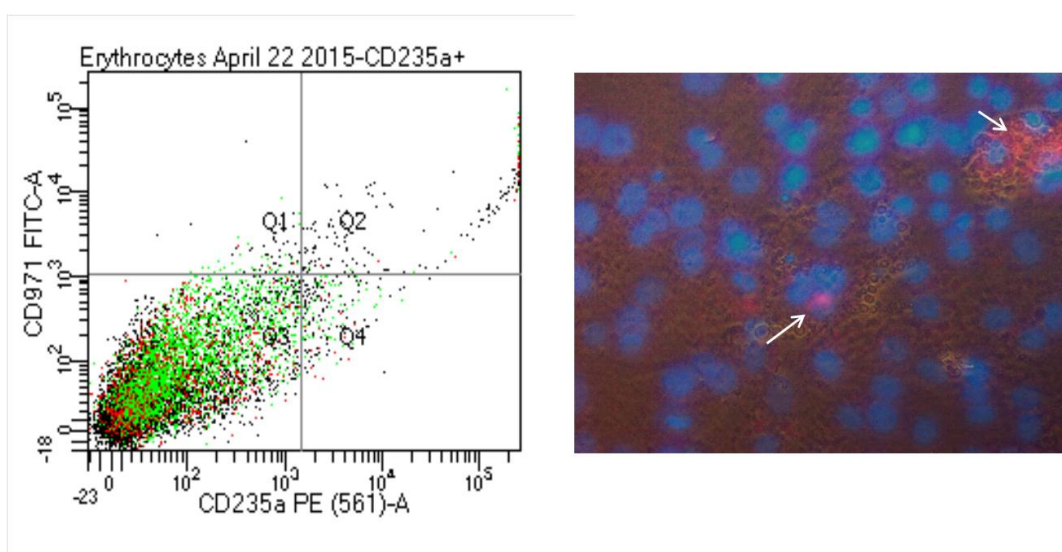


Рис. 8. Экспрессия CD235 α на 26 день культивирования эритроидных клеток в условиях нормоксии. Стрелки указывают на CD235 α + эритроциты

В условиях гипоксии на 26 день культивирования, количество безъядерных эритроидных клеток с дисковидной двояковыпуклой морфологией было существенно больше по сравнению с выходом клеток в условиях нормоксии. На рисунке 9 представлен результат морфологического анализа клеток после окрашивания по Гимзе, на котором видны образовавшиеся безъядерные клетки, окрашенные в розоватый и красно-оранжевый цвет.

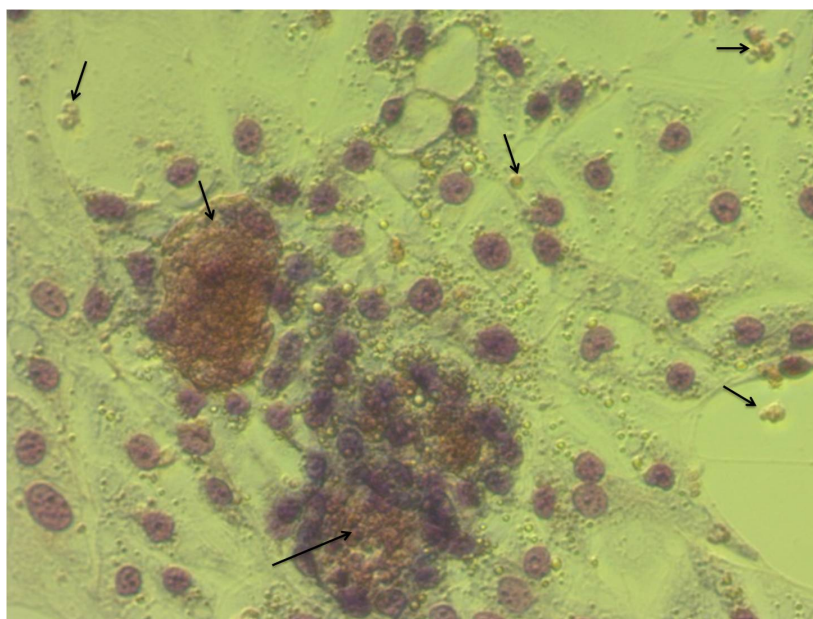


Рис. 9. Морфологический анализ эритроидных клеток на 26 день дифференцировки в эритроциты. Стрелки указывают на безъядерные эритроидные клетки (эритроциты)

Эритроциты были распределены как в виде одиночных безъядерных клеток, так и в виде слипшихся клеточных агрегатов. Иммуноцитохимия и проточная цитометрия также показали, что безъядерные клетки экспрессируют маркер зрелых эритроцитов CD235 α . По сравнению с количеством CD235 α ⁺ клеток, полученные в условиях нормоксии, число CD235 α ⁺ эритроцитов при гипоксии достигало 56,4% (рисунок 10).

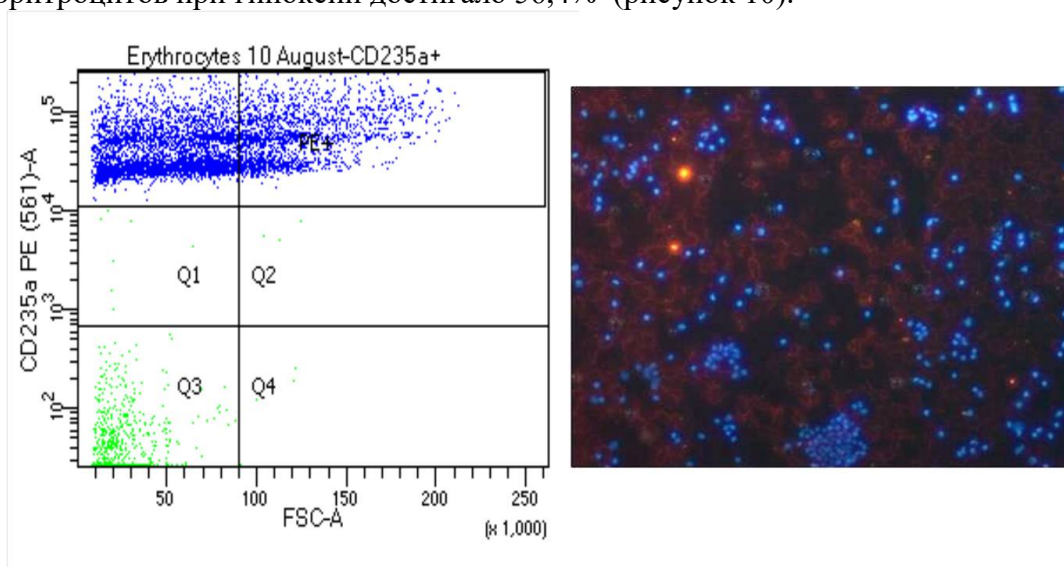


Рис. 10. Экспрессия CD235 α на 26 день культивирования эритроидных клеток в условиях гипоксии

ОБСУЖДЕНИЕ

В данной работе мы провели исследование, целью которого было изучить влияние гипоксии на дифференцировку ИПСК в эритроциты человека.

Для получения эритроцитов из плюрипотентных стволовых клеток был использован двухстадийный метод дифференцировки ИПСК в эритроциты: I стадия – получение эритроидных телц и дифференцировка в эритроидные прогениторные клетки, II стадия - дифференцировка в эритроциты. В качестве сравнения часть клеток культивировалась в условиях нормоксии (21% O₂ или 5% CO₂). На первой стадии для индукции дифференцировки ИПСК в эритроидном направлении, клетки культивировали в

круглодонных лунках 96-луночного планшета с ультразвуковой адгезией в присутствии целого ряда цитокинов и факторов роста, необходимые для эритроидной дифференцировки такие как, фактор роста стволовых клеток SCF, тромбопоэтин, FLT3-лиганд, рекомбинантный человеческий васкулярный эндотелиальный ростовой фактор VEGF, рекомбинантный человеческий костный морфогенный протеин-4 (BMP-4), интерлейкин-3, интерлейкин-6 и эритропоэтин. В результате первой стадии были получены эритроидные тельца клетки которых экспрессировали специфический маркер эритроидных прогениторных клеток CD71 [12]. Это говорит о том, что индукция дифференцировки ИПСК в эритроидном направлении прошла успешно. На второй стадии, полученные эритроидные прогениторные клетки были разделены для культивирования в условиях нормоксии и гипоксии в присутствии SCF, интерлейкина-3 и эритропоэтина. В результате было обнаружено, что на 26 день культивирования в условиях нормоксии образуется относительно небольшое количество безъядерных эритроидных клеток, которые были определены после окрашивания красителем Гимза. Полученные в условиях нормоксии эритроциты имели дисковидную морфологию и размер 6-8 мкм. Иммуноцитохимический анализ и проточная цитометрия показали, что только определенная часть безъядерных эритроидных клеток экспрессируют поверхностный маркер CD235a, который характерен для зрелых эритроцитов человека. Количество CD235a⁺ клеток образовавшиеся в результате дифференцировки ИПСК в условиях нормоксии составило 19,3 % от общего числа клеток.

В результате культивирования в условиях низкой концентрации кислорода (~2% O₂), количество безъядерных эритроидных клеток с дисковидной двояковыпуклой морфологией было существенно больше по сравнению с выходом клеток в условиях нормоксии. Иммуноцитохимия и проточная цитометрия показали, что безъядерные клетки, также экспрессируют маркер зрелых эритроцитов CD235a. По сравнению с количеством CD235a⁺ клеток, полученные в условиях нормоксии, число CD235a⁺ эритроцитов при гипоксии достигало 56,4%.

Этот стимулирующий эффект возможно объясняется тем, что гипоксия в комбинации с фактором стволовых клеток SCF, интерлейкином-3 и эритропоэтином вызывает повышение пролиферации и дифференцировки эритроидных прогениторных клеток, как это было обнаружено в исследованиях проведенные Cippoleshi M. и Vlaski M. [10, 11]. Cippoleshi M. показал, что культивирование CD34⁺ прогениторных клеток пуповинной крови человека в условиях гипоксии (1% O₂) приводит к повышению образования и поддержания эритроидных колониеобразующих единиц в культуре клеток. Vlaski M. обнаружила, что низкие концентрации кислорода (1,5 – 5%) вызывают размножение эритроидных прогениторных клеток и усиление их пролиферации и дифференцировки в эритроциты в условиях *ex vivo*. Кроме того, в исследованиях научной группы под руководством профессора R. Paulson был обнаружен синергический эффект гипоксии и фактора роста стволовых клеток, приводящий к повышению уровня пролиферации и дифференцировки Kit+CD71+TER119⁺ эритроидных прогениторных клеток мышей с анемией [13]. Мы также предполагаем, что обнаруженный данный эффект также связан с повышением продукции экзогенного эритропоэтина (ЕРО) эритроидными прогениторными клетками, поскольку было обнаружено, что ЕРО продуцируется не только клетками почки, но и гемопоэтическими и эритроидными клетками-предшественниками [14].

ВЫВОДЫ

В проведенном исследовании мы обнаружили, что гипоксия действительно является мощным фактором, оказывающим значительное влияние на дифференцировку стволовых/прогениторных клеток, приводящим к существенному образованию эритроцитов. В следующем исследовании, планируется изучение вопроса о регуляторных механизмах, за счет которых происходит повышение пролиферации и дифференцировки эритроидных прогениторных клеток, полученных из ИПСК человека. Считаем, что данное исследование



представит новые сведения по регуляции эритропоэза в условиях гипоксии и будет полезно для оптимизации технологии получения эритроцитов из ИПСК в условиях *ex vivo*.

Финансирование

Данная работа была выполнена в рамках научно-технической программы О.0666 «Развитие трансляционной и персонализированной медицины для создания основ биомедицинской индустрии в Республике Казахстан на 2014-2016 гг.» на базе лаборатории клеточных технологий ЧУ «NLA» Назарбаев Университета.

ЛИТЕРАТУРА

1. Slukvin I.I. Generation of mature blood cells from pluripotent stem cells// *Haematologica*. - 2010. - Vol. 95, № 10. - P. 1621-3.
2. Anstee D.J., Gampel A., Toyne A.M. *Ex-vivo* generation of human red cells for transfusion//*Curr Opin Hematol.*- 2012. - Vol.19, № 3. - P. 163-169.
3. Anstee D.J. Production of erythroid cells from human embryonic stem cells (hESC) and human induced pluripotent stem cells (hiPS) // *Transfus Clin Biol.*- 2010.- Vol. 17, № 3.- P. 104-109.
4. Ledran M.H., Krassowska A., Armstrong L. Efficient hematopoietic differentiation of human embryonic stem cells on stromal cells derived from hematopoietic niches// *Cell Stem Cell*. - 2008. - Vol. 3, № 1. - P. 85-98.
5. Lapillonne H., Kobari L., Mazurier C., Tropel P., Giarratana M.C., Zanella-Cleon I., Kiger L., Wattenhofer-Donzé M., Puccio H., Hebert N., Francina A., Andreu G., Viville S., Douay L. Red blood cell generation from human induced pluripotent stem cells: perspectives for transfusion medicine// *Haematologica*. - 2010. - Vol. 95, № 10. - P. 1651-1659.
6. Kobari L., Yates F., Oudrhiri N., Francina A., Kiger L., Mazurier C., Rouzbeh S., El-Nemer W., Hebert N., Giarratana M.C., François S., Chapel A., Lapillonne H., Luton D., Bennaceur-Griscelli A., Douay L. Human induced pluripotent stem cells can reach complete terminal maturation: in vivo and in vitro evidence in the erythropoietic differentiation model // *Haematologica*. - 2012. - Vol. 97, № 12. - P. 1795-803.
7. Morrison S.J., Csete M., Groves A.K., Melega W., Wold B., Anderson D.J. Culture in reduced levels of oxygen promotes clonogenic sympathoadrenal differentiation by isolated neural crest stem cells // *J Neurosci*. - 2000. - Vol. 20, № 19. - P. 7370-7376.
8. Danet G.H., Pan Y., Luongo J.L., Bonnet D.A., Simon M.C. Expansion of human SCID-repopulating cells under hypoxic conditions // *J Clin Invest*. - 2003.- Vol. 112, № 1. - P. 126-35.
9. Ezashi T., Das P., Roberts R.M. Low O₂ tensions and the prevention of differentiation of hES cells// *Proc Natl Acad Sci USA*. - 2005. - Vol. 102, № 13. - P. 4783-4788.
10. Vlaski M., Lafarge X., Chevalerey J., Duchez P., Boiron J.M., Ivanovic Z. Low oxygen concentration as a general physiologic regulator of erythropoiesis beyond the EPO-related downstream tuning and a tool for the optimization of red blood cell production *ex vivo*// *Exp Hematol*. - 2009. - Vol. 37, № 5. - P. 573-84.
11. Cipolleschi M.G., D'Ippolito G., Bernabei P.A., Caporale R., Nannini R., Mariani M., Fabbiani M., Rossi-Ferrini P. Severe hypoxia enhances the formation of erythroid bursts from human cord blood cells and the maintenance of BFU-E *in vitro*// *Exp Hematol*. - 1997. - Vol. 25, № 11. - P.1187-94.
12. Dong H.Y., Wilkes S., Yang H. CD71 is selectively and ubiquitously expressed at high levels in erythroid precursors of all maturation stages: a comparative immunochemical study with glycophorin A and hemoglobin A // *Am J Surg Pathol*. - 2011. -Vol.35, № 5. - P. 723-32.



13. John M. Perry, Omid F. Harandi, Robert F. Paulson. BMP4, SCF, and hypoxia cooperatively regulate the expansion of murine stress erythroid progenitors // *Blood*. – 2007. - Vol. 109, № 10. - P. 4494-502.
14. Stopka T., Zivny J.H., Stopkova P., Prchal J.F., Prchal J.T. Human hematopoietic progenitors express erythropoietin // *Blood*. – 1998. - Vol. 91, № 10. - P. 3766-3772.

REFERENCES

1. Slukvin I.I. Generation of mature blood cells from pluripotent stem cells. *Haematologica*, 2010, vol. 95, no 10, pp. 1621-3. 20884715.
2. Anstee D.J., Gampel A., Tøye A.M. Ex-vivo generation of human red cells for transfusion. *Curr Opin Hematol*, 2012, Mol. 19, no 3, pp. 163-169. 22406823.
3. Anstee D.J. Production of erythroid cells from human embryonic stem cells (hESC) and human induced pluripotent stem cells (hiPS). *Transfus Clin Biol*, 2010, vol. 17, no 3, pp. 104-109. 20655785.
4. Ledran M.H., Krassowska A., Armstrong L. Efficient hematopoietic differentiation of human embryonic stem cells on stromal cells derived from hematopoietic niches. *Cell Stem Cell*, 2008, vol. 3, no 1, pp. 85-98. 18593561.
5. Lapillonne H., Kobari L., Mazurier C., Tropel P., Giarratana M.C., Zanella-Cleon I., Kiger L., Wattenhofer-Donzé M., Puccio H., Hebert N., Francina A., Andreu G., Viville S., Douay L. Red blood cell generation from human induced pluripotent stem cells: perspectives for transfusion medicine. *Haematologica*, 2010, vol. 95, no 10, pp. 1651-1659. 20494935.
6. Kobari L., Yates F., Oudrhiri N., Francina A., Kiger L., Mazurier C., Rouzbeh S., El-Nemer W., Hebert N., Giarratana M.C., François S., Chapel A., Lapillonne H., Luton D., Bennaceur-Griscelli A., Douay L. Human induced pluripotent stem cells can reach complete terminal maturation: in vivo and in vitro evidence in the erythropoietic differentiation model. *Haematologica*, 2012, vol. 97, no 12, pp. 1795-803. PMID: 22733021.
7. Morrison S.J., Csete M., Groves A.K., Melega W., Wold B., Anderson D.J. Culture in reduced levels of oxygen promotes clonogenic sympathoadrenal differentiation by isolated neural crest stem cells. *J Neurosci*, 2000, vol. 20, no 19, pp. 7370-7376. 11007895.
8. Danet G.H., Pan Y., Luongo J.L., Bonnet D.A., Simon M.C. Expansion of human SCID-repopulating cells under hypoxic conditions. *J Clin Invest*, 2003, vol. 112, no 1, pp. 126-35. 12840067.
9. Ezashi T., Das P., Roberts R.M. Low O₂ tensions and the prevention of differentiation of hES cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005, vol. 102, no 13, pp. 4783-4788. 15772165.
10. Vlaski M., Lafarge X., Chevaleyre J., Duchez P., Boiron J.M., Ivanovic Z. Low oxygen concentration as a general physiologic regulator of erythropoiesis beyond the EPO-related downstream tuning and a tool for the optimization of red blood cell production *ex vivo*. *Exp Hematol*, 2009, vol. 37, no 5, pp. 573-84. 19375648.
11. Cipolleschi M.G., D'Ippolito G., Bernabei P.A., Caporale R., Nannini R., Mariani M., Fabbiani M., Rossi-Ferrini P. Severe hypoxia enhances the formation of erythroid bursts from human cord blood cells and the maintenance of BFU-E *in vitro*. *Exp Hematol*, 1997, vol. 25, no 11, pp. 1187-94. 9328456.
12. Dong H.Y., Wilkes S., Yang H. CD71 is selectively and ubiquitously expressed at high levels in erythroid precursors of all maturation stages: a comparative immunochemical study with glycophorin A and hemoglobin A. *Am J Surg Pathol*, 2011, vol. 35, no 5, pp. 723-32. 21415701.
13. John M. Perry, Omid F. Harandi, Robert F. Paulson. BMP4, SCF, and hypoxia cooperatively regulate the expansion of murine stress erythroid progenitors. *Blood*, 2007, vol. 109, no 10, pp. 4494-502. 17284534.
14. Stopka T., Zivny J.H., Stopkova P., Prchal J.F., Prchal J.T. Human hematopoietic progenitors express erythropoietin. *Blood*, 1998, vol. 91, no 10, pp. 3766-3772. 9573013.

АДАМНЫҢ ИНДУЦИРЛЕНГЕН ПЛЮРИПОТЕНТТІ БАҒАНАЛЫ ЖАСУШАЛАРЫНАН ЭРИТРОЦИТТЕРДІҢ ПАЙДА БОЛУЫНА ГИПОКСИЯНЫҢ ӘСЕРІН ЗЕРТТЕП БІЛУ

Семенова А.Е.^{1,2}, Кумашева В.Т.¹, Мухлис Ш.Е.¹, Огай В.Б.¹

¹Ұлттық биотехнология орталығы,

Қорғалжын тас жолы, 13/5, Нұр-Сұлтан қ., 010000, Қазақстан Республикасы.

²Л.Н. Гумилева атындағы Еуразиялық Ұлттық Университеті

Сатпаев к., 2, Нұр-Сұлтан қ., 010000, Қазақстан Республикасы.
ogay@biocenter.kz

ТҮЙІН

Трансфузиологияда донорлық қанның жетіспеушілігінің шешімдерінің бірі - адамның гемопоэтикалық бағаналы жасушаларынан (ГБЖ) эритроциттердің өндірілуі. Жасушалық культурада ГБЖ-дың функционалды эритроциттердің дереккөзі ретінде потенциалы бар және оларды сүйек кемігінен, перифериялық және кіндік қанынан алуға болады. ГБЖ-дың қолданудың кемшілігі - трансфузия кезінде қолдану үшін қажетті мөлшерде қайта шығарудың қиындығы. Осыған байланысты жеткілікті мөлшерде көбейтуге болатын плюрипотентті бағаналы жасушалар функционалды эритроциттердің дереккөзі бола алады. Адамның индуцирленген плюрипотентті бағаналы жасушаларынан (ИПБЖ) эритроциттердің пайда болуына гипоксияның әсерін *ex vivo* жағдайында зерттеуі нысаны болып табылды. Эритроидтық денелерді (ЭД) алу үшін адамның ПБЖ-ы адам плазмасы мен факторлары: SCF, VEGF, BMP-4, TPO, EPO, IL-3 және IL-6 интерлейкиндері бар индукциялық ортада өсірілді (20 күн). ЭЛ-ді, коллагеназамен өңделген және суспензиялық культуралар үшін 96-ұңғымалы планшетте 20% адам плазмасы, SCF, IL-3, EPO, инсулин және гепарин бар IMDM ортасында нормоксия (21% O₂) және гипоксия (2% O₂) жағдайында өсірілген. Алынған жасушаларды эритроидтың жетілуіне талдау үшін Гимза бояумен бояу және CD235a эритроидті маркерінің ағынды цитометриясында көрсету арқылы жүргізілді. ПБЖ-дың дифференциациясының нәтижесінде сфералық морфологиясы мен өлшемдері 120-дан 300 мкм-ге дейінгі ЭД алынды. Эритроидтың жетілуіне арналған талдау көрсеткендей, гипоксиядан кейін CD235a экспрессиясы бар жетілген эритроциттердің саны орташа алғанда 56%, ал нормоксиядан кейін талданған жасушалардың жалпы санының 19,3% құрайды. ИПБЖ-дан түзілген эритроциттердің мөлшері орта есеппен 7 мкм құрайды, бұл жасушалардың осы түрінің жетілген түріне сәйкес келеді. Осылайша, алынған зерттеу нәтижелері гипоксия эритропоэзде маңызды рөл атқаратынын көрсетеді, адамның ИПБЖ-дан эритроциттердің түзілу деңгейін жоғарылатады.

Негізгі сөздер: индуцирленген плюрипотентті бағаналы жасушалар, дифференцировка, эритроциттер, гипоксия.

STUDY OF THE INFLUENCE OF HYPOXIA ON THE FORMATION OF ERYTHROCYTES FROM INDUCED PLURIPOTENT HUMAN STEM CELLS

Seменова А.У.^{1,2}, Кумашева В.Т.¹, Мухлис Ш.Е.¹, Огай В.Б.¹



¹National Center for Biotechnology

13/5, Korgalzhyn road, Nur-Sultan, 010000, Kazakhstan

²L.N. Gumilyov Eurasian National University

2, Satpayev str., Nur-Sultan, 010000, Kazakhstan

ogay@biocenter.kz

ABSTRACT

The production of erythrocytes from human hematopoietic stem cells (HSC) is considered one of the solutions to the deficiency of donor blood in transfusion medicine. The disadvantage of using HSC is the difficulty in multiplying in the required amount for use in transfusion. In this regard, pluripotent stem cells that can be multiplied in sufficient quantity may become a source of functional erythrocytes. The aim of this work was to study the effects of hypoxia on the formation of erythrocytes from human induced pluripotent stem cells (iPSCs) in *ex vivo* conditions. For the obtaining the erythroid bodies (EB), human iPSCs were cultured in induction medium containing human plasma and SCF, VEGF, BMP-4, TPO, EPO, interleukins IL-3 and IL-6 (20 days). EB treated with collagenase and cultured in a 96-well suspension culture plate under normoxia (21% O₂) and hypoxia (2% O₂) conditions in IMDM medium containing 20% human plasma, SCF, IL-3, Epo, insulin and heparin. Erythroid maturation was evaluated by Giemsa staining and flow cytometry analysis of CD235 α . As a result of PSC differentiation, EBs with spherical morphology and sizes from 120 to 300 μ m were obtained. Analysis for erythroid maturation showed that the number of mature erythrocytes with expression of CD235 α after hypoxia averaged 56%, and after normoxia 19.3% of the total number of analyzed cells. The size of erythrocytes formed from iPSCs averaged 7 μ m, which corresponds to the mature form of this type of cells. Thus, the obtained results of the study indicate that hypoxia plays a significant role in erythropoiesis, increasing the level of erythrocyte formation from human iPSCs.

Key words: induced pluripotent stem cells, differentiation, erythrocytes, hypoxia.