

Д.Ю. КЛЮЧНИКОВ<sup>1</sup>, М.Ю. ЯЗЫКОВА<sup>1</sup>, О.В. ТЮМИНА<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Самарский государственный университет

<sup>2</sup>Самарский областной центр планирования семьи и репродукции

**ДИФФЕРЕНЦИРОВКА CD34+ КЛЕТОК  
ПУПОВИННОЙ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА В МЕГАКАРИОЦИТЫ  
И ТРОМБОЦИТЫ В УСЛОВИЯХ EX VIVO**

Основные моменты тромбоцитопоэза достаточно хорошо изучены, но при этом все еще остается большое количество вопросов, связанных с механизмами этого процесса. А в силу того, что мегакариоциты представлены в костном мозге в очень малом количестве (<1%), для изучения требуется получение их в культуре. Разработка подходов по получению мегакариоцитарных предшественников, мегакариоцитов и тромбоцитов *ex vivo* вызывает большой интерес и открывает невероятные перспективы для их использования в клинической практике. В настоящей работе представлен протокол по получению мегакариоцитарных предшественников и мегакариоцитов человека из CD34+ клеток пуповинной крови, способных в условиях *ex vivo* образовывать тромбоциты с использованием бессывороточных сред с добавлением тромбопоэтина, фактора стволовых клеток, интерлейкина-6 и -9.

**Ключевые слова:** ГСК, CD34+ клетки, пуповинная кровь, мегакариоциты, тромбоциты, *ex vivo*

**Ключников Дмитрий Юрьевич** - очный аспирант кафедры биохимии, биотехнологии и биоинженерии СамГУ. E-mail: dmklyu@gmail.com

**Языкова Марина Юрьевна** - д.б.н., проф. кафедры биохимии, биотехнологии и биоинженерии СамГУ. E-mail: yazykovasamgu@mail.ru

**Тюмина Ольга Владимировна** - д.м.н., директор ГБУЗ «Самарский областной центр планирования семьи и репродукции». E-mail: centr123@bk.ru

**D.Y. KLYUCHNIKOV<sup>1</sup>, M.Y. YAZYKOVA<sup>1</sup>, O.V. TYUMINA<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Samara State University

<sup>2</sup>Samara Regional Center of Family Planning and Reproduction

**DIFFERENTIATION OF CD34+ CELLS DERIVED FROM HUMAN CORD  
BLOOD TO MEGAKARYOCYTES AND PLATELETS EX VIVO**

Despite of the fact that the basic essentials of thrombocytopoiesis are well known, there are still a lot of unanswered questions regarding to the mechanism of this process. And because of the very low frequency of megakaryocytes in bone marrow (<1%), they often need to be produced in cell culture in order to study the process. The development of the approaches for *ex vivo* production of megakaryocytic progenitors, megakaryocytes and platelets cuts a swath and opens a prospect for their use in clinical practice. This paper examines the protocol of using serum free medium with addition of thrombopoietin, stem cell factor, interleukin-6 and -9 for production of megakaryocytic progenitor and megakaryocytes from CD34+ cells derived from cord blood, which are capable to produce platelets.

**Key words:** HSC, CD34+ cells, cord blood, megakaryocytes, platelets, *ex vivo*

**Dmitry Klyuchnikov** - postgraduate student of the Biochemistry, Biotechnology and Bioengineering Department of Samara State University. E-mail: dmklyu@gmail.com

**Marina Yazykova** - doctor of Biology, Professor of the Biochemistry, Biotechnology and Bioengineering Department of Samara State University. E-mail: yazykovasamgu@mail.ru

**Olga Tyumina** - doctor of Medicine, the director of "Samara Regional Centre of Family Planning and Reproduction". E-mail: centr123@bk.ru

Процесс образования тромбоцитов является очень сложным, в нем принимают участия как гемопоэтические стволовые клетки (ГСК), так и более дифференцированные прогениторные клетки, микроокружение костного мозга и целый ряд цитокинов. И хотя с момента откры-

тия основных принципов тромбопоэза прошло более 100 лет и стали ясны многие важные ключевые моменты - в первую очередь благодаря клонированию и описанию тромбопоэтина (ТПО) в 1994 г. - трудно сказать, что на сегодняшний день этот процесс изучен в полной мере [1]. Но

его дальнейшее изучение может открыть большие перспективы для развития биотехнологических производств для получения тромбоцитов в условиях *ex vivo* для клинического применения.

В настоящее время тромбоциты для клинического применения могут быть получены только от взрослых доноров крови и ее компонентов, и их количество главным образом зависит только от количества доноров. Донорские тромбоциты сегодня используют не только в хирургической, акушерской и гематологической практике, но и для нужд активно развивающихся высокотехнологичных видов медицинской помощи, таких как трансплантация ГСК [2]. Кроме того, они применяются для лечения тромбоцитопений, являющихся результатом злокачественных образований, химиотерапии, иммунных заболеваний, инфекций и врожденных нарушений тромбоцитопоза [3]. Дефицит компонентов крови, в том числе и тромбоцитов, растет и, по мнению специалистов, в ближайшее время Россия столкнется с еще большим дефицитом доноров в силу того, что предполагается увеличение количества высокотехнологических операций в кардиологии, ортопедии и онкологии [2]. Важно отметить, что существует еще и целый ряд ограничений по использованию донорских тромбоцитов, связанных с небольшим сроком использования полученного концентрата тромбоцитов (всего 5 суток) [4], инфекционной безопасностью [5, 6] и тем, что повторные трансфузии могут вызвать образование антител против аллогенных антигенов HLA или HPA на донорских тромбоцитах [7].

В связи с этим на клеточные технологии возлагаются большие надежды в этой области, а использование стволовых клеток для получения компонентов крови может стать переломным моментом в развитии службы крови. Разработка эффективной системы, независимой от доноров, которая могла бы обеспечить растущие нужды службы крови, является целью огромного количества исследований по всему миру. На сегодняшний день уже получены важные результаты по получению эритроцитов и тромбоцитов человека из ГСК из различных источников, ЭСК и ИПСК [8, 9, 10, 11]. Проводятся эксперименты по воссозданию условий ниши внутри проточных био-реакторов для получения тромбоцитов и изучения деталей процесса [12, 13, 14, 15, 16], а также методики по очистке полученных *ex vivo* тромбоцитов [17]. Однако, вопреки всем приложенным усили-

ям к решению поставленной задачи, еще не разработано ни одной достаточно эффективной для клинических целей модели по получению тромбоцитов человека [18, 19]. Несмотря на огромный потенциал подобных технологий, в Российской Федерации аналогичные исследования в этом направлении до настоящего времени не проводились. В представленной работе описывается эксперимент по получению мегакариоцитов и тромбоцитов человека из ГСК, полученных из пуповинной крови в условиях *ex vivo*.

#### **Материалы и методы**

**Пуповинная кровь.** Пуповинная кровь объемом от 47,95 мл до 81,8 мл была собрана после подписания полного информированного согласия роженицами. В исследование были взяты образцы пуповинной крови от женщин, не имеющих семейных случаев тяжелых соматических, онкологических и генетических заболеваний, в т.ч. патологий эритропоэза, лейкопоэза, тромбоцитопоза и иммунодефицитов. Период гестации - 38-40 недель. Все роды были естественными, вес новорожденных - 3000-3570 г, количество баллов по шкале Апгар - 8-10. Пуповинная кровь была собрана пункцией пупочной вены после отсечения пуповины. Кровь была собрана в гемаконы («Грин Кросс», Южная Корея) с ЦФДА-1 в качестве антикоагулянта и доставлена в лабораторию при комнатной температуре (21°C) в течение 12-19 часов.

**Выделение лейкоцитарной фракции и очистка CD34+ клеток.** Выделение и очистка лейкоцитарной фракции осуществлялось с использованием фиколла (Диаколл/Diacoll, Диа-М, Россия), натрий-фосфатного буфера («Биолот», Россия) согласно следующему протоколу. Гемаконы с пуповинной кровью центрифугировались при 428g, 7 мин для разделения на фракции. После этого лейкоцитарный слой нескольких ЕПК (3-4) объединялся для увеличения общего количества клеток, а также для сглаживания интердонорской вариабельности. После этого производилась очистка мононуклеарной фракции на фиколле согласно инструкциям производителя. Анализ клеточных компонентов цельной пуповинной крови и мононуклеарной фракции проводился на гематологических анализаторах MINDRAY BC-2800 (MINDRAY, Китай) и ABX Pentra 60 C+ (HORIBA Medical, Франция). CD34+ клетки были очищены из выделенной чистой лейкоцитарной фракции с помощью позитивной иммуномагнитной селекции с использованием бесколоночной системы EasySep™ Magnet

и набора EasySep™ Human CD34 Positive Selection Kit (STEMCELL Technologies, Канада) согласно протоколу производителя.

**Условия культивирования.** Культивирование проводилось в 24-х луночных планшетах с рабочим объемом 0,8-1 мл при 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Клетки вносились в среду в концентрации 2,77-3,28x10<sup>4</sup> кл/мл. В среду на основе IMDM было добавлено 20% ВІТ 9500 (Gibco, США), 100μМ 5x10<sup>-2</sup> 2-меркаптоэтанола (Helicon, Россия), 1% антибиотика-антимикотика, а также смесь цитокинов ТПО - 30 нг/мл; SCF - 2 нг/мл; ИЛ-6 – 7,5 нг/мл и ИЛ-9 – 13,5 нг/мл (Gibco, США). На 4-ые сутки суспензия клеток была перемешана пипетированием, удалена половина среды и внесен тот же объем свежеприготовленной среды того же состава. На 7 сутки общая концентрация клеток была доведена до 3-3,4x10<sup>5</sup> кл/мл добавлением свежеприготовленной среды.

**Морфологический анализ.** Морфологический анализ проводился регулярно при помощи световой микроскопии с использованием систем Zeiss AxioObserver, на

с использованием пробирок Trucount Tubes (BD, США).

**Подсчет абсолютного количества клеток.** Подсчет количества ядросодержащих клеток на протяжении культивирования и тромбоцитов проводился с помощью гемоцитометра Metallized Hemacytometer Reichert Bright-Line (Hauser Scientific Company, США) на 4, 7, 10 и 14 сутки согласно инструкции производителя.

**Статистическая обработка данных.** Обработка данных и построение графиков проводилось с помощью программного обеспечения SigmaPlot version 11.0, Systat Software, Inc., США.

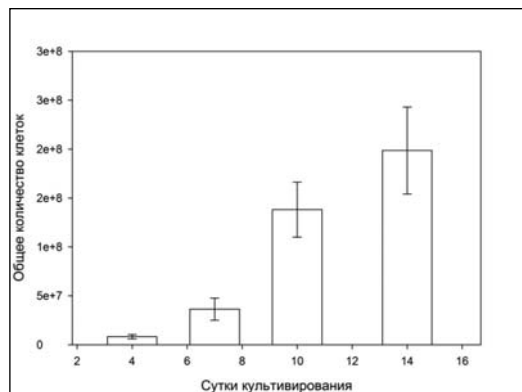
**Результаты**

**Экспансия клеток.** В процессе культивирования отмечена экспансия ядросодержащих клеток с 8,217 ± 2,177 x10<sup>6</sup> на 4 сутки до 198,656±44,51 x10<sup>6</sup> на 14-ые сутки культивирования. Кроме того, увеличилось и количество CD34+ клеток с 0,735±0,052 x10<sup>6</sup> на 0 сутки до 3,026 ± 0,185 x10<sup>6</sup> на 10-ые сутки культивирования. Результаты экспансии клеток представлены в таблице 1 и рисунках 1 и 2.

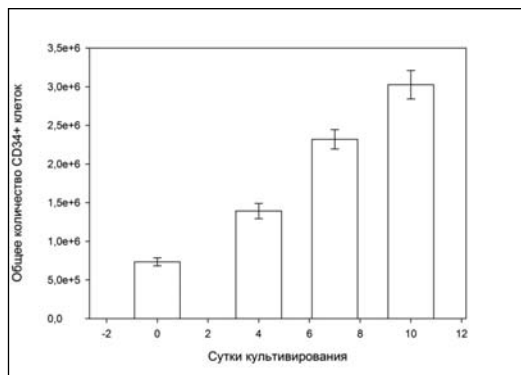
Таблица 1

**Общее количество клеток в процессе культивирования**

Сутки культивирования	4	7	10
Количество CD34+ клеток, x10 <sup>6</sup>	1,393 ± 0,098	2,319 ± 0,125	3,026 ± 0,185
Количество ядросодержащих клеток, x10 <sup>6</sup>	8,217 ± 2,177	36,407 ± 11,321	138,24 ± 28,213



**Рис1. Изменение общего количества ядросодержащих клеток в процессе культивирования**



**Рис 2. Изменение количества CD34+ клеток в процессе культивирования**

ПО AxioVision V 4.6.3.0 и Zeiss AxioStar Plus (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Германия).

**Проточная цитометрия.** Анализ клеточной популяции был проведен с помощью проточной цитометрии на проточном цитометре FACS Canto (BD, США) с использованием антител против CD34, CD41a (BD, США). Абсолютный подсчет количества CD34+ клеток был проведен

**Созревание мегакариоцитов.** Созревание мегакариоцитов оценивалось по экспрессии маркеров CD34 и CD41a на протяжении культивирования. Уже на 7 сутки было отмечено появление популяции клеток, коэкспрессирующих CD34 и CD41a (промегакариоцитов). В процессе культивирования процентное соотношение этой популяции выросло с 1,6±0,9% на 4 сутки до 36,85±0,49% на 7 сутки, за-

тем их количество стало снижаться до  $21,42 \pm 0,286\%$  на 16 сутки культивирования. Созревая, мегакариоцитарные предшественники (промегакариоциты) утрачивали экспрессию CD34 антигена. Результаты динамики роста популяции этих клеток представлены в таблице 2.

Начиная с 6 суток, наблюдалось появление незрелых мегакариоцитов, крупных клеток диаметром более 20 мкм (рис. 3а). Появление зрелых мегакариоцитов и образование большого количества про-

тромбоцитов было хорошо заметно уже на 12 сутки культивирования (рис. 3б).

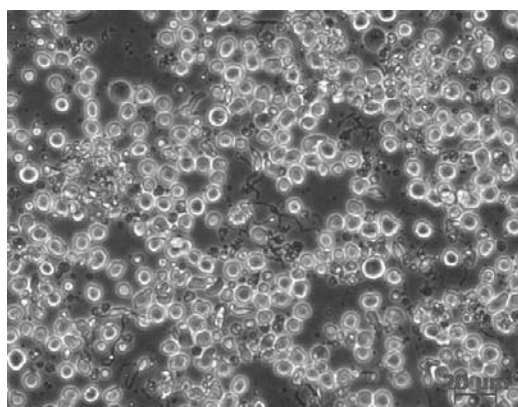
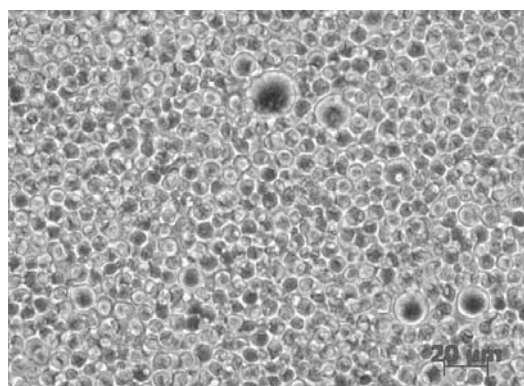
Морфологический анализ полученных тромбоцитов с помощью световой микроскопии показал их идентичность с контрольными тромбоцитами венозной крови (рис. 4).

Микроскопия мазков препаратов, полученных в ходе проведения эксперимента, также показала их морфологическую идентичность тромбоцитам венозной крови взрослого донора (рис. 5).

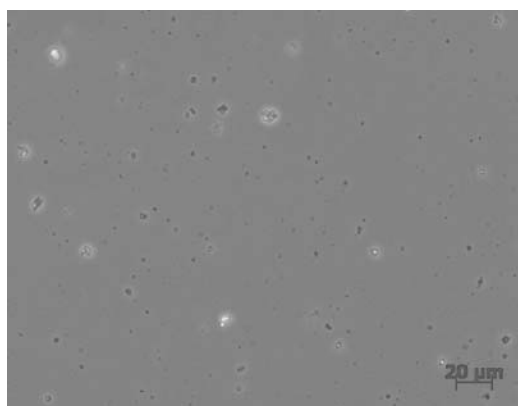
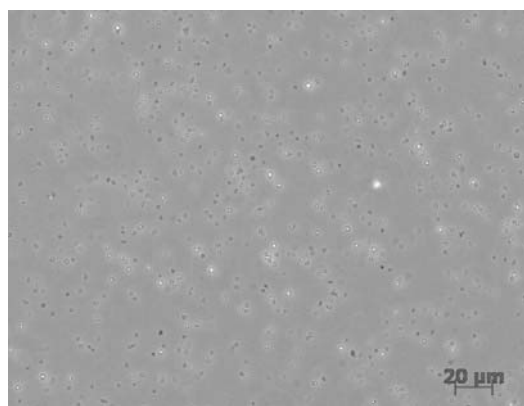
Таблица 2

**Изменение процентного соотношения CD34+/CD41a+ клеток относительно общей популяции в процессе культивирования**

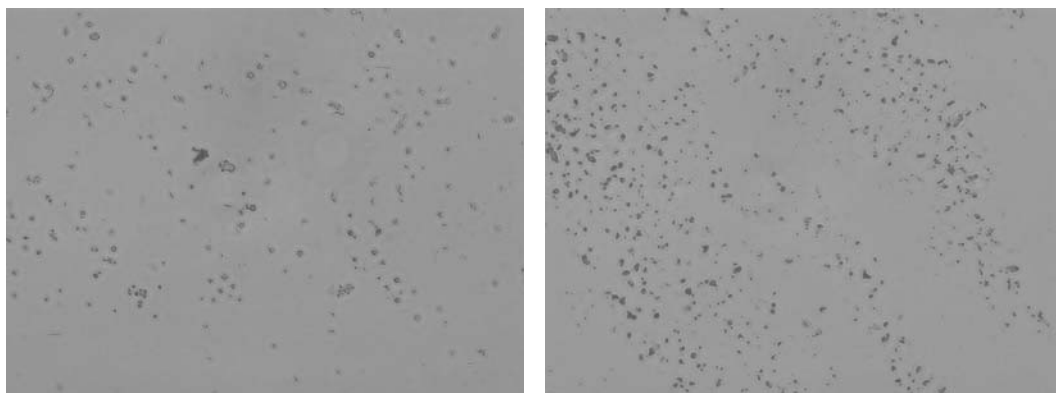
Сутки культивирования	4	7	10	14	16
Процентное соотношение	$1,6 \pm 0,9$	$18,2 \pm 0,14$	$36,85 \pm 0,49$	$36,08 \pm 2,0$	$21,42 \pm 0,3$



**Рис. 3. Фотографии культуры клеток: а) слева – мегакариоцитарные предшественники, крупные клетки, 6 сутки; б) справа – протромбоциты, тяжи цитоплазмы мегакариоцитов, распадающиеся на фрагменты – тромбоциты, 12 сутки**



**Рис. 4. Фотографии нативных препаратов тромбоцитов. Слева – контрольные тромбоциты обогащенной тромбоцитами плазмы, полученной из венозной крови; справа – тромбоциты, полученные *ex vivo*, в суспензии присутствуют также фрагменты протромбоцитов**



**Рис 5. Фотографии мазков препаратов тромбоцитов. Слева – контрольные тромбоциты обогатщенной тромбоцитами плазмы, полученной из венозной крови; справа – тромбоциты, полученные *ex vivo***

### Заключение

Полученные данные свидетельствуют о возможности получения мегакариоцитов и тромбоцитов человека в экспериментах *ex vivo* с использованием бессывороточных сред с описанным цитокиновым коктейлем. Несомненно, что полученные таким образом мегакариоцитарные предшественники, мегакариоциты и тромбоциты требуют дальнейшего функционального анализа, а сама технология - еще больших доработок как в плане увеличения эффективности дифференцировки ГСК в мегакариоциты и образования тромбоцитов, так и в плане обеспечения инфекционной безопасности продукта, синхронизации всех процессов и других технологических этапов. При этом, несмотря на многие препятствия на пути к развитию этой технологии, подобные эксперименты представляют живой интерес и позволяют продвинуться еще на один шаг ближе к клиническому применению мегакариоцитов и тромбоцитов, полученных *ex vivo*.

### Список литературы

1. Kaushansky K. Thrombopoiesis // *Semin Hematol.* 2015. Vol.52(1). P.4-11.
2. Кислякова Л.П. Донорство как компонент национальной безопасности // *Современные проблемы науки и образования.* – 2014. – № 4; url: [www.science-education.ru/118-14092](http://www.science-education.ru/118-14092).
3. Stasi R. How to approach thrombocytopenia // *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2012. P.191-197.
4. Приказ Минздрава России от 25 ноября 2002 г. № 363 “Об утверждении Инструкции по применению компонентов крови”
5. Четчин А.В., Данильченко В.В., Макеев А.Б., Григорьян М.Ш. Новые технологии обеспечения инфекционной и иммунологической безопасности в учреждениях службы крови Российской Федерации // «Трансфузиология». 2014. №15-1. С.70-71.

6. Гаврилов А.О., Жуковская Е.В., Спичак И.И., Рудакова Г.А. Биологическая безопасность - один из главных критериев качества трансфузионной помощи // *Вестник службы крови России.* 2009. №2. С.11-17.

7. Schiffer C.A. Diagnosis and management of refractoriness to platelet transfusion // *Blood Rev.* 2001. Vol.15(4). P.175-80.

8. Fujimi A., Matsunaga T., Kobune M., Kawano Y., Nagaya T., Tanaka I., Iyama S., Hayashi T., Sato T., Miyanishi K., Sagawa T., Sato Y., Takimoto R., Takayama T., Kato J., Gasa S., Sakai H., Tsuchida E., Ikebuchi K., Hamada H., Niitsu Y. *Ex vivo* large-scale generation of human red blood cells from cord blood CD34+ cells by co-culturing with macrophages // *Int J Hematol.* 2008. Vol.87(4). P.339-50.

9. Nakamura S., Takayama N., Hirata S., Seo H., Endo H., Ochi K., Fujita K., Koike T., Harimoto K., Dohda T., Watanabe A., Okita K., Takahashi N., Sawaguchi A., Yamanaka S., Nakauchi H., Nishimura S., Eto K. Expandable megakaryocyte cell lines enable clinically applicable generation of platelets from human induced pluripotent stem cells // *Cell Stem Cell.* 2014. Vol.14(4). P.535-48.

10. Lu S.J., Li F., Yin H., Feng Q., Kimbrel E.A., Hahn E., Thon J.N., Wang W., Italiano J.E., Cho J., Lanza R. Platelets generated from human embryonic stem cells are functional *in vitro* and in the microcirculation of living mice // *Cell Res.* 2011. Vol.21(3). P.530-45.

11. Hatami J., Andrade P.Z., Alves de Matos A.P., Djokovic D., Lilaia C., Ferreira F.C., Cabral J.M., da Silva C.L. Developing a co-culture system for effective megakaryo/thrombopoiesis from umbilical cord blood hematopoietic stem/progenitor cells // *Cytotherapy.* 2015. Vol.17(4). P.428-42.

12. Pallotta I., Lovett M., Kaplan D.L., Balduini A. Three-dimensional system for the *in vitro* study of megakaryocytes and functional platelet production using silk-based vascular tubes // *Tissue Eng Part C Methods.* 2011. Vol.17(12). P.1223-1232.

13. Di Buduo C.A., Wray L.S., Tozzi L., Malara A., Chen Y., Ghezzi C.E., Smoot D., Sfara C., Antonelli A., Spedden E., Bruni G., Staii C., De Marco L., Maggani M., Kaplan D.L., Balduini A. Programmable 3D silk bone marrow niche for platelet generation *ex vivo* and modeling of megakaryopoiesis pathologies // *Blood.* 2015. Vol.125(14). P.2254-2264.

14. Thon J.N., Mazutis L., Wu S., Sylman J.L., Ehrlicher A., Machlus K.R., Feng Q., Lu S., Lanza R., Neeves K.B., Weitz D.A., Italiano J.E. Jr. Platelet bioreactor-on-a-chip // *Blood*. 2014. Vol.124(12). P.1857-1867.
15. Sullenbarger B., Bahng J.H., Gruner R., Kotov N., Lasky L.C. Prolonged continuous in vitro human platelet production using three-dimensional scaffolds // *Exp Hematol*. 2009. Vol.37(1). P.101-110.
16. Nakagawa Y., Ikeda S., Fukuda T., Arai F., Nakamura S., Eto K. Production system of platelet from iPS cells by two-way flow bioreactor // *MHS*. 2012. P.178-181.
17. Schlinker A.C., Radwanski K., Wegener C., Min K., Miller W.M. Separation of in-vitro-derived megakaryocytes and platelets using spinning-membrane filtration // *Biotechnol Bioeng*. 2015. Vol.112(4). P.788-800.
18. Avanzi M.P., Mitchell W.B. Ex vivo production of platelets from stem cells // *Br J Haematol*. 2014. Vol.165(2). P.237-247.
19. Lambert M.P., Sullivan S.K., Fuentes R., French D.L., Poncz M. Challenges and promises for the development of donor-independent platelet transfusions // *Blood*. 2013. Vol.121(17). P.3319-3324.