

ISSN 1814-6023 (Print)

ISSN 2524-2350 (Online)

УДК [616.155.05:618.48]:576.364-092.4

<https://doi.org/10.29235/1814-6023-2020-17-1-78-86>

Поступила в редакцию 18.10.2019

Received 18.10.2019

А. С. Войтехович¹, Е. В. Васина¹, В. С. Костюнина¹, И. Н. Северин², Н. В. Петевка¹

¹Республиканский научно-практический центр трансфузиологии и медицинских биотехнологий,
Минск, Республика Беларусь

²Республиканский научно-практический центр онкологии и медицинской радиологии
им. Н. Н. Александрова, Минск, Республика Беларусь

ВЛИЯНИЕ ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫХ КЛЕТОК НА ЭРИТРОИДНУЮ ДИФФЕРЕНЦИРОВКУ ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ПУПОВИННОЙ КРОВИ *IN VITRO*

Аннотация. В работе изучено влияние эндотелиальных клеток (ЭК) пуповинной крови на прирост и созревание в эритроидном направлении гемопоэтических клеток при их совместном культивировании, а также экспрессия генов «взрослого» и фетального гемоглобина при эритроидной дифференцировке в условиях моделирования васкулярной ниши *in vitro*. Используются культуральные методы, проточная цитометрия, полимеразная цепная реакция в реальном времени и морфологический анализ цитологических препаратов.

Разработан метод эритроидной дифференцировки гемопоэтических стволовых клеток пуповинной крови в условиях моделирования васкулярной ниши костного мозга *in vitro*. Установлено, что полученные из мононуклеаров пуповинной крови CD34⁺CD31⁺CD144⁺CD105⁺CD90⁺CD45⁻ предшественники эндотелиальных клеток (ПЭК) стимулируют эритроидную дифференцировку гемопоэтических CD34⁺ клеток пуповинной крови и прирост предшественников эритроидного ряда при совместном культивировании с 4-х по 11-е сутки в присутствии фактора стволовых клеток, эритропоэтина и фактора роста фибробластов-2. Моделирование *in vitro* васкулярной ниши с использованием ПЭК пуповинной крови позволяет получить прирост зрелых CD36⁺CD235a⁺ клеток эритроидного ряда в 2,5 раза выше, чем в условиях суспензионной культуры без вспомогательных клеток. Микроокружение ЭК не влияет на уровень и соотношение экспрессии фетального и «взрослого» типов гемоглобина в ходе дифференцировки *in vitro*.

Ключевые слова: эритроидная дифференцировка *in vitro*, гемопоэтические клетки пуповинной крови человека, эндотелиальные клетки пуповинной крови человека

Для цитирования: Влияние эндотелиальных клеток на эритроидную дифференцировку гемопоэтических стволовых клеток пуповинной крови *in vitro* / А. С. Войтехович [и др.] // Вест. Нац. акад. наук Беларуси. Сер. мед. наук. – 2020. – Т. 17, № 1. – С. 78–86. <https://doi.org/10.29235/1814-6023-2020-17-1-78-86>

Alexander S. Voytehovich¹, Elena V. Vasina¹, Viktoryia S. Kastsiunina¹, Ihar N. Seviaryn², Natalya V. Petyovka¹

¹Republican Scientific and Practical Center of Transfusiology and Medical Biotechnology, Minsk, Republic of Belarus

²N. N. Alexandrov National Cancer Centre, ag. Lesnoy, Minsk region, Republic of Belarus

INFLUENCE OF THE ENDOTHELIAL CELLS ON THE ERYTHROID DIFFERENTIATION OF UMBILICAL CORD BLOOD HEMATOPOIETIC STEM CELLS *IN VITRO*

Abstract. The objective is to study the effect of umbilical cord blood endothelial cells on the hematopoietic cells growth and the maturation in the erythroid direction in co-culture, as well as the expression of adult and fetal hemoglobin genes during erythroid differentiation under the conditions of vascular niche modeling *in vitro*. We used the following research methods: cultural, flow cytometry, real-time PCR and morphological analysis.

We have developed the method of hematopoietic cord blood stem cells erythroid differentiation in co-culture using cord blood endothelial cell progenitors. CD34⁺CD31⁺CD144⁺CD105⁺CD90⁺CD45⁻ progenitors of endothelial cells stimulate the erythroid differentiation of hematopoietic CD34⁺ cord blood cells and the growth of erythroid progenitors in co-culture from the 4th to 11th day in the presence of the stem cell factor, the erythropoietin and the fibroblast growth factor-2. The *in vitro* modeling of the vascular niche increases the mature CD36⁺CD235a⁺ erythroid cells 2.5 times higher than those in the liquid culture. The microenvironment of endothelial cells does not affect the level and expression ratio of fetal and adult hemoglobin during the erythroid differentiation *in vitro*.

Keywords: erythroid differentiation *in vitro*, cord blood hematopoietic stem cells, cord blood endothelial cells

For citation: Voytehovich A. S., Vasina E. V., Kastsiunina V. S., Seviaryn I. N., Petyovka N. V. Influence of the endothelial cells on the erythroid differentiation of umbilical cord blood hematopoietic stem cells *in vitro*. *Vestsi Natsyyanal'nei akademii navuk Belarusi. Seriya meditsinskikh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Medical series*, 2020, vol. 17, no. 1, pp. 78–86 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1814-6023-2020-17-1-78-86>

Введение. Биотехнологическое производство клеток крови может быть альтернативой классическому донорству благодаря снижению риска переноса донор-ассоциированных инфекций. Ежегодно в мире заготавливается около 108 млн донаций крови. Около 50 % из них приходится на страны с высоким уровнем дохода, где проживает менее 18 % населения земного шара [1]. Старение населения увеличивает риск гемассоциированных патологий. В Дании, стране с высоким уровнем доходов населения, около 76 % крови переливают лицам в возрасте старше 65 лет [1]. Кровезаменители, обладающие газотранспортной функцией, имеют ряд противопоказаний и побочных эффектов, к тому же ими можно заменить не более 30 % объема циркулирующей крови. Получение эритроцитов *in vitro* является перспективным биотехнологическим направлением в трансфузиологии.

В литературных источниках описаны протоколы получения зрелых клеток эритроидного ряда путем дифференцировки гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) из периферической крови, костного мозга [2], пуповинной крови [3], эмбриональных стволовых клеток [4] и плюрипотентных стволовых клеток [5]. Пуповинная кровь рассматривается как наиболее подходящий источник для получения эритроцитов *ex vivo* благодаря доступности и высокому пролиферативному потенциалу ГСК. Одним из подходов к дифференцировке является моделирование *in vitro* условий костномозговой ниши, при котором используется совместное культивирование ГСК с различными вспомогательными клетками – мезенхимальными стромальными клетками (МСК), макрофагами [3, 6], эндотелиальными клетками (ЭК). Показано, что вспомогательные клетки способствуют энуклеации эритроидных предшественников [3, 7]. Сокультивирование с МСК *in vitro* моделирует также остеогенную составляющую костномозговой ниши, в которой *in vivo* происходит созревание эритроцитов. Однако некоторые исследования [8] демонстрируют неспособность МСК индуцировать дифференцировку гемопоэтических клеток в эритроидном направлении.

ЭК вместе с МСК являются неотъемлемой и наиболее многочисленной частью костномозговой ниши. Предполагается, что эндovasкулярная ниша костного мозга отвечает за конечный этап дифференцировки ГСК *in vivo* перед миграцией зрелых клеток в кровеносное русло. Подтверждено, что ЭК могут поддерживать бурст-образующие эритроидные колонии [9] благодаря их способности продуцировать гемопоэтические факторы роста. При этом состав секретируемых цитокинов оптимален для эритропоэза и включает факторы, необходимые для пролиферации и созревания эритрокариобластов (интерлейкин-3, ангиопоэтин-5, ИФР-1-связывающий белок-2, гепарин-связывающий ростовой фактор-8) [10]. После того как в 2000-е годы было обнаружено, что часть предшественников ЭК (ПЭК) может циркулировать в русле пуповинной крови, появилась возможность выделения и получения ЭК костномозговой ниши без аспирации костного мозга [11].

Нерешенной проблемой эритроидной дифференцировки ГСК пуповинной крови *in vitro* остается накопление полученными клетками эритроидного ряда фетального гемоглобина (Hb γ). Доля эритроцитов в крови новорожденного, содержащих Hb γ , составляет от 50 до 85 %. В течение первого года постэмбрионального развития происходит замещение фетального гемоглобина на «взрослый» тип (Hb β). Данный процесс обусловлен снижением продукции γ -цепей гемоглобина с одновременной активацией экспрессии β -цепей, что сопровождается каскадом молекулярно-генетических реакций. На сегодняшний день этот процесс до конца не изучен. При дифференцировке *in vitro* содержание клеток с фетальным гемоглобином в зависимости от источника ГСК было различным: от 6 % в случае периферической крови [7] до 60–80 % в вариантах, где источником служила пуповинная кровь [3, 7, 12, 13]. Фетальный гемоглобин менее стабилен в физиологически широких интервалах pH и температур, к тому же он в большей степени способен превращаться в метгемоглобин, блокируя процессы транспортировки кислорода. Влияние ЭК на процесс созревания эритроцитов *in vitro* и накопление в них фетального или «взрослого» гемоглобина не изучено.

Цель работы – исследование влияния эндотелиальных клеток пуповинной крови на прирост и созревание в эритроидном направлении гемопоэтических клеток при их совместном культивировании, а также экспрессии генов «взрослого» и фетального гемоглобина при эритроидной дифференцировке в условиях моделирования васкулярной ниши *in vitro*.

Материалы и методы исследования. Образцы пуповинной крови были предоставлены ГУ РНПЦ «Мать и дитя» МЗ РБ после письменного информированного согласия рожениц. Мононуклеарную фракцию клеток пуповинной крови получали путем центрифугирования на градиенте плотности фиколла 1,077 (Histopaque®-1077, Sigma-Aldrich, США).

Для получения ПЭК фракции мононуклеаров культивировали в селективной среде MCDB 131 (Sigma Aldrich, США) в присутствии фактора роста эндотелия сосудов (Life Technologies, США), фактора роста фибробластов-2 (R&D Systems, США), эпидермального фактора роста (R&D Systems, США).

ГСК из мононуклеаров пуповинной крови ($n = 20$) выделяли с помощью CD34-положительной иммуномагнитной сепарации, используя набор EasySep™ Human CD34 Positive Selection Kit (StemCell Technologies, США) согласно инструкции производителя. Жизнеспособность клеток определяли методом исключения трипанового синего.

Протокол дифференцировки включал культивирование ГСК в присутствии фактора стволовых клеток (R&D Systems, США), эритропоэтина (Pergotech, Великобритания), интерлейкина-3 (R&D Systems, США) с 1-х по 4-е сутки, сокультивирование с ПЭК пуповинной крови в присутствии фактора стволовых клеток, эритропоэтина с 4-х по 11-е сутки и дальнейшее созревание (11–20-е сутки) клеток эритроидного ряда с эритропоэтином без поддерживающего слоя. В качестве контроля проводили дифференцировку с аналогичными цитокинами без поддерживающего подслоя.

Оценку уровня экспрессии поверхностных маркеров клеток проводили на проточном цитофлуориметре FACScanto II (Becton Dickinson, США). Клетки окрашивали согласно инструкции производителя антителами против CD34, CD105, CD31, CD36, CD90, CD45, CD235a (Beckman Coulter, США) и против внутриклеточного фетального гемоглобина человека, конъюгированными с флуоресцеин-изотиоцианатом (FITC), фикоэритрином (PE) либо фикоэритрином-цианином (PE-Cy 5.5). В качестве контроля аутофлуоресценции использовали неокрашенные клетки, в каждом образце анализировали не менее 10 тыс. клеток.

Уровень экспрессии генов оценивали методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени. Рибонуклеиновую кислоту (РНК) выделяли из образцов тризолом (Ambion, США) согласно инструкции производителя. Комплементарную дезоксирибонуклеиновую кислоту (ДНК) получали методом обратной транскрипции из образцов тотальной РНК. В состав реакционной смеси входили РНК, праймер Oligo(dT18) (Fermentas, США), дезоксирибонуклеотидтрифосфаты (дНТФ, «Синтол», Россия), ингибитор РНКаз Ribolock (Fermentas, США), обратная транскриптаза RevertAid Premium и 5X буфер (Fermentas, США). Амплификацию осуществляли в течение 40 мин при 55 °С. Обратную транскриптазу инактивировали путем нагревания при 85 °С в течение 10 мин. Полученную кДНК амплифицировали по следующей программе: при 95 °С – 10 мин (активация полимеразы) с дальнейшей амплификацией в течение 40 циклов при 95 °С – 15 с, при 60 °С – 1 мин. Для определения уровня экспрессии генов цепей гемоглобина были сконструированы (приложение PrimerBlast, NCBI, США) и синтезированы («Праймтех», Беларусь) соответствующие пары праймеров (см. таблицу). В качестве референс-гена использовали ген *gapdh* (глицеральдегид 3-фосфат дегидрогеназа). ПЦР в реальном времени осуществляли с помощью прибора Real-Time PCR Detection System (BioRad, США), для проведения анализа использовали пакет программного обеспечения производителя прибора и приложение Bio-Rad CFX Manager.

Последовательности праймеров для определения уровня экспрессии генов цепей гемоглобина человека

Primers sequences to determine the human hemoglobin gene expression level

Наименование гена	Обозначение	Последовательность праймеров	Размер продукта, п. н.
α-Цепь гемоглобина	<i>hba_f</i>	CAAGTTCCTGGCTTCTGTGAG	157
	<i>hba_r</i>	CTGCCACTCAGACTTTATTC	
β-Цепь гемоглобина	<i>hbb_f</i>	ACTAAGCTCGCTTCTTGCTG	109
	<i>hbb_r</i>	CAGAATCCAGATGCTCAAGGC	
γ-Цепь гемоглобина	<i>hbg_f</i>	GGGTCATTCACAGAGGAGG	106
	<i>hbg_r</i>	GTAGACAACCAGGAGCCTTC	

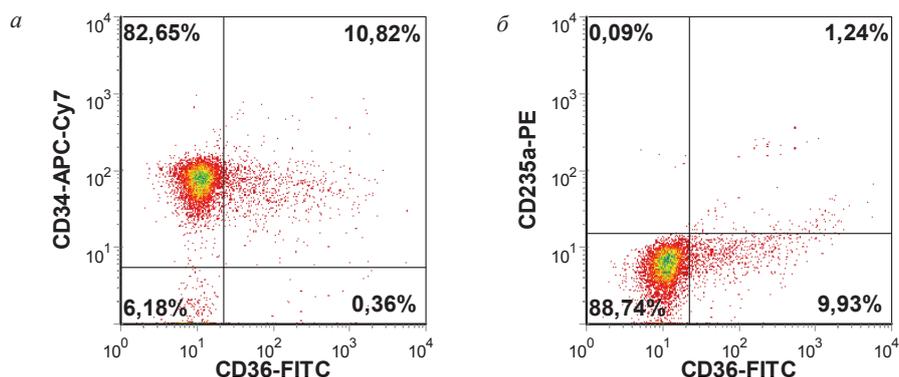


Рис. 1. Точечная диаграмма экспрессии поверхностных кластеров дифференцировки CD34, CD36 (а) и CD235a, CD36 (б) клетками пуповинной крови после положительной по CD34 иммуномагнитной сепарации

Fig. 1. Flow cytometry data analysis of cord blood cells after positive CD34 immunomagnetic separation: а – CD34/CD36 expression, б – CD235a/CD36 expression

Для анализа морфологии и фотографирования клеточных культур использовали инвертированный микроскоп Leica DMIL, снабженный цифровой камерой Leica DFC450 и программным обеспечением.

Окраску клеток производили азур-эозином по методу Романовского–Гимза.

Полученные данные статистически обрабатывали с помощью программного обеспечения GraphPad Prism 5.

Результаты и их обсуждение. Объем единицы пуповинной крови в среднем составлял 70 ± 30 мл. Количество мононуклеарных клеток, выделенных из образца пуповинной крови, составило в среднем $(210 \pm 180) \cdot 10^6$, после иммуномагнитной сепарации получали $(1,6 \pm 1,4) \cdot 10^6$ CD34⁺ клеток, жизнеспособность которых была близка к 100 %. Большинство клеток (более 80 %) несли характерный для незрелых клеток поверхностный маркер CD34 (рис. 1, а) и слабо экспрессирующийся панлейкоцитарный маркер CD45. Из них не более 10 % экспрессировали общий ранний маркер миелоидной дифференцировки CD36 (рис. 1). Около 1 % ранних клеток было коммитировано в эритроидном направлении. Эта популяция одновременно экспрессировала специфичный для эритроидных клеток антиген гликофорин А (CD235a) и CD36 (рис. 1, б).

Более 95 % полученных ПЭК в культуре показали характерную [6] экспрессию поверхностных кластеров дифференцировки CD34⁺CD31⁺CD144⁺CD105⁺CD90⁻CD45⁻. Для обеспечения возможности сокультивирования гемопоэтических клеток пуповинной крови с ПЭК были протестированы культуральные среды MCDB 131 (Sigma, США), StemSpan (Stemcell, США) и их комбинации с различным сочетанием дифференцировочных факторов, сыворотки и плазмы крови человека, рекомбинантных факторов, поддерживающих эндотелиальный подслой (данные не представлены). Оптимальной выбрана специализированная для культивирования кроветворных клеток среда StemSpan, в которую были добавлены фактор роста фибробластов-2 и 5 % плазмы крови человека группы АВ. Монослой ПЭК поддерживал конfluence, близкую к 100 % на протяжении 10 сут и более, при этом культура не приобретала признаков стареющей (рис. 2). В данных условиях не происходило адгезии дифференцируемых клеток к поддерживающему подслою, что позволяло адекватно контролировать количество и характеристики клеток эритроидного ряда.

В ходе дифференцировки ГСК экспрессия CD34 и CD45 падала до стадии эритробластных клеток, а экспрессия CD36 и CD235a увеличивалась. Эритроидные предшественники промежуточной стадии созревания (нормобласты) экспрессировали на поверхности одновременно CD36 и CD235a. По мере дальнейшего созревания экспрессия CD36 снижалась. Экспрессия CD235a при отсутствии экспрессии CD36 была характерна для поздних стадий дифференцировки ядерных предшественников и безъядерных эритроцитов [14]. Динамика экспрессии CD34, CD36, CD45 и CD235a в ходе эритроидной дифференцировки *in vitro* представлена на рис. 3.

На 7-е сутки дифференцировки подавляющее большинство клеток уже было коммитировано в эритроидном направлении, что подтверждается экспрессией ими CD235a. При этом в присутствии ПЭК доля клеток, экспрессирующих CD235a, составила более 90 % (рис. 3), тогда как в контроле (без вспомогательных клеток) экспрессия не превышала 80 % (данные не представлены). Клетки имели характерные для эритробластов иммунофенотип $CD34^-CD45^-CD36^+CD235a^+$ и морфологию (рис. 4). Морфологически дифференцировка эритроидных предшественников сопровождалась уменьшением ядерно-цитоплазматического отношения (ЯЦО). В ходе эксперимента ЯЦО составило $1,1 \pm 0,2$; $0,91 \pm 0,06$ и $0,22 \pm 0,03$ на 7, 11 и 20-е сутки соответственно (рис. 4).

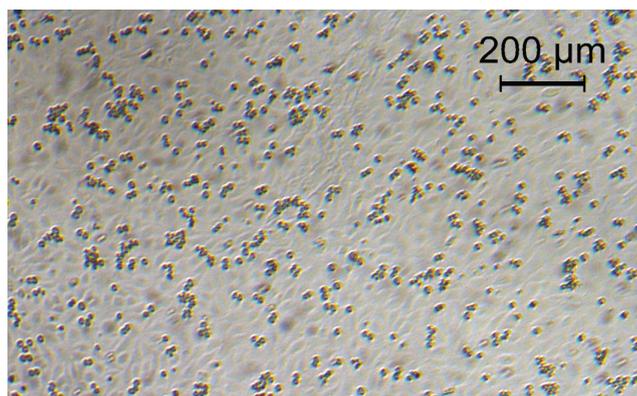


Рис. 2. Вид культивируемых гемопоэтических клеток с предшественниками эндотелиальных клеток пуповинной крови человека на 11-е сутки сокультивирования

Fig. 2. Type of cultured hematopoietic cells with precursors of human umbilical cord blood endothelial cells on the 11th day of co-cultivation

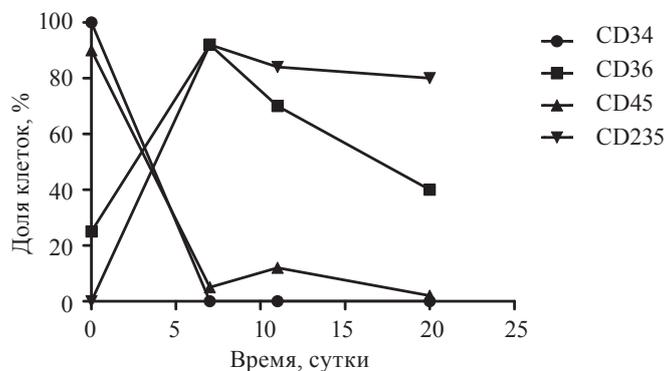


Рис. 3. Динамика экспрессии поверхностных маркеров в ходе эритроидной дифференцировки CD34-положительных клеток пуповинной крови *in vitro* в условиях сокультивирования с предшественниками эндотелиальных клеток

Fig. 3. CD expression dynamics on the cord blood cells in co-cultivation with the progenitors of endothelial cells during erythroid differentiation *in vitro*

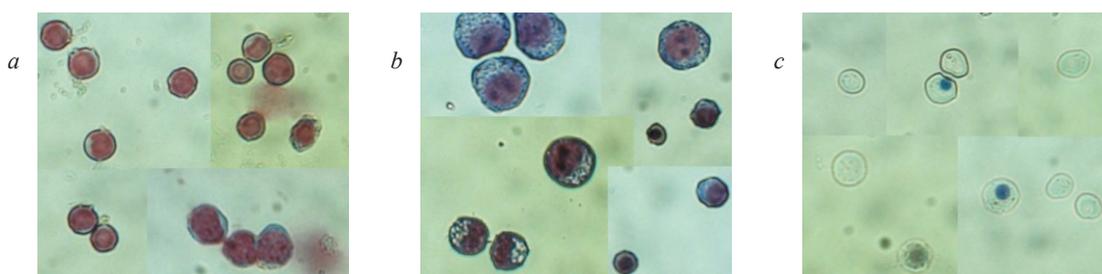


Рис. 4. Морфология клеток пуповинной крови на 7-е (a), 11-е (b) и 20-е (c) сутки эритроидной дифференцировки

Fig. 4. Cord blood cells morphology on the 7th day (a), on the 11th day (b) and on the 20th day (c) of erythroid differentiation

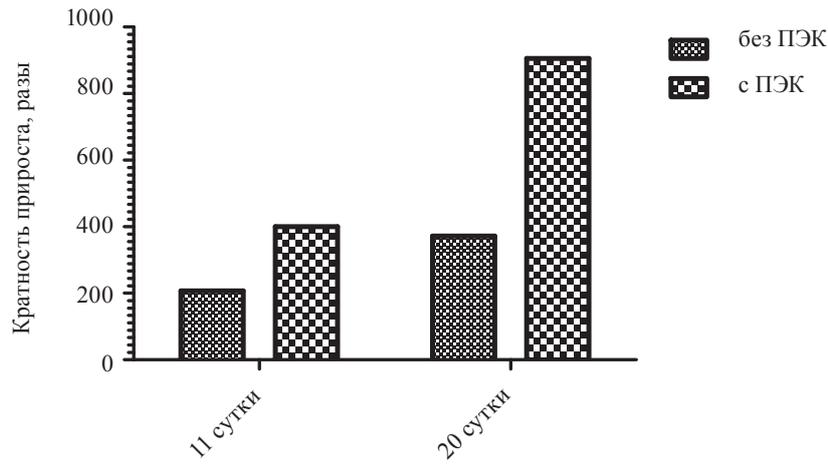


Рис. 5. Динамика прироста CD36-CD235a⁺ клеток в расчете на исходную CD34⁺ клетку в ходе эритроидной дифференцировки в условиях сокультивирования с ПЭК в сравнении с суспензионной культурой без поддерживающего слоя

Fig. 5. Amplification of CD36-CD235a⁺ cells per initial CD34⁺ cell on the 11th day and on the 20th day of erythroid differentiation in co-culture with endothelial cells in comparison with suspension culture

К 11-м суткам доля зрелых CD36-CD235a⁺ клеток в варианте сокультивирования превысила 40 %, в то время как в контроле – не более 30 %. С 11-х по 20-е сутки клетки дозревали без поддерживающего слоя. Доля зрелых клеток с фенотипом CD36-CD235a⁺ на день окончания эксперимента в варианте сокультивирования увеличивалась до 70–75 %, в контроле не превышала 45 %.

Максимальный прирост зрелых CD36-CD235a⁺ в расчете на исходную CD34⁺ клетку показал 1000-кратное увеличение. Использование вспомогательного подслоя позволило почти в 2,5 раза увеличить количество зрелых клеток по сравнению с контролем (рис. 5). Положительное влияние ЭК пуповинной крови может быть связано с выделением в среду факторов либо частиц (тельца Вайбеля–Паладе), стимулирующих ангиогенез [15]. Так как при сокультивировании не

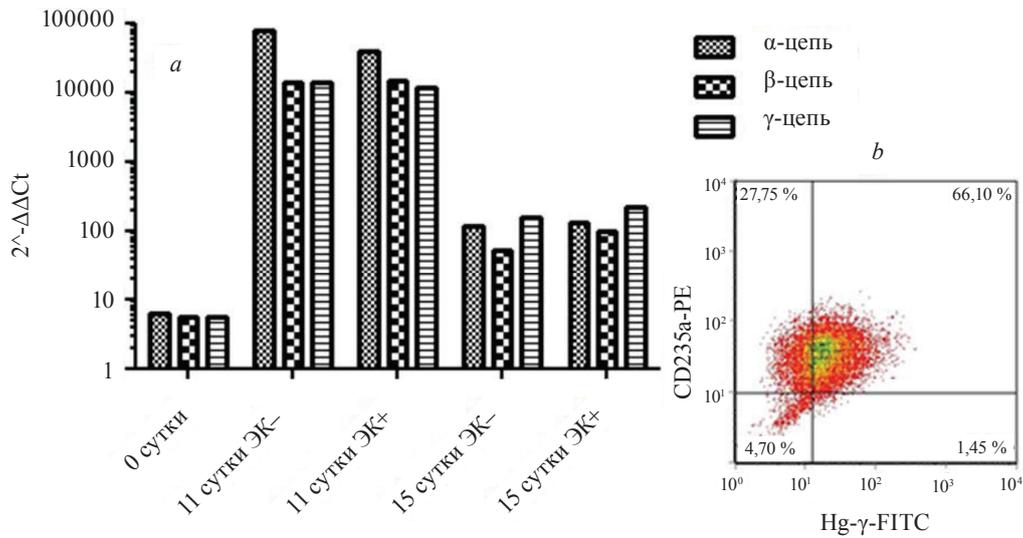


Рис. 6. Экспрессия мРНК цепей гемоглобина в клетках в ходе эритроидной дифференцировки (a) и экспрессия фетального гемоглобина CD235a⁺ клетками на 11-е сутки дифференцировки (b). Данные нормализованы по экспрессии гена *gapdh*

Fig. 6. Expression mRNA of the hemoglonin chains during erythroid differentiation (a) and the flow cytometry analysis of fetal hemoglobin in CD235a⁺ cells on the 11th day of differentiation (b). The data were normalized to the *gapdh* expression

происходит адгезии гемопоэтических клеток к подслою ПЭК, межклеточные контакты эритроидных предшественников с эндотелиальными, скорее всего, не задействованы и не являются необходимыми.

Анализ экспрессии генов гемоглобина показал, что мРНК цепей гемоглобина обнаруживается в CD34⁺ клетках сразу после сепарации, что, вероятно, связано с присутствием некоторого количества (около 1 %) коммитированных в эритроидном направлении клеток (см. рис. 1). По мере созревания эритроидных предшественников и увеличения их доли уровень экспрессии всех цепей гемоглобина возрастает на несколько порядков (рис. 6, а). В терминальной стадии при созревании клеток и накоплении в них необходимого количества гемоглобина экспрессия мРНК его цепей падает (рис. 6, а). Соотношение количества мРНК β и γ-цепей как без подложки, так и при поддержке ПЭК было соизмеримо (выше в $0,8 \pm 0,3$ раза) и статистически значимо не различалось на всех этапах дифференцировки (рис. 6, а). Определение методом проточной цитометрии содержания внутриклеточного фетального гемоглобина подтверждает результаты ПЦР-анализа (рис. 6, б).

Таким образом, доля клеток, экспрессирующих фетальный гемоглобин, не меняется на всех этапах дифференцировки и соответствует таковой в исходной популяции сепарированных CD34⁺ клеток. Сокультивирование с ПЭК не способствовало преимущественному накоплению «взрослого» или фетального гемоглобина.

Закключение. Полученные методом адгезии мононуклеаров пуповинной крови человека в селективной среде предшественники эндотелиальных клеток стимулируют эритроидную дифференцировку гемопоэтических CD34⁺ клеток пуповинной крови и прирост клеток эритроидного ряда при совместном культивировании с 4-х по 11-е сутки в присутствии фактора стволовых клеток, эритропоэтина и фактора роста фибробластов-2. Микроокружение эндотелиальных клеток не влияет на уровень и соотношение экспрессии фетального и «взрослого» типов гемоглобина в ходе дифференцировки *in vitro*. Разработан метод эритроидной дифференцировки CD34⁺ клеток пуповинной крови при поддержке предшественников эндотелиальных клеток пуповинной крови человека, позволяющий в 2,5 раза увеличить прирост CD36⁻CD235a⁺ клеток эритроидного ряда.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Благодарности. Исследование выполнено при поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований, проект Б16М-090.

Acknowledgements. The study was supported by the Belarusian Republican Foundation for Basic Research, project B16M-090.

Список использованных источников

1. Доклад о состоянии здравоохранения в Европе, 2015. Целевые ориентиры и более широкая перспектива – новые рубежи в работе с фактическими данными [Электронный ресурс]. – Режим доступа : http://www.euro.who.int/__data/assets/pdf_file/0006/293739/European-health-report-2015-full-book-ru.pdf. – Дата доступа : 26.12.2019.
2. *In vitro* mass production of human erythroid cells from the blood of normal donors and of thalassemic patients / G. Migliaccio [et al.] // Blood Cells, Mol. Dis. – 2002. – Vol. 28, N 2. – P. 169–180. <https://doi.org/10.1006/bcmd.2002.0502>
3. *In vitro* clinical-grade generation of red blood cells from human umbilical cord blood CD34⁺ cells / E. J. Baek [et al.] // Transfusion. – 2008. – Vol. 48, N 10. – P. 2235–2245. <https://doi.org/10.1111/j.1537-2995.2008.01828.x>
4. Generation of functional erythrocytes from human embryonic stem cell-derived definitive hematopoiesis / F. Ma [et al.] // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2008. – Vol. 105, N 35. – P. 13087–13092. <https://doi.org/10.1073/pnas.0802220105>
5. Red blood cell generation from human induced pluripotent stem cells: perspectives for transfusion medicine / H. Lapillonne [et al.] // Haematologica. – 2010. – Vol. 95, N 10. – P. 1651–1659. <https://doi.org/10.3324/haematol.2010.023556>
6. *Ex vivo* large-scale generation of human red blood cells from cord blood CD34⁺ cells by co-culturing with macrophages / A. Fujimi [et al.] // Hematology. – 2008. – Vol. 87. – P. 339–350. <https://doi.org/10.1007/s12185-008-0062-y>
7. *Ex vivo* generation of fully mature human red blood cells from hematopoietic stem cells / M.-C. Giarratana [et al.] // Nat. Biotechnol. – 2005. – Vol. 23, N 1. – P. 69–74. <https://doi.org/10.1038/nbt1047>
8. Inhibitory effect of mesenchymal stem cell co-culture on erythroid differentiation of K562 cells compared to the control group / M. Saleh [et al.] // Cell J. – 2017. – Vol. 19, N 1. – P. 127–136. <https://doi.org/10.22074/cellj.2016.4133>

9. Human bone marrow-derived mesenchymal stem cells in the treatment of gliomas / A. Nakamizo [et al.] // *Cancer Res.* – 2005. – Vol. 65, N 8. – P. 3307–3318. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-1874>
10. An evolving new paradigm: endothelial cells – conditional innate immune cells / J. Mai [et al.] // *J. Hematol. Oncol.* – 2013. – Vol. 6, N 1. – P. 61. <https://doi.org/10.1186/1756-8722-6-61>
11. Improving the characterization of endothelial progenitor cell subsets by an optimized FACS protocol / K. Huizer [et al.] // *PLoS ONE.* – 2017. – Vol. 12, N 9. – P. e0184895. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0184895>
12. Erythropoietic potential of CD34+ hematopoietic stem cells from human cord blood and G-CSF-mobilized peripheral blood / H. Jin [et al.] // *BioMed Res. Int.* – 2014. – Vol. 2014. – P. 1–9. <https://doi.org/10.1155/2014/435215>
13. Proof of principle for transfusion of *in vitro*-generated red blood cells / M.-C. Giarratana [et al.] // *Blood.* – 2011. – Vol. 118, N 19. – P. 5071–5079. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-06-362038>
14. Immunophenotypic profile of nucleated erythroid progenitors during maturation in regenerating bone marrow / M. Fajtova [et al.] // *Leukemia & Lymphoma.* – 2013. – Vol. 54, N 11. – P. 2523–2530. <https://doi.org/10.3109/10428194.2013.781167>
15. Weibel-palade bodies as a marker for neovascularization induced by tumor and rheumatoid angiogenesis factors / P. Kumar [et al.] // *Cancer Res.* – 1985. – Vol. 45, N 9. – P. 4339–4348.

References

1. The European health report 2015. Targets and beyond – reaching new frontiers in evidence. Highlights. Available at: http://www.euro.who.int/__data/assets/pdf_file/0008/284750/EHR_High_EN_WEB.pdf?ua=1 (accessed 26.12.2019).
2. Migliaccio G., di Pietro R., di Giacomo V., di Baldassarre A., Migliaccio A. R., Maccioni L., Galanello R., Papayanopoulou T. *In vitro* mass production of human erythroid cells from the blood of normal donors and of thalassemic patients. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, 2002, vol. 28, no. 2, pp. 169–180. <https://doi.org/10.1006/bcmd.2002.0502>
3. Baek E. J., Kim H.-S., Kim S., Jin H., Choi T.-Y., Kim H. O. *In vitro* clinical-grade generation of red blood cells from human umbilical cord blood CD34+ cells. *Transfusion*, 2008, vol. 48, no. 10, pp. 2235–2245. <https://doi.org/10.1111/j.1537-2995.2008.01828.x>
4. Ma F., Ebihara Y., Umeda K., Sakai H., Hanada S., Zhang H. [et al.]. Generation of functional erythrocytes from human embryonic stem cell-derived definitive hematopoiesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2008, vol. 105, no. 35, pp. 13087–13092. <https://doi.org/10.1073/pnas.080220105>
5. Lapillonne H., Kobari L., Mazurier C., Tropel P., Giarratana M.-C., Zanella-Cleon I. [et al.]. Red blood cell generation from human induced pluripotent stem cells: perspectives for transfusion medicine. *Haematologica*, 2010, vol. 95, no. 10, pp. 1651–1659. <https://doi.org/10.3324/haematol.2010.023556>
6. Fujimi A., Matsunaga T., Kobune M., Kawano Y., Nagaya T., Tanaka I. [et al.]. *Ex vivo* large-scale generation of human red blood cells from cord blood CD34+ cells by co-culturing with macrophages. *Hematology*, 2008, vol. 87, no. 4, pp. 339–350. <https://doi.org/10.1007/s12185-008-0062-y>
7. Giarratana M.-C., Kobari L., Lapillonne H., Chalmers D., Kiger L., Cynober T., Marden M. C., Wajcman H., Douay L. *Ex vivo* generation of fully mature human red blood cells from hematopoietic stem cells. *Nature Biotechnology*, 2005, vol. 23, no. 1, pp. 69–74. <https://doi.org/10.1038/nbt1047>
8. Saleh M., Shamsasanjan K., Movassaghpour A. A., Akbarzadehlaleh P., Molaeipour Z. Inhibitory effect of mesenchymal stem cell co-culture on erythroid differentiation of K562 cells compared to the control group. *Cell Journal*, 2017, vol. 19, no. 1, pp. 127–136. <https://doi.org/10.22074/cellj.2016.4133>
9. Nakamizo A., Marini F., Amano T., Khan A., Studeny M., Gumin J. [et al.]. Human bone marrow-derived mesenchymal stem cells in the treatment of gliomas. *Cancer Research*, 2005, vol. 65, no. 8, pp. 3307–3318. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-1874>
10. Mai J., Virtue A., Shen J., Wang H., Yang X.-F. An evolving new paradigm: endothelial cells – conditional innate immune cells. *Journal of Hematology and Oncology*, 2013, vol. 6, no. 1, p. 61. <https://doi.org/10.1186/1756-8722-6-61>
11. Huizer K., Mustafa D. A. M., Spelt J. C., Kros J. M., Sacchetti A. Improving the characterization of endothelial progenitor cell subsets by an optimized FACS protocol. *PLoS ONE*, 2017, vol. 12, no. 9, p. e0184895. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0184895>
12. Jin H., Kim H.-S., Kim S., Kim H. O. Erythropoietic potential of CD34+ hematopoietic stem cells from human cord blood and G-CSF-mobilized peripheral blood. *BioMed Research International*, 2014, vol. 2014, pp. 1–9. <https://doi.org/10.1155/2014/435215>
13. Giarratana M.-C., Rouard H., Dumont A., Kiger L., Safeukui I., le Pennec P.-Y. [et al.]. Proof of principle for transfusion of *in vitro*-generated red blood cells. *Blood*, 2011, vol. 118, no. 19, pp. 5071–5079. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-06-362038>
14. Fajtova M., Kovarikova A., Svec P., Kankuri E., Sedlak J. Immunophenotypic profile of nucleated erythroid progenitors during maturation in regenerating bone marrow. *Leukemia & Lymphoma*, 2013, vol. 54, no. 11, pp. 2523–2530. <https://doi.org/10.3109/10428194.2013.781167>
15. Kumar P., Erroi A., Sattar A., Kumar S. Weibel-palade bodies as a marker for neovascularization induced by tumor and rheumatoid angiogenesis factors. *Cancer Research*, 1985, vol. 45, no. 9, pp. 4339–4348.

Информация об авторах

Войтехович Александр Сергеевич – аспирант. Республиканский научно-практический центр трансфузиологии и медицинских биотехнологий (Долгиновский тракт, 160, 220053, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: voytehovichas@gmail.com

Васина Елена Викторовна – науч. сотрудник. Республиканский научно-практический центр трансфузиологии и медицинских биотехнологий (Долгиновский тракт, 160, 220053, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: vasina.bio@gmail.com

Костюнина Виктория Сергеевна – науч. сотрудник. Республиканский научно-практический центр трансфузиологии и медицинских биотехнологий (Долгиновский тракт, 160, 220053, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: vkostynina@gmail.com

Северин Игорь Николаевич – биолог. Республиканский научно-практический центр онкологии и медицинской радиологии им. Н. Н. Александрова (223040, аг. Лесной, Минский р-н, Республика Беларусь). E-mail: ihar.in@gmail.com

Петевка Наталья Васильевна – канд. хим. наук, заведующий лабораторией. Республиканский научно-практический центр трансфузиологии и медицинских биотехнологий (Долгиновский тракт, 160, 220053, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: npet@blood.by

Information about the authors

Alexander S. Voytehovich – Postgraduate student. National Research Center of Transfusiology and Medical Biotechnology (160, Dolginovsky tract, 220053, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: voytehovichas@gmail.com

Elena V. Vasina – Researcher. National Research Center of Transfusiology and Medical Biotechnology (160, Dolginovsky tract, 220053, Minsk, Republic of Belarus) E-mail: vasina.bio@gmail.com

Viktoryia S. Kastsiunina – Researcher. National Research Center of Transfusiology and Medical Biotechnology (160, Dolginovsky tract, 220053, Minsk, Republic of Belarus) E-mail: vkostynina@gmail.com

Ihar N. Seviaryn – Biologist. *N. N. Alexandrov National Cancer Centre* (ag. Lesnoy, 223040, Minsk region, Republic of Belarus). E-mail: ihar.in@gmail.com

Natalya V. Petyovka – Ph. D. (Chem.), Head of the Laboratory. National Research Center of Transfusiology and Medical Biotechnology (160, Dolginovsky tract, 220053, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: npet@blood.by