

СТЕПЕН ОКСИГЕНАЦИЈЕ КАО ЧИНИЛАЦ ОДРЖАВАЊА ПОПУЛАЦИЈЕ ПРИМИТИВНИХ МАТИЧНИХ ЋЕЛИЈА

Зоран ИВАНОВИЋ

Француска установа за крв за регионе Аквитаније и Лимузена, Бордо, Француска (*Etablissement Français du Sang Aquitaine-Limousin, Bordeaux, France*) и Институт за медицинска истраживања, Београд

КРАТАК САДРЖАЈ

У овом тексту описан је развој једног научноистраживачког пројекта у временском периоду од скоро једне деценије и наведени су његови кључни резултати. Они указују на оксигенацију као на један од механизма физиолошке регулације матичне ћелије хематопоезе јер: 1) врло мале концентрације кисеоника (~0,1%) омогућавају очување резервоара ћелија у G0 фази; 2) мале концентрације кисеоника (~1%) дозвољавају пролиферацију примитивних матичних ћелија, али инхибишу њихово диферентовање, тј. доводе до самообнове; 3) умерено мале концентрације кисеоника (~3%) уравнивају диферентовање и самообнову дозвољавајући истовремено стварање (експанзију) прогенитора уз потпуно очување активности примитивног матичног одељка; 4) нефизиолошки велике концентрације кисеоника, као што су оне у амбијенталном ваздуху (20-21%), стимулишу диферентовање примитивних матичних ћелија и стварање прогенитора на штету самообнове ових првих. Ове амбијенталне концентрације кисеоника се обично користе за култивисање ћелија *in vitro*, упркос чињеници да не постоје у ткивима живог организма. Наведени резултати представљају потпуно нов поглед на регулационе механизме хематопоезе и као такви цитирани су у врхунској научној литератури и прихваћени као релевантни за развој ткивног и ћелијског инжењеринга. У том смислу, у току смо усавршавања постојећих процедура експанзије *ex vivo* матичних ћелија хематопоезе адаптацијом оксигенације, као и испитивања могућности сличног приступа за побољшање производње еритроцита *ex vivo*. Такође су у току истраживања чији је циљ побољшање конзервације матичних ћелија у течной фази на ниским температурама (али изнад тачке мржњења) смањењем концентрације кисеоника и повећањем концентрације угљен-диоксида.

Кључне речи: матичне ћелије; прогенитори; кисеоник; хипоксија; експанзија *ex vivo*, ћелијски инжењеринг

УВОД

Мој досадашњи допринос биомедицини се састоји од резултата више пројеката који се групишу у две велике целине: биологија матичних ћелија и трансфузијска технологија. Ипак, одлучио сам да се члановима Академије медицинских наука Српског лекарског друштва представим кроз само један пројекат. Овај пројекат, започет у Београду као споредни резултат моје докторске тезе, а настављен у Фиренци (*Firenze*) и Лиможу (*Limoges*), свој пуни развој је доживео у Бордоу (*Bordeaux*), где актуелно чини основну оригиналност истраживања и развоја установе која се бави трансфузијом и ћелијском терапијом у два француска региона – Аквитанији (*Aquitaine*) и Лимузену (*Limousin*).

СТЕПЕН ОКСИГЕНАЦИЈЕ И МАТИЧНЕ ЋЕЛИЈЕ

Крајем осамдесетих, почетком и половином деведесетих година 20. века наша група за експерименталну хематологију Института за медицинска истраживања у Београду интензивно је изучавала матичне ћелије хематопоезе и прогениторе код Београдског анемичног пацова („б/б пацов“) [1-6]. Приступ плурипотентним прогениторима (*Colony Forming Units – Spleen – CFU-S*) је омогућен тек пошто смо развили есеј заснован на ксеногенној трансплантацији хематопоеетских ћелија пацова мишу [7, 8]. Користећи ову технику, успели смо да дефинишемо промене *CFU-S* код б/б пацова у костној сржи, слезини и крви, те да докажемо да изражени унутарћелиј-

ски недостатак гвожђа изазива реверзибилни застој у пролиферацији плурипотентних прогенитора у костној сржи [9-12]. Синтеза ових резултата с резултатима добијеним из експеримената у којима су б/б пацови трансплантирани ћелијама нормалних пацова у алогеном контексту показала је да, када се пролиферациони застој *CFU-S* изазван унутарћелијским недостатком гвожђа отклони, медуларна експанзија ових ћелија бива ограничена степеном оксигенације [13]. Ови резултати су показали да би степен оксигенације могао бити фактор регулације примитивног матичног одељка хематопоезе, а не само еритропоезе, као што се сматрало до тада. У литератури су постојали одређени подаци који су указивали на то да умерено мала концентрација кисеоника (5-7%) побољшава амплификацију прогенитора у течним културама и у културама са стромом, као и њихову активност формирања колонија у полуврстим културама [14-21], али знатно мање концентрације кисеоника (које су процењене да владају у костној сржи анемичног б/б пацова) нису биле испитиване.

ПРОЛИФЕРАЦИОНИ КАПАЦИТЕТ ПРИМИТИВНИХ МАТИЧНИХ ЋЕЛИЈА ЈЕ ДОБРО ОЧУВАН ПРИ МАЛОЈ КОНЦЕНТРАЦИЈИ КИСЕОНИКА

Истовремено с нашим експериментима на б/б пацову, Персио Дело Сбарба (*Persio Dello Sbarba*) са сарадницима [22] потврђује *in vitro* своју хипотезу изведену из ранијих експеримената с реверзибилном инхибицијом ћелијског дисања [23] да су примитивне матичне ћелије одговорне за репопулацију кост-

не сржи *in vivo* (*Marrow Repopulating Ability – MRA*) релативно резистентније од плурипотентних прогенитора (*CFU-S*), а ове опет од опредељених прогенитора (*Colony Forming Cells – CFC*) у условима веома смањене концентрације кисеоника (1%). Популација *CFC* је, у ствари, веома редукована у овим условима, док је популација *MRA* сачувана. Из тих резултата они постављају хипотезу да су примитивне матичне ћелије смештене у хипоксичним микросрединским нишама у костној сржи и да их хипоксија одржава у стању мировања, тј. изван активног ћелијског циклуса, у фази *G0*.

ПОЧЕТАК НОВОГ ПРОЈЕКТА

Иако услови *in vivo* нису једноставно упоредиви с условима *in vitro*, наши резултати су – мада у основи у складу с оним што је објавила фјорентинска група аутора – указивали на нешто сложенију ситуацију у регулацији матичних ћелија степеном оксигенације [11]. Уследила је размена мишљења у директном контакту са др Делом Сбарбом, која је довела до конструкције једног заједничког пројекта на дуги рок, усмереног на изучавање феномена резистентности примитивних матичних ћелија у условима веома слабе оксигенације. Тај пројекат је био основа за наше пријаве за једногодишњу постдокторску стипендију код Европског удружења за истраживање рака (*European Association of Cancer Research*) и материјалне трошкове тог пројекта код Италијанског удружења за истраживање рака (*Associazione Italiana per la Ricerca sul Cancro*). Обе пријаве су уродиле плодом и ја сам почео с експерименталним радом у мају 1997. године на Институту за општу патологију и у Лабораторији за хематологију Универзитетске болнице Карређи (*Carregi*) у Фиренци.

АРГУМЕНТИ У ПРИЛОГ ХИПОТЕЗИ ДА СЕ ПРИ МАЛОЈ КОНЦЕНТРАЦИЈИ КИСЕОНИКА ОДВИЈА САМООБНОВА МАТИЧНИХ ЋЕЛИЈА

Најпре смо развили систем *in vitro* који је омогућио откривање опредељених (*CFU-GM*) и плурипотентних прогенитора (три категорије *HPP-CFC* које одговарају *CFU-S* различитог степена примитивности) из мишје костне сржи у једним истим културама [24]. Затим смо доказали да на 1% кисеоника уз *IL-3* и *GM-CSF* можемо постићи очување *MRA*, али да истоветну активност примитивних матичних ћелија можемо доказати ако културе из режима мале концентрације кисеоника пребацимо у инкубатор с атмосферском концентрацијом кисеоника (20%) на основу репопулације исте културе опредељеним прогениторима [25]. Овај систем је касније усавршен у Лиможу увођењем секундарних култура које су стандардизоване тако да омогућавају оптималну ревелацију примитивних матичних ћелија на основу њихове способности да се диферентују до прогенитора и тако прогениторима репопулишу секундарну културу [26]. Ове примитивне матичне ћелије, аналогне *MRA*, генерички су назване „*pre-CFC*”, а њихово очу-

вање на 1% кисеоника је било у извесној мери компатибилно са пролиферацијом, јер је око 70% ових ћелија осетљиво на деловање 5-флуороурацила (*5FU*), за који се зна да убија ћелије које су у активној фази циклуса [25]. Уколико је стимулација цитокинима потпунија (*CSF, IL-6, G-CSF* и *IL-3*) и концентрација од 1% кисеоника одржавана у току осам дана културе константном, онда је могуће постићи истовремено умерену експанзију *CFC* уз потпуно очување *MRA* активности и индивидуалног пролиферационог капацитета *HPP-CFC*. У оваквим условима све *pre-CFC* су осетљиве на *5FU*, што значи да су у активној фази ћелијског циклуса [26]. Ови резултати су јасно указивали на то да је очување примитивности матичних ћелија при малој концентрацији кисеоника компатибилно с њиховом пролиферацијом и да механизам њиховог одржавања свакако није везан за блок у *G0* фази, како се раније претпостављало. Да бисмо директно потврдили овај закључак, испитивали смо *pre-CFC* активност мишјих ћелија костне сржи инкубираних на 1% или 20% кисеоника, физички раздвајајући ћелије (*cell sorter*) у односу на број деоба остварених у течной култури [26]. Фракције ћелија које се нису поделиле, које су оствариле једну деобу и које су оствариле више од једне деобе су одређене на основу бојења мембрана ћелија флуоресцентном бојом *PKH2* пре њиховог постављања у примарне културе. Интензитет ове боје се смањује са бројем деоба ћелија. Резултати су показали да је највећи део активности *pre-CFC* уочен у фракцији ћелија које се поделиле једном у течной култури, при чему је овај капацитет више од 100 пута већи после инкубације (осам дана) на 1% него на 20% кисеоника. Ћелије инкубиране на 20% кисеоника губе потпуно потенцијал *pre-CFC* ако су се поделиле више од једном, док на 1% кисеоника одговарајућа фракција ћелија задржава једну трећину максималног *pre-CFC* капацитета испољеног после једне деобе [26]. Ови резултати директно доказују да мала концентрација кисеоника фаворизује ћелијске деобе без (или са мало) диферентовања, што је реални феномен најближи елементарном теоретском својству матичности – самообнови.

НАСТАВАК ИСТРАЖИВАЊА И РАЗВОЈНИ АСПЕКТИ

Како је већ речено, овај пројекат је настављен у септембру 1998. године у Лиможу, а од 2000. године у Бордоу, захваљујући најпре другој постдокторској стипендији (*Association pour la Recherche sur le Cancer – ARC*) и касније моме избору на националном конкурс за професора хематологије (*Professeur associé en hématologie*) и добијању сукцесивних уговора на универзитетима у Лиможу (1999/2000) и Бордоу (2000/2002), за све то време у лабораторијама којима је руководио проф. Венсан Пралоран (*Vincent Praloran*). Синтеза целокупног овог рада је чинила језгро за израду моје Хабилитације за руковођење истраживањима (*Habilitation à Diriger des Recherches – HDR*), коју сам одбранио у Бордоу у септембру 2001. године. *HDR* је највиши научни степен у францу-

ском универзитетском систему, чија се припрема и одбрана дозвољава само кандидатима који су остварили значајан допринос одређеној научној проблематици и доказали своју улогу „лидера” у процесу научноистраживачког рада. Мемоар за HDR подразумева и предлог једног пројекта који треба да се заснива на претходним резултатима кандидата, али и да пружи јасну научну перспективу, атрактивност, као и реалну вероватноћу да ће бити субвенциониран. Осим већ наведених резултата, у описаном периоду је на хуманим CD34+ ћелијама мобилисаним у периферну крв потврђен феномен бољег очувања *pre-CFC* при 1% кисеоника, претходно установљен на мишијим ћелијама, и доказано да је он везан за пролиферациону фракцију ових ћелија [27]. Такође смо дошли до сазнања да су CD34+ ћелије хроничне мијелоидне леукемије релативно осетљивије на малу концентрацију кисеоника (1%) него нормалне ћелије, јер је њихова експанзија релативно више смањена, а њихова пролиферација више инхибирана. Мала концентрација кисеоника (1%) инхибише значајно хиперфосфорилацију типичну за ћелије хроничне мијелоидне леукемије (*bcr/abl* позитивне). Ова инхибиција је упоредива с ефектом дозе од 5 $\mu\text{g/ml}$ STI додатог у културе при 20% кисеоника [28]. Иако веома занимљиве, резултате истраживања ћелија хроничне мијелоидне леукемије смо оставили по страни због ограничене бројности наше тадашње екипе и чињенице да је малигна хематопоеза чинила научни субјект једне друге екипе на истом универзитету. Ограничавајући се, дакле, само на нормалне ћелије, одлучили смо да нашем пројекту дамо развојни карактер и да почнемо рад на примени ових сазнања на побољшању експанзије *ex vivo* CD34+ ћелија плацентне крви и матичних ћелија из других извора. Истовремено смо предложили настављање истраживања фундаменталних аспеката прилагођавања примитивних матичних ћелија на малу оксигенацију (улога цитокина, пре свега *VEGF*), као и боље изучавање ћелијског циклуса и одређених молекулских аспеката у истим условима, како на мишијим, тако и на хуманим ћелијама.

Сви предложени аспекти су изучени и дали су углавном позитивне резултате које наводим у најкраћем облику:

- Дефинисана је концентрација кисеоника (3%) која не омета амплификацију *CFC* а омогућава боље очување *pre-CFC* и врло примитивних матичних ћелија у току експанзије CD34+ ћелија плацентне крви у условима примењивим за клиничке есеје, али у минијатуризованим културама [29]. Ове примитивне матичне ћелије се доказују на основу своје способности да дају клонове хуманих хематопоетских ћелија у костној сржи имунодефицијентних *NOD/SCID* мишева од неколико недеља до неколико месеци после трансплантације. Овај рад је такође нагласио позитивну улогу *IL-3* у односу на побољшање експанзије и матичних ћелија и прогенитора у културама без серума и при малој концентрацији кисеоника [30].
- Доказана је улога *VEGF* у очувању матичних ћелија у хипоксији (1% кисеоника), као и да је за њену реализацију неопходна кооперација два типа рецептора за *VEGF*: *Flt-1* и *KDR* [31]. Ови резултати су добијени

коришћењем наше технике двостепених култура за доказивање *pre-CFC* [26], али са пречишћеним ћелијама које не експримирају линијске антигене (*Lin-*) и само једним „носећим” цитокином у примарној култури без серума – *IL-3*. Иначе, у истим условима *VEGF* нема мерљив ефекат на *pre-CFC* на 20% кисеоника.

- На моделу CD34+ ћелија плацентне крви показано је да при изразито малој концентрацији кисеоника (0,1%) долази до инхибиције активације ћелија које су у *G0* фази циклуса; истовремено, ћелије затечене у активном ћелијском циклусу (*G1*, *S*, *G2*, *M*) настављају да пролиферишу док не дођу до критичне тачке, а затим се враћају у *G0* [32]. Феномен повратка матичне ћелије у *G0* фазу досад није описан. Овде је важно истаћи да се овим резултатима потврђује оригинална хипотеза Дело Сбарбе [23], али за мању концентрацију кисеоника него што су они сматрали.
- Концентрација кисеоника регулише експресију гена за CD34 и процесирање одговарајуће иРНК. Пошто присуство дугог облика молекула CD34 одликује релативно примитивније категорије ових ћелија, а кратки облик молекула CD34 се јавља у току диференцијације, изучавани су транскрипти за ова два облика молекула CD34 употребом *RT-PCR* технике. Показано је да су на 1% кисеоника транскрипти за дуги облик молекула CD34 очувани много дуже него на 20%, што је сразмерно више изражено за *CD34low* популацију. Пошто ове *CD34low* ћелије преинкубирани при 1% кисеоника дају много више CD34+ ћелија у секундарним стандардним културама него ако су преинкубирани на 20% кисеоника, то потврђује везу између примитивности ћелија одржаване хипоксијом и превасходног присуства транскрипта за дуги облик молекула CD34 у културама на 1% кисеоника [33].
- Доказано је да мала концентрација кисеоника (1%) појачава позитиван ефекат *IL-6* на *pre-CFC*, као и да његово деловање захвата пре свега ћелије у активној пролиферацији, тј. да он стимулише самообнову матичних ћелија при малој концентрацији кисеоника [34].

НАШ ПРОЈЕКАТ КАО ОСНОВА ЗА ОБУКУ ДОКТОРАНАТА

Део наведених резултата, осим што су саопштени на бројним научним скуповима и објављени у часописима веома доброг угледа (већи део цитиран у овом тексту), представљају и рад наших доктораната. У Фиренци је из овог пројекта урађена и одбрањена стручна теза доктора медицине [35], а у Бордоу теза доктора наука (*Doctorat d'Université*) [36], док су две друге тезе у припреми. Такође је једна докторска теза пред одбраном на Универзитету у Београду.

УТИЦАЈ НАШИХ РЕЗУЛТАТА НА РАЗВОЈ БИОЛОГИЈЕ МАТИЧНИХ ЋЕЛИЈА И ЋЕЛИЈСКОГ ИНЖЕЊЕРИНГА

Сви досад наведени резултати указују на оксигенацију као на један од механизма физиолошке регулације матичне ћелије хематопоезе: 1) врло мале

концентрације кисеоника (0,1%) омогућавају очување резервоара хелија у *G0* фази; 2) мале концентрације кисеоника (око 1%) дозвољавају пролиферацију ових хелија, али инхибишу њихово диферентовање, тј. доводе до самообнове; 3) умерено мале концентрације кисеоника (око 3%) уравнотежују диферентовање и самообнову матичних хелија дозвољавајући стварање (експанзију) прогенитора уз потпуно очување активности примитивног матичног одељка; 4) нефизиолошки велике концентрације кисеоника (20%) не омогућавају ефикасну самообнову примитивних матичних хелија и стимулишу њихово диферентовање и стварање прогенитора. Они представљају потпуно нов поглед на механизме регулације хематопоезе.

Наше основне резултате је недавно потврдила једна америчка група аутора, која је показала да инкубација *CD34+* хелија хумане костне сржи при малој концентрацији кисеоника (1,5%) омогућава истовремено умерену амплификацију како прогенитора, тако и примитивних матичних хелија (*SRC*) [37]. Они су регуларно цитирани у водећој светској литератури [38-40], а неки од наших радова и у највећим часописима, као што су *Journal of Clinical Investigation* [37], *Science* [41] и *Nature Medicine* [42]. Процењено је да се микросрединске нише у којима су у физиолошким условима смештене матичне хелије у костној сржи одликују изразито малим концентрацијама кисеоника које варирају од аноксије до 3% [43]. Наши радови се цитирају као потпора концепта да је мала концентрација кисеоника једна од елементарних фактора регулације микросрединске нише матичне хелије [44], а наше откриће да је при малој концентрацији кисеоника стимулисана самообнова матичних хелија се сврстава у ред оних за која се сматра да највише обећавају у развоју ткивног и хелијског инжењеринга у скорој будућности [41, 45, 46]. Наши објављени резултати су такође узети у обзир приликом моделирања одговора матичног одељка костне сржи у току хеморагијског шока [47].

Излазећи из оквира парадигматских матичних хелија хематопоезе, сада се, на почетку 21. века, у литератури појављују радови који указују на то да мала концентрација кисеоника регулише преживљавање, пролиферациони капацитет, диферентовање, па чак и фундаменталне механизме хелијског старења код матичних хелија других ткива, нарочито оних изведених из мезенхима [48-53]. У ову серију радова свакако треба сврстати и оне који указују на регулациону улогу мале концентрације кисеоника у пролиферацији и диферентовању матичних хелија нервног ткива [53], реналних папиларних матичних хелија [54] итд. Неопходност мале концентрације кисеоника за самообнову матичних хелија ембриона је већ позитивно утврђена чињеница [55].

На основу свих ових радова произлази да је за одржавање примитивности матичних хелија, како ембрионалних, тако и соматских, потребна средина са малом концентрацијом кисеоника. Како је још давно запазио Ернст Хекел (*Ernst Haeckel*), онтогенеза једног организма представља, на извештан начин, рекапитулацију целокупне еволуције врсте (филогенезе). С једне стране, ово Хекелово учење доведе-

но је до апсурда, банализовано и злоупотребљавано од стране расистичких режима. С друге стране, оно је „дискредитовано” екстремним позитивистичким критеријумима јер је увек мерено димензијом инфинитезималне савршености, непримерене биологији. Али његово основно запажање има непромењену вредност. Ако ово запажање екстраполирамо на матичне хелије, могли бисмо претпоставити да су оне, будући најпримитивније хелије у организму, у ствари рефлекс најпримитивнијег стадијума еволуције. А тај примитивни стадијум еволуције аеробног живота почео је на Земљи у изразито хипоксичним и хиперкапничним условима [56, 57].

САДАШЊЕ АКТИВНОСТИ И ПЕРСПЕКТИВЕ

Наш садашњи рад у овој области се грана на више макропројеката. Септембра 2002. године постављен сам за научног директора Француске установе за крв за регионе Аквитаније и Лимузена (*Etablissement Français du Sang Aquitaine-Limousin – EFS-AL*). Та установа се бави активностима трансфузије, хелијске терапије и конзервацијом хелија, органа и ткива намењених за трансплантацију. Поред осталих одговорности, руководим истраживањем и развојем ове установе, активностима које се одвијају кроз четири аспекта: 1) креативни приступ рутини, 2) клинички есеји, 3) претклиничка истраживања, и 4) базична истраживања. Да би се покренуо четврти и употпунио трећи аспект, основао сам Лабораторију за истраживање и развој у области хелијског инжењеринга, којом непосредно руководим. Наш истраживачки интерес је сада подељен на фундаменталне аспекте у оквиру пројеката којима руководи проф. Венсан Пралоран на Универзитету Бордо 2 и основне и развојне аспекте који су предмет пројеката којима лично руководим на *EFS-AL*. Пројекти везани за испитивање оксигенације у хелијском инжењерингу се дефинирају у три макропројекта: 1) *Ex vivo* експанзија матичних хелија уз одржавање активности примитивних хелија (актуелно завршавање претклиничког и дефинисање клиничког аспекта); 2) *Ex vivo* производња зрелих хелија из матичних хелија (актуелно на нивоу базичних истраживања); 3) Допринос хипоксије и хиперкапније конзервацији хелија у течном медијуму на ниским температурама изнад тачке мржњења (актуелно на нивоу базичних истраживања). Рад на првом и другом макропројекту су субвенционисани за период 2005-2008. године од стране Научног савета Француске установе за крв (*Conseil Scientifique de l'Etablissement Français du Sang*) а за један од пројеката из другог макропројекта (*Ex vivo* производња еритроцита уз адаптацију оксигенације) добијена је једна постдокторска стипендија у трајању од две године за М. Влашки с Института за медицинска истраживања у Београду. Трећи макропројекат је инициран радом на тези „Мастер” под мојим руководством [58] и биће настављен чим се обезбеди његово финансирање. Такође је успостављена континуирана сарадња на пројекту базичних истраживања деловања *IL-6* на матичне хелије при малој кон-

центрацији кисеоника између Лабораторије за хематологију Института за медицинска истраживања, групе професора Пралорана и наше лабораторије за ћелијски инжењеринг EFS.

Свестан да изнесене чињенице представљају веома специјализовану и специфичну материју која није лако разумљива за већину лекара па и клиничких хематолога, могу да препоручим заинтересованом читаоцу да основне поставке нашег рада прочита крајње једноставно написане пером новинара у чланку објављеном после предавања које сам одржао у јулу 2002. године на Институту Генетон (*Généton*) у Еврију (*Evry*): <http://www.caducee.net/breves/breve.asp?idp=6&idb=4060&cal=1>

ЗАХВАЛНИЦА

Описани пројекат је реализован у сарадњи с колегама и сарадницима из Београда [Павле Миленковић, Милица Ковачевић, Маја Петаков, Милка Докић], Фиренце [Персио Дело Сбарба (*Persio Dello Sbarba*), Марија Грација Циполески (*Maria-Grazia Cipolleschi*), Бенедета Бартолоци (*Benedetta Bartolozzi*), Елизабета Ровида (*Elisabetta Rovida*), Пјетро Антонио Бернабеи (*Pietro Antonio Bernabei*)], Лиможа [Венсан Пралоран (*Vincent Praloran*), Жан-Лик Фоше (*Jean-Luc Faucher*), Франк Триморо (*Franck Trimoreau*), Ванеса Деспла (*Vanessa Desplat*)] и Бордоа [Венсан Пралоран (*Vincent Praloran*), Филип Бруне де ла Гранж (*Philippe Brunet de la Grange*), Франсис Ермит (*Francis Hermitte*), Франсис Белок (*Francis Belloc*), Франсис Лакомб (*Francis Lacombe*), Паскал Дише (*Pascale Duchez*)]. Рад на овом пројекту (*projet No 2004.11*) су субвенционисали: Италијанско удружење за истраживање рака (*Associazione Italiana per la Ricerca sul Cancro*), Европско удружење за истраживање рака (*European Association for Cancer Research*), Француско друштво за истраживање рака (*Association Française pour la Recherche sur le Cancer*), неколико сукцесивних пројеката Француске националне лиге за борбу против рака (*Ligue Nationale Française contre le Cancer*), Друштво за истраживање леукемије Лимузена (*Association pour la Recherche sur la Leucémie du Limousin*), Министарство за науку Републике Србије, Национално министарство за едукацију француске републике (*Ministère de l'Éducation Nationale de la République Française*) и Научни савет француске установе за крв (*Conseil Scientifique de l'Établissement Français du Sang*).

ЛИТЕРАТУРА

- Pavlović-Kentera V, Basara N, Biljanović-Paunović L, et al. Erythroid progenitors in anemic Belgrade Laboratory (b/b) rats. *Exp Hematol* 1989; 17:812-5.
- Stojanović N, Jovčić G, Basara N et al. Granulopoiesis in anemic Belgrade laboratory (b/b) rats. *Exp Hematol* 1990; 18:379-83.
- Rolović Z, Basara N, Stojanovic N, et al. Abnormal megakaryocytopoiesis in the Belgrade laboratory rat. *Blood* 1991; 77:456-65.
- Biljanović-Paunović L, Stojanović N, Mostarica-Stojković M, et al. Hematopoietic growth factors in anemia of Belgrade Laboratory (b/b) rats. *Exp Hematol* 1992; 20:1257-62.
- Ivanović Z, Milenković P, Stojanovic N, Lukić ML, Kataranovski M. A stimulator of proliferation of spleen colony-forming cells (CFU-S) in the bone marrow of irradiated rats. *Acta Vet* 1993; 43:95-104.
- Ivanović Z, Milenković P, Stosić-Grujičić S. Constitutive production of regulators of stem cell proliferation in the hereditarily anemic Belgrade laboratory (b/b) rat. *Comp Haematol Int* 1995; 5:170-6.
- Ivanović Z, Milenković P. The number and proliferation activity of rat bone marrow spleen colony forming-cells as determined in a "rat to mouse" assay. *Acta Vet* 1995; 45:261-8.
- Ivanović Z, Petakov M, Jovčić G, Biljanović-Paunović L, Balint B, Milenković P. Pluripotent and committed haemopoietic progenitor cells in rat peripheral blood. *Comp Haematol Int* 1997; 7:1-6.
- Ivanović Z, Milenković P, Vasiljevski M, Dekić M. Hemopoietic stem cells in the hereditarily anemic Belgrade Laboratory (b/b) rat. *Exp Hematol* 1995; 23:1218-23.
- Ivanović Z, Milenković P. The seeding efficiency of normal and hereditarily anemic (b/b) rat bone marrow Colony Forming Units – Spleen as determined in a "rat to mouse" assay. *Stem Cells* 1995; 13:666-70.
- Ivanović Z, Milenković P. The Belgrade laboratory (b/b) rat and the role of hypoxia in the maintenance of hematopoietic stem cells. *Exp Hematol* 1996; 24:1179-80.
- Ivanović Z, Milenković P. Pluripotent haematopoietic progenitor cells (CFU-Sd8) in peripheral blood of hereditarily anaemic Belgrade (b/b) rats. *Lab Anim* 1999; 33:77-82.
- Ivanović Z. Hemopoietic stem cell proliferation in Belgrade rats: to complete the parable. *Hematol Cell Ther* 1997; 39:307-16.
- Schooley JC, Kullgren B, Flether BL. Growth of murine bone marrow adherent stromal cells in culture without hydrocortisone in a low oxygen environment. *Int J Cell Clon* 1985; 3:2-9.
- Smith S, Broxmezyer HE. The influence of oxygen tension on the long-term growth in vitro of haematopoietic progenitor cells from human cord blood. *Br J Haematol* 1986; 63:29-34.
- Maeda H, Hotta T, Yamada H. Enhanced colony formation of human hemopoietic stem cells in reduced oxygen tension. *Exp Hematol* 1986; 14:930-4.
- Katahira J, Mizoguchi H. Improvement of culture conditions for human megakaryocytic and pluripotent progenitor cells by low oxygen concentration. *Int J Cell Cloning* 1987; 5:412-20.
- Ishikawa Y, Ito T. Kinetics of hemopoietic stem cells in a hypoxic culture. *Eur J Haematol* 1988; 40:126-9.
- Koller MR, Bender JG, Miller YM, Papoutsakis ET. Reduced oxygen tension increases hematopoiesis in long-term culture of human stem and progenitor cells from cord blood and bone marrow. *Exp Hematol* 1992; 20:264-70.
- Koller MR, Bender JG, Miller YM, Papoutsakis ET. Effects of synergistic cytokine combinations, low oxygen and irradiated stroma on the expansion of human cord blood progenitors. *Blood* 1992; 80:403-11.
- Koller MR, Bender JG, Papoutsakis ET, Miller YM. Beneficial effects of reduced oxygen tension and profusion in long-term hematopoietic cultures. *Ann NY Acad Sci* 1992; 665:105-16.
- Cipolleschi MG, Dello Sbarba P, Olivotto M. The role of hypoxia in the maintenance of hematopoietic stem cells. *Blood* 1993; 82:2031-7.
- Dello Sbarba P, Cipolleschi MG, Olivotto M. Hemopoietic progenitor cells are sensitive to the cytostatic effect of pyruvate. *Exp Hematol* 1987; 15:137-42.
- Ivanović Z, Bartolozzi B, Bernabei PA et al. A simple, one-step clonal assay allows the sequential detection of committed (CFU-GM-like) progenitors and several subsets of primitive (HPP-CFC) murine progenitors. *Stem Cells* 1999; 17:219-25.
- Cipolleschi MG, Rovida E, Ivanović Z, Olivotto M, Praloran V, Dello Sbarba P. The maintenance of hematopoietic progenitors in severely hypoxic cultures, an in vitro indicator of marrow-repopulating ability. *Leukemia* 2000; 14:735-9.
- Ivanović Z, Belloc F, Faucher J-L, Cipolleschi M-G, Praloran V, Dello Sbarba P. Hypoxia maintains and IL3 reduces the pre-CFC potential of dividing CD34+ murine bone marrow cells. *Exp Hematol* 2002; 30:67-73.
- Ivanović Z, Dello Sbarba P, Trimoreau F, Faucher JL, Praloran V. Human blood pre-CFU-GM are better maintained and expanded in vitro at 1% than 20% oxygen. *Transfusion* 2000; 40:1482-8.
- Desplat V, Faucher JL, Mahon FX, Dello Sbarba P, Praloran V, Ivanović Z. Hypoxia modifies proliferation and differentiation of CD34+ CML cells. *Stem Cells* 2002; 20:346-53.

29. Ivanović Z, Hermitte F, Brunet de la Grange P, Dazey B, Belloc F, Lacombe F, Vezon G, Praloran V. Simultaneous maintenance of human cord blood SCID-repopulating cells and expansion of committed progenitors at low O₂ concentration (3%). *Stem Cells* 2004; 22:716-24.
30. Ivanović Z. Interleukin-3 (IL-3) and ex vivo maintenance of hematopoietic stem cells: facts and controversies. *Eur Cytok Netw* 2004; 15:6-13.
31. Brunet de la Grange P, Conrad V, Hermitte V, Ivanović Z, Praloran V. Regulation of hematopoietic stem cell functions in hypoxia. Involvement of VEGF and its receptors. 45th annual meeting of the American Society of Hematology, San Diego 2003. *Blood* 102, Abstract 3059, 326a.
32. Hermitte F, Brunet de la Grange P, Belloc F, Praloran V, Ivanović Z. Very low O₂ concentration (0.1%) favors G0 return of dividing CD34+ cells. *Stem Cells* 2006; 24:65-73.
33. Brunet de la Grange P, Barthe C, Lippert E, et al. Oxygen concentration influences mRNA processing and expression of the CD34 gene. *J Cell Biochem* 2006; 97:135-44.
34. Petakov M, Kovačević M, Hermitte F, et al. Uticaj citokina i hipoksije na matične ćelije hematopoeze ex vivo. *Hematološki dani Srbije i Crne Gore, Niš* 2004. *Bullet Hematol* 2004; 32(1/2):34. Abstract PP76.
35. Bartolozzi B. Effetto del ipossia sul mantenimento e sull'espansione in vitro di progenitori emopoietici. Tesi di Laurea in Medicina e Chirurgia. Firenze: Università degli Studi di Firenze; 1997.
36. Brunet de la Grange P : Régulation de l'Hématopoïèse par les basses concentrations d'oxygène : Rôles de l'antigène CD34 et du facteur de croissance VEGF165. Doctorat de l'Université Bordeaux 2. Bordeaux 2004.
37. Danet G, Pan Z, Luongo JL, et al. Expansion of human SCID-repopulating cells under hypoxic conditions. *J Clin Invest* 2003; 80:403-11.
38. Ramirez-Bergeron DL, Simon MC. Hypoxia-inducible factor and the development of stem cells of the cardiovascular system. *Stem Cells* 2001; 19:279-86.
39. Annabi B, Lee YT, Turcotte S. Hypoxia promotes murine bone-marrow-derived stromal cell migration and tube formation. *Stem Cells* 2003; 21:337-47.
40. Davie NJ, Crossno J, Frid M, et al. Hypoxia-induced pulmonary artery adventitial remodeling and neovascularization: contribution of progenitor cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2004; 286:L668-78.
41. Griffith LG, Naughton G. Tissue engineering – current challenges and expanding opportunities. *Science* 2002; 1009-16.
42. Whetton AD. Stem cells bank on ATM machine. *Nature Med* 2004; 10:1166-7.
43. Chow DC, Wenning LA, Miller WM, Papoutsakis ET. Modeling pO₂ distribution in the bone marrow hematopoietic compartment. II. Modified Kroghian models. *Biophys J* 2001; 81:685-96.
44. Khademhosseini A, Zandstra PW. Engineering the in vitro cellular microenvironment for the control and manipulation of adult stem cell responses. In: Turksen K, editor. *Adult Stem Cells*. Ottawa: Humana Press; 2004. p.289-314.
45. Bock A-K, Ibarreta D, Rodriguez-Cerezo E. Human tissue-engineered products – today's markets and future prospects: European commission joint research centre report EUR 21000 EN. 2003.
46. Mantalaris A, Panoskaltis N, David Wu JH. Tissue Engineering of bone marrow. In: Wnek GE, Bowlin GL, editors. *Encyclopedia of Biomaterials and Biomedical Engineering*. Marcel Dekker; 2004. p.1508-17.
47. Antoniu ES, Sund S, Homsy EN, Challenger LF, Rameshwar P. A theoretical simulation of hematopoietic stem cells during oxygen fluctuations: prediction of bone marrow response during hemorrhagic shock. *Shock* 2004; 22:415-22.
48. Lennon DP, Edmison JM, Caplan AI. Cultivation of rat marrow-derived mesenchymal stem cells in reduced oxygen-tension: effects on in vitro and in vivo osteochondrogenesis. *J Cell Physiol* 2001; 187:345-9.
49. Csete M, Walikonis J, Slawni N et al. Oxygen-mediated regulation of skeletal muscle satellite cell proliferation and adipogenesis culture. *J Cell Physiol* 2001; 189:189-94.
50. Fink T, Abildtrup L, Gogd K et al. Induction of adipocyte-like phenotype in human mesenchymal stem cells by hypoxia. *Stem Cells* 2004; 22:1346-55.
51. Moussavi-Harami F, Duwayri Y, Martin JA, Moussavi-Harami F, Buckwalter JA. Oxygen effects on senescence in chondrocytes and mesenchymal stem cells: consequences for tissue engineering. *Iowa Orthop* 2004; 41:323-33.
52. Scherer K, Schunke M, Sellckau R, Hassenpflug J, Kurz B. The influence of oxygen and hydrostatic pressure on articular chondrocytes and adherent bone marrow cells in vitro. *Biorheology* 2004; 41:323-33.
53. Morrison SJ, Csete M, Growes AK, Melega W, Wold B, Anderson DJA. Culture in reduced levels of oxygen promotes clonogenic sympathoadrenal differentiation by isolated neural crest stem cells. *J Neurosci* 2000; 20:7370-6.
54. Oliver JA, Maarouf O, Cheema FH, Martens TP, Al-Awqati Q. The renal papilla is a niche for adult kidney stem cells. *J Clin Invest* 2004; 114:795-804.
55. Adelman DM, Maltepe E, Simon MC. Multilineage embryonic hematopoiesis requires hypoxic ARNT activity. *Genes dev* 1999; 13:2478-83.
56. Massabuau JC. From low arterial- to low tissue-oxygenation strategy. An evolutionary theory. *Respir Physiol* 2001; 128:249-61.
57. Massabuau JC. Primitive and protective, our cellular oxygenation status? *Mech Ageing Dev* 2003; 124:857-63.
58. Jeanne M. Maintien de progéniteurs hématopoïétiques à 4 degrés Celsius avec adaptation des concentrations d'oxygène et de dioxyde de carbone. Master en physiologie et physiopathologie cellulaire à l'Université de Bordeaux 2, Bordeaux 2004.

OXYGENATION LEVEL AS A FACTOR IN STEM CELL MAINTENANCE

Zoran IVANOVIĆ

French Blood Institute, Aquitaine-Limousin Regional Centre Bordeaux, Institute for Medical Research, Belgrade

ABSTRACT

This article will describe the decade-long genesis of a research project and review its main results. These results point to oxygenation level being a physiological regulator of haematopoietic stem cell maintenance because: (1) very low oxygen concentrations (~0.1%) enable the preservation of the quiescent (G0) stem cell pool; (2) low oxygen concentrations (~1%) are compatible with the proliferation of primitive stem cells but inhibit their differentiation, i.e. enable their self-renewal; (3) moderately low oxygen concentrations (~3%) allow a balance between differentiation and self-renewal, permitting the simultaneous amplification of progenitors and the maintenance of stem cell activity; and (4) very high oxygen concentrations, like those in the air (20-21%), enhance the differentiation of primitive stem cells, abrogating their self-renewal capacity. In spite of the fact that these oxygen concentrations do not exist in tissues *in vivo*, they are usually used for *in vitro* cell growth. These results represent a new insight into the regulatory mechanisms of haematopoiesis. In that light they are cited in top biomedical literature and accepted as being relevant to the development of tissue and cell engineering. In that respect, we are working

on the adaptation of culture oxygenation to improve existent *ex vivo* expansion techniques. We are also trying to improve the techniques of *ex vivo* production of red blood cells in the same manner. Our other ongoing research projects are directed at improving the conservation of stem cells at low temperatures (but above freezing point) within a liquid medium, by decreasing oxygen and increasing CO₂ concentrations.

Key words: stem cells; progenitors; oxygen; hypoxia; expansion *ex vivo*; cell engineering

Zoran IVANOVIĆ
Directeur Scientifique
Etablissement Français du Sang Aquitaine-Limousin,
Bordeaux
5, place Amélie Raba Léon, BP 24.
33035 Bordeaux Cedex
France
Tel.: 33 5 56 90 75 50
Fax: 33 5 56 90 75 51
E-mail: zoran.ivanovic@efs.sante.fr