

ПРИМЕНЕНИЕ КОНДИЦИОНИРОВАННОЙ СРЕДЫ ОТ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК В ПРОТОКОЛЕ ПО ПОЛУЧЕНИЮ МЕГАКАРИОЦИТОВ И ТРОМБОЦИТОВ *EX VIVO*

Ключников Д. Ю.^{1*}, Языкова М. Ю.², Степанов А. А.³, Волчков С. Е.¹, Тюмина О. В.^{1,4}

¹ГБУЗ «Самарский областной медицинский центр Династия», 443095, Самара, Россия

²ФГАОУ ВО «Самарский национальный исследовательский университет им. академика С.П. Королева», 443086, Самара, Россия

³ФГБНУ «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича», 119121, Москва, Россия

⁴ФГБОУ ВО «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 443099, Самара, Россия

РЕЗЮМЕ

Введение. Интерес представляет использование кондиционированной среды от мезенхимальных стромальных клеток (МСК) с целью увеличения экспансии CD34⁺ гемопоэтических стволовых клеток (ГСК).

Цель — анализ эффективности двух методов получения мегакариоцитов и тромбоцитов человека *ex vivo* из CD34⁺ ГСК пуповинной крови с использованием кондиционированной среды от мезенхимальных стромальных клеток и среды IMDM.

Методы. Сравнивали два метода культивирования, отличающиеся формулировкой питательных сред. Для контроля экспрессии поверхностных антигенов использовали тромбоциты периферической крови здоровых доноров. CD34⁺ ГСК были выделены из мононуклеарной фракции клеток пуповинной крови методом иммуномагнитной селекции. Полученные клетки вносили в концентрации 1×10^4 кл/мл в 24-луночные планшеты и культивировали при 39 °C и 10% CO₂ в течение первых 7 сут., после чего условия меняли на 37 °C и 5% CO₂ и культивировали 14 сут. В первой группе до 7-х сут. культивирование проводили на кондиционированной МСК среде, содержащей тромбопоэтин (30 нг/мл), фактор стволовых клеток (2 нг/мл), интерлейкин (ИЛ)-6 (7,5 нг/мл) и ИЛ-9 (13,5 нг/мл), а во второй группе использовали среду IMDM с аналогичным цитокиновым коктейлем. По окончании культивирования проводили подсчет клеток на гемоцитометре. Определение экспрессии CD34, CD41a, CD42b проводили с помощью проточной цитометрии.

Результаты. Образование мегакариоцитов наблюдали на 7-е сут. культивирования. Уровень экспрессии с использованием кондиционированной среды от мезенхимальных стромальных клеток (1-я группа) по CD41a составил $5,84 \pm 0,33$ % против $10,43 \pm 1,08$ % с применением среды IMDM (2-я группа). К 13-м суткам отношение увеличилось до $42,05 \pm 1,71$ и $61,78 \pm 1,71$ % соответственно. CD41a⁺ мегакариоциты 1-й группы экспрессировали маркер CD42b на уровне $96,85 \pm 1,06$ %, против $88,7 \pm 0,56$ % во 2-й группе. Среднее количество ядросодержащих клеток на 11-е сутки было достоверно больше при культивировании в кондиционированной МСК среде и составило $326,02 \pm 1,86 \times 10^4$ кл/мл против $197,26 \pm 10,55 \times 10^4$ кл/мл при использовании IMDM. Образование протромбоцитов было заметно с помощью микроскопии уже с 12-х суток. Соотношение CD41a⁺/CD42b⁺ тромбоцитов составляло $59,5 \pm 3,85$ % в 1-й группе, против $65,9 \pm 8,72$ % во 2-й группе, при этом уровень экспрессии маркера в контрольных тромбоцитах венозной крови составил $96,11 \pm 0,89$ %.

Заключение. Использование кондиционированной МСК среды увеличивает экспансию ядросодержащих клеток, однако уменьшает степень дифференцировки в мегакариоцитарную линию.

Ключевые слова: CD34⁺, гемопоэтические стволовые клетки, пуповинная кровь, мегакариоциты, тромбоциты, *ex vivo*, кондиционированная среда, мезенхимальные стромальные клетки

Конфликт интересов: авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование: исследование не имело спонсорской поддержки.

Для цитирования: Ключников Д.Ю., Языкова М.Ю., Степанов А.А., Волчков С.Е., Тюмина О.В. Применение кондиционированной среды от мезенхимальных стромальных клеток в протоколе по получению мегакариоцитов и тромбоцитов *ex vivo*. Гематология и трансфузиология. 2021; 66(4): 526–538. <https://doi.org/10.35754/0234-5730-2021-66-4-526-538>

APPLICATION OF CONDITIONED MEDIUM FROM MESENCHYMAL STROMAL CELLS IN THE PROTOCOL FOR *EX VIVO* PRODUCTION OF MEGAKARYOCYTES AND PLATELETS

Klyuchnikov D. Yu.^{1,*}, Yazykova M. Yu.², Stepanov A. A.³, Volchkov S. E.¹, Tyumina O. V.^{1,4}

¹Samara Regional Medical Center Dynasty (Medical Centre Dynasty), 443095, Samara, Russian Federation

²Samara National Research University, 443086, Samara, Russian Federation

³Institute of Biomedical Chemistry, 119121, Moscow, Russian Federation

⁴Samara State Medical University, 443099, Samara, Russian Federation

ABSTRACT

Introduction. Of interest is the use of a conditioned medium from mesenchymal stromal cells in order to increase the expansion of CD34⁺ hematopoietic stem cells (HSCs).

Aim — to analyze the efficacy of two methods of *ex vivo* production of human megakaryocytes and platelets from CD34⁺ cord blood HSC using conditioned media from mesenchymal stromal cells and IMDM.

Methods. Two cultivation methods that differ from each other by medium composition were compared. As a control of antigen expression of the donor, venous blood platelets were used. CD34⁺ HSCs were isolated from mononuclear fraction of cord blood using the immunomagnetic selection technique. The resulting cells were introduced at a concentration of 1×10^4 cells/mL into 24-well plates and cultured at 39 °C and 10 % CO₂ for the first 7 days, after which the conditions were changed to 37 °C and 5 % CO₂ and cultured for 14 days. In Group 1, up to day 7, the culture was performed using conditioned medium from mesenchymal stromal cell containing TPO (30 ng/mL), SCF (2 ng/mL), IL-6 (7.5 ng/mL), IL-9 (13.5 ng/mL), and in Group 2 a IMDM medium with the same cytokine cocktail was used. The cells were calculated using haemocytometer. CD34, CD41a, CD42b expression was evaluated using flow cytometry. Statistic data was processed with using R-language. The differences were evaluated as statistically significant at significance level $p < 0.05$.

Results. Megakaryocyte production was observed starting from day 7 of culture. The expression level using conditioned medium from mesenchymal stromal cells (Group 1) according to CD41a was 5.84 ± 0.33 % versus 10.43 ± 1.08 % using IMDM medium (Group 2). On day 13 the ratio increased up to 42.05 ± 1.71 % in Group 1 and 61.78 ± 1.71 % in Group 2. CD41a⁺ megakaryocytes of Group 1 expressed the CD42b marker at the level of 96.85 ± 1.06 % versus 88.7 ± 0.56 % in Group 2. With the application of MSC conditioned medium the average number of nucleated cells was significantly higher on the day 11 and it was equal $326.016 \pm 1.86 \times 10^4$ cells/mL vs $197.26 \pm 10.55 \times 10^4$ cells/mL in IMDM medium. Proplatelet formation was observed with microscopy starting from the day 12. The ratio of CD41a⁺/CD42b⁺ platelets was 59.5 ± 3.85 % in conditioned medium, 65.9 ± 8.72 % in IMDM, and 96.11 ± 0.89 % in control platelets derived from venous blood.

Conclusion. It was demonstrated that the use of MSC conditioned medium leads to an increase in the expansion of nucleated cells, however it decreases the rate of differentiation in megakaryocytes.

Keywords: CD34⁺, hematopoietic stem cells, cord blood, megakaryocytes, platelets, *ex vivo*, conditioned medium, *ex vivo*, mesenchymal stromal cells

Conflict of interest: the authors declare no conflict of interest.

Financial disclosure: the study had no sponsorship.

For citation: Klyuchnikov D.Yu., Yazykova M.Yu., Stepanov A.A., Volchkov S.E., Tyumina O.V. Application of conditioned medium from mesenchymal stromal cells in the protocol for *ex vivo* production of megakaryocytes and platelets. Russian Journal of Hematology and Transfusiology (Gematologiya i transfuziologiya). 2021; 66(4): 526–538 (in Russian). <https://doi.org/10.35754/0234-5730-2021-66-4-526-538>

Введение

Одной из важнейших функций тромбоцитов является поддержание целостности стенок сосудов и запуск механизма первичного гемостаза в случае их повреждений. Тромбоциты также принимают участие в антимикробных защитных иммунных реакциях, секреции цитокинов, индуцирующих воспаление, и ростовых факторов, необходимых для восстановления тканей [1]. Нарушение функций тромбоцитов и взаимодействия между тромбоцитами и другими иммунными клетками может быть причиной целого ряда заболеваний [2]. Концентраты тромбоцитов используют для трансфузий больным при тромбоцитопении, вызванной массивной кровопотерей и онкологическими заболеваниями, а также при наследственных нарушениях функции тромбоцитов [3–5]. В настоящее время тромбоциты для клинического применения могут быть получены только от доноров. Альтернативой донорским тромбоцитам могут стать тромбоциты, полученные из стволовых клеток в условиях *ex vivo*. Тромбоциты, полученные *ex vivo*, обладают преимуществами перед донорскими в связи с их доступностью и инфекционной безопасностью. Контаминация донорских тромбоцитов бактериальными и вирусными патогенами является одной из причиной осложнений при трансфузиях тромбоцитов [6]. Протоколы и технологии получения мегакариоцитов и тромбоцитов *in vitro* могут использоваться для изучения заболеваний тромбоцитопоэза, а изучение тромбоцитопоэза *in vitro* позволит глубже понять его механизмы, оценить влияние факторов регуляции [7].

Первые работы, доказывающие возможность получения тромбоцитов *ex vivo*, были проведены более 25 лет назад [8]. В настоящее время разработано множество протоколов по получению мегакариоцитов и тромбоцитов из различных источников: индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (иПСК), эмбриональных стволовых клеток (ЭСК), гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) костного мозга, ГСК пуповинной крови и ГСК периферической крови. Однако, несмотря на все прилагаемые усилия, не разработано ни одной технологии получения тромбоцитов, в полной мере удовлетворяющей клинические потребности [9–11]. Во-первых, эффективность образования тромбоцитов *ex vivo* гораздо меньше, чем *in vivo*, и получение *ex vivo* клинически значимого количества тромбоцитов затруднительно [12, 13]. Во-вторых, тромбоциты, полученные *ex vivo*, в ранее предложенных протоколах несколько отличаются от тромбоцитов, полученных из крови доноров [14]. Кроме этого, важным фактором является и уменьшение стоимости производственных затрат на получение тромбоцитов *ex vivo* [15].

Преимуществом получения мегакариоцитов и тромбоцитов из иПСК и ЭСК является их способность к самообновлению. С использованием иПСК получены два

типа мегакариоцитарных линий [16, 17] и разработан единственный протокол по получению мегакариоцитов с применением одобренных фармакологических препаратов и без использования каких-либо ксеногенных агентов, однако его эффективность также остается невысокой [18]. Использование иПСК позволяет получать мегакариоциты и тромбоциты, не экспрессирующие белки главного комплекса гистосовместимости (HLA-ABC^{-/-}), применение которых позволит избежать рефрактерности при лечении аллоиммунизированных больных [19, 20]. Однако количество и качество тромбоцитов, полученных при использовании иПСК, остаются очень низкими (< 10 тромбоцитов на 1 мегакариоцит), а также плюрипотентные клетки потенциально туморогенны, что ограничивает их применение в клинической практике [21, 22]. Высокая стоимость основанных на использовании иПСК технологий ограничивает их масштабное применение [13]. Мегакариоциты, полученные из иПСК меньшего размера, в сравнении с мегакариоцитами костного мозга имеют меньшую плоидность, чем полученные из CD34⁺ ГСК [23].

Получение ГСК из костного мозга, периферической или пуповинной крови является гораздо более простой и менее дорогостоящей процедурой, чем получение плюрипотентных клеток. Протоколы получения тромбоцитов *ex vivo* с их использованием имели относительно высокую эффективность [13]. ГСК, в отличие от иПСК, используются в клинической практике. Кроме этого, CD34⁺ ГСК пуповинной крови обладают большим потенциалом к пролиферации, чем CD34⁺ ГСК костного мозга или мобилизованной периферической крови [24]. Использование ГСК позволяет получать мегакариоциты и тромбоциты однократно, и поэтому требуется получение новых ГСК для повторения протокола.

Поскольку эффективность образования тромбоцитов из мегакариоцитов *in vivo* гораздо выше, чем в экспериментах *ex vivo* [7], разрабатываются также подходы по использованию полученных *ex vivo* мегакариоцитов в качестве продукта для трансфузий [25]. В клинических целях коммитированные мегакариоцитарные предшественники и мегакариоциты могут использоваться при трансплантации ГСК пуповинной крови для сокращения длительности периода тромбоцитопении у онкогематологических больных. Есть данные, свидетельствующие о возможности и безопасности инфузий мегакариоцитарных предшественников, полученных *ex vivo*, для лечения больных с тромбоцитопенией [26, 27].

Интерес представляет использование кондиционированной среды от мезенхимальных стромальных клеток (МСК) с целью увеличения экспансии CD34⁺ ГСК. Такое действие обусловлено содержанием в кон-

диционированной среде (секретоме МСК) человека ростовых факторов и других компонентов, экспрессируемых МСК и играющих ключевую роль в регуляции взаимодействия между клетками и нишей для обеспечения их биологических функций [28]. Ростовые факторы, содержащиеся в кондиционированной МСК среде, увеличивают пролиферацию клеток [29]. Секретом МСК также стимулирует *ex vivo* экспансию CD34⁺ клеток [30–33], что влияет на эффективность получения мегакариоцитов *ex vivo*.

Целью настоящей работы являлась разработка и анализ протокола по получению мегакариоцитов и тромбоцитов человека из CD34⁺ ГСК пуповинной крови с использованием кондиционированной МСК среды и оценка его эффективности по сравнению со средой IMDM.

Методы

Выделение фракции мононуклеарных клеток (МНК) из пуповинной крови. В качестве источника клеток использовали пуповинную кровь рожениц, давших свое добровольное письменное согласие на использование крови в научных целях. Пуповинную кровь не подвергали криоконсервации, время от момента родов до момента начала выделения клеток составляло не более 24 ч. Для выделения МНК из цельной пуповинной крови использовали среду Lymphoprep (Lymphoprep™, Density gradient medium for the isolation of mononuclear cells, STEMCELL Technologies Inc., Канада) согласно протоколу производителя. Собранные на этапе выделения МНК, полученные от 3–5 единиц пуповинной крови, пулировали для увеличения общего количества клеток и сглаживания междонорской вариабельности.

Выделение CD34⁺ клеток из пула МНК. Выделение CD34⁺ клеток проводили из пула полученной ранее фракции МНК пуповинной крови с помощью метода позитивной иммуномагнитной селекции с использованием набора Human CD34 Selection Kit (EasySep™ Human CD34 Positive Selection Kit II, Immunomagnetic positive selection kit, STEMCELL Technologies Inc., Канада) и магнита Purple EasySep® (EasySep™ Magnet, Magnet for column-free immunomagnetic separation, STEMCELL Technologies Inc., Канада) согласно инструкции производителя.

Подсчет CD34⁺ ГСК. Подсчет CD34⁺ ГСК и их жизнеспособности проводили методом проточной цитометрии на проточном цитометре FACSCanto (Becton Dickinson, США) с использованием антител против CD34 и CD45 (Anti-Human CD45 FITC/CD34 PE, Clone 2D18G12, Becton Dickinson, США), а также пробирок Trucount (BD Trucount™, Absolute Counting Tubes, Becton Dickinson, США) для абсолютного подсчета клеток согласно инструкции производителя.

Подготовка кондиционированной МСК среды. Для подготовки кондиционированной среды использовали куль-

туру МСК человека, полученную из ткани пуповины. Клетки 2-го пассажа вносили в среду αМЕМ с 200 мМ L-глутамин (Альфа-МЕМ с L-глутамином, ООО «БиолоТ», Россия), содержащую 10% эмбриональной телячьей сыворотки (Research Grade Fetal Bovine Serum, HyClone, США) в количестве 1×10^3 кл/см² площади культуральной посуды. Спустя 2 суток среду заменяли на свежую среду того же состава, а на 5-е сутки среды собирали в центрифужные пробирки объемом 50 мл и центрифугировали при ускорении 400 g в течение 10 мин для удаления клеток. Отсутствие контаминации клетками среды подтверждали позже в процессе культивирования CD34⁺ ГСК с помощью световой микроскопии. Общее количество клеток на см² пластика составляло 1×10^5 , а время инкубирования (экспозиции) на среде — 3 суток.

Культивирование CD34⁺ ГСК. Использовались два варианта культуральных сред: кондиционированная МСК среда (среда на основе αМЕМ) и среда IMDM с добавлением GlutaMAX (Iscove's Medium w/GlutaMAX-I, STEMCELL Technologies Inc., Канада). В каждую из вариантов были внесены рекомбинантные цитокины: тромбопоэтин (ТПО) — 30 нг/мл (Thrombopoietin, Recombinant Human Protein, 100 мкг, Life Technologies, США), фактор стволовых клеток (ФСК) (Stem Cell Factor, SCF) — 2 нг/мл (SCF/C-Kit Ligand CTST™, Recombinant Human Protein, 100 μg, Life Technologies, США), интерлейкин (ИЛ)-6 — 7,5 нг/мл (IL6 Recombinant Human Protein, 10 μg, Life Technologies, США), ИЛ-9 — 13,5 нг/мл (IL9 Recombinant Human Protein, 10 μg, Life Technologies, США). Вместо сыворотки использовался сывороточный заменитель BIT 9500 (BIT 9500 Serum Substitute, Supplement for serum-free cell culture media, STEMCELL Technologies Inc., Канада). Состав используемых сред приведен в таблице 1.

Протокол был разбит на 2 этапа, первый из которых проводили в условиях температуры 39 °C и CO₂ 10% в течение первых 7 сут. Второй этап проводили в условиях температуры 37 °C и CO₂ 5% с 7-х до 14-х сут. При этом на первом этапе до 7-х сут. CD34⁺ ГСК культивировались на кондиционированной МСК среде и на среде IMDM с добавлением GlutaMAX (Iscove's Medium w/GlutaMAX-I, StemCell Technologies Inc., Канада) (рис. 1).

Культивирование проводили в 24-луночных планшетах (Cell Culture Plate, SPL Life Sciences Co., Ltd., Республика Корея) с рабочим объемом 1 мл в каждой лунке. CD34⁺ клетки вносили в количестве 1×10^4 кл/мл культуральной среды. На 4-е сутки проводили замену половины среды, а на 7-е сутки общую концентрацию клеток доводили до $3\text{--}3,4 \times 10^5$ кл/мл.

Световую микроскопию культуры клеток проводили ежедневно с помощью систем Zeiss AxioObserver на ПО AxioVision v.4.6.3 и Zeiss AxioStar Plus (Carl

Таблица 1. Состав сред для культивирования
Table 1. Composition of culture medium

Компоненты Components	Кондиционированная среда Conditional medium	Среда на основе IMDM Medium based on IMDN
αMEM	+	–
IMDM	–	+
ВIT 9500, %	20	20
ТПО, нг/мл/TPO, ng/mL	30	30
ФСК, нг/мл/SCF, ng/mL	2	2
ИЛ-6, нг/мл/IL-6, ng/mL	7,5	7,5
ИЛ-9, нг/мл/IL-9, ng/mL	13,5	13,5

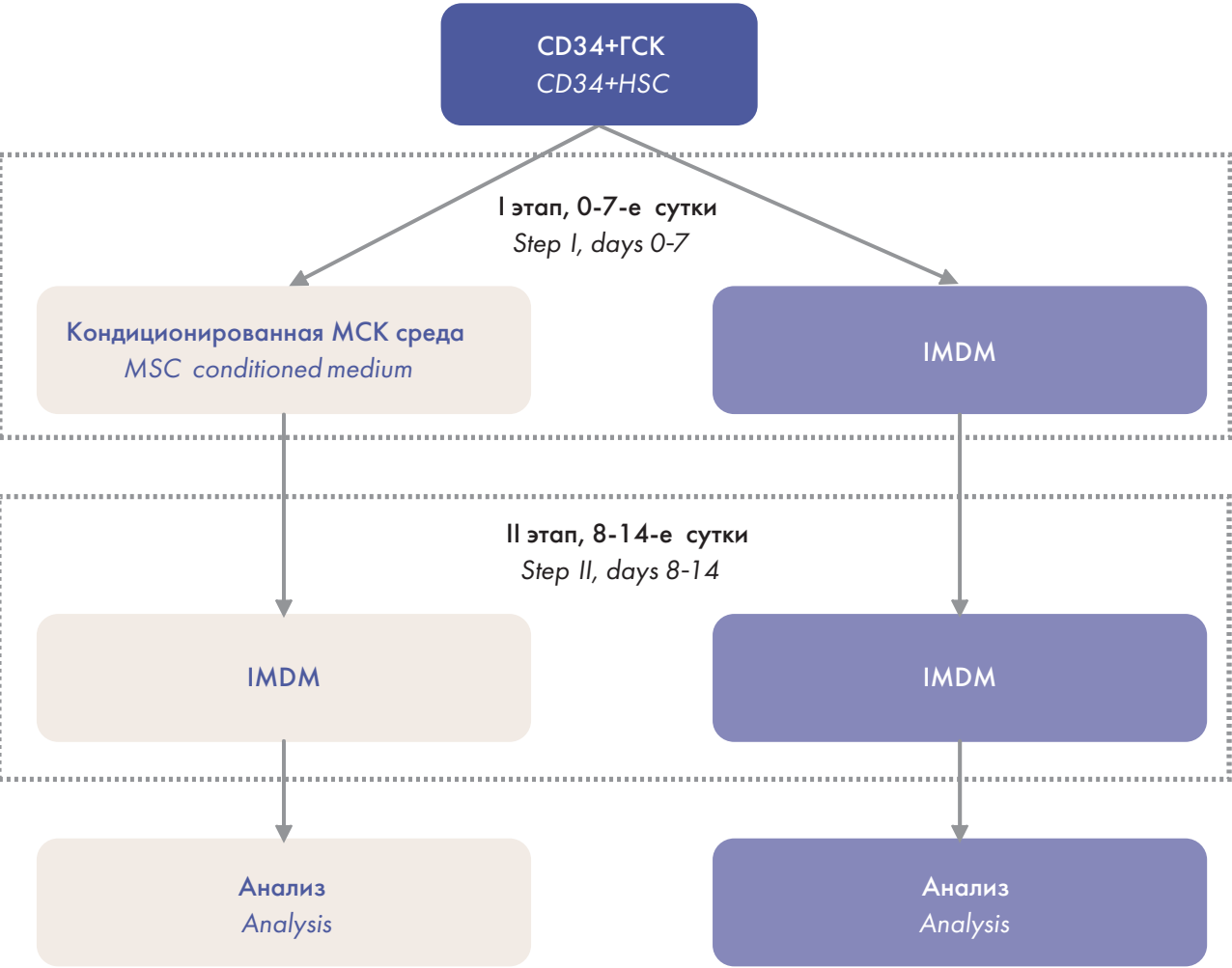


Рисунок 1. Схема эксперимента
Figure 1. Experiment design

Zeiss Microscopy GmbH, Германия). Абсолютный подсчет количества клеток проводили с помощью гемоцитометра (Metallized Hemacytometer Reichert Bright-Line, Hausser Scientific Company, США) на 4-е, 7-е, 10-е и 14-е сутки культивирования. Количество тромбоцитов венозной крови донора и тромбоцитоподобных частиц, полученных *ex vivo*, определяли на гематологическом анализаторе BC 5300 Mindray (Mindray Medical International Limited, КНР). Проточную цитометрию проводили на проточном цитофлуориметре FACSCanto (Becton Dickinson, США) с использованием антител против CD34,

CD41a, CD42b. Для определения тромбоцитов, полученных *ex vivo*, экспрессирующих CD41a и CD42b, предварительно проводили настройку области для проточной цитометрии с использованием контрольных тромбоцитов венозной крови взрослого донора. Для этого 6 мл венозной крови взрослого донора собирали в 2 пробирки по 3,6 мл с 3,2 % цитратом натрия (BODYWIN, PN0542S, КНР). Кровь центрифугировали при 330 g 10 мин без торможения. Плазму, содержащую тромбоциты, собирали пипетированием верхней фазы образца и центрифугировали еще раз при 1500 g в течение 15 мин. Супернатант удаля-

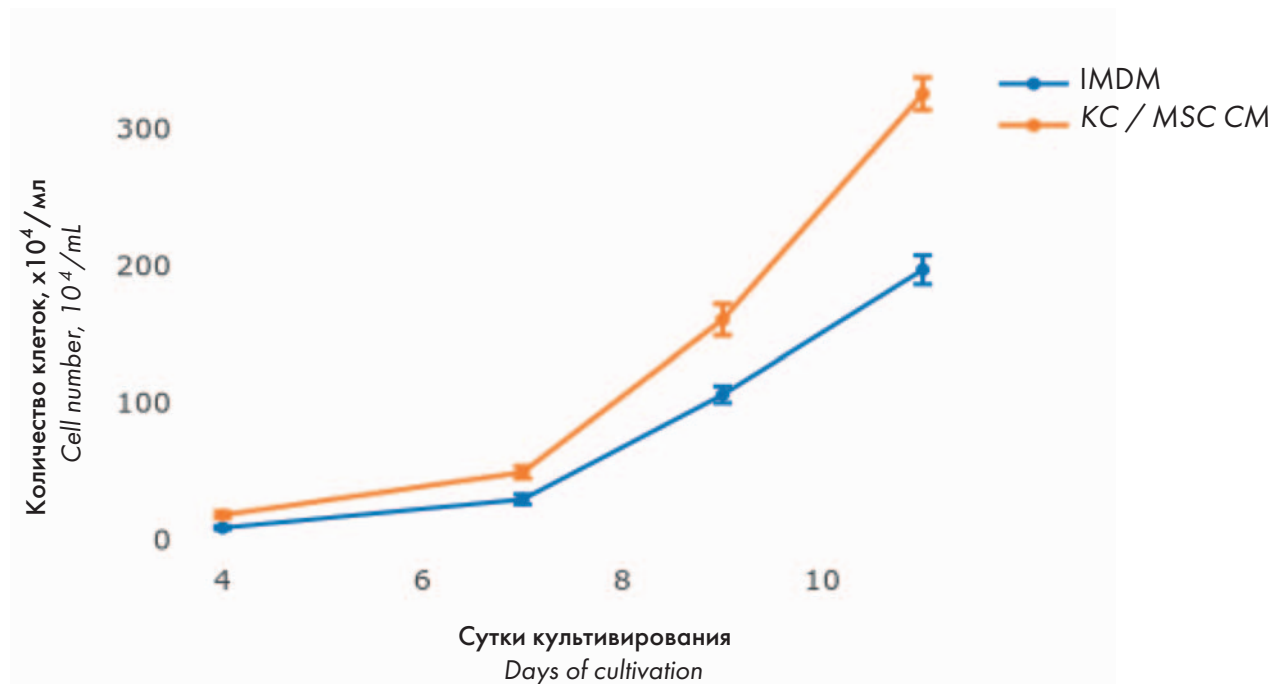


Рисунок 2. Количество ядродержащих клеток в процессе культивирования

Figure 2. The number of nucleated cells

ли, а осадок ресуспендировали в буфере для отмывки клеток (CellWASH, Becton Dickinson, США). Подсчет количества мегакариоцитов проводили умножением абсолютного количества клеток на процентное соотношение $CD41a^+CD42b^+$ клеток в культуре. Тромбоциты определяли как $CD41a^+/CD42b^+$ события в регионе дребеса при проточной цитометрии.

Статистический анализ. Статистическую обработку данных и построение графиков проводили с использованием языка R version 3.6.1 [34]. Для анализа и сравнения независимых групп применяли W-критерий Вилкоксона. Различия признавали как статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты

Экспансия ядродержащих клеток. При культивировании $CD34^+$ ГСК с применением кондиционированной среды на 13-е сут. наблюдалась более чем 300-кратная экспансия ядродержащих клеток. Выявлены достоверные отличия в степени экспансии ядродержащих клеток с использованием кондиционированной МСК среды и IMDM (рис. 2).

На 4-е сутки культивирования с применением кондиционированной МСК среды среднее количество ядродержащих клеток составляло $18,35 \pm 2,13 \times 10^4$ кл/мл, с применением среды на основе IMDM — $8,98 \pm 1,18 \times 10^4$ кл/мл; на 7-е сутки — $49,57 \pm 4,38 \times 10^4$ и $29,77 \pm 3,6 \times 10^4$ кл/мл; на 9-е сутки — $160,91 \pm 11,37 \times 10^4$ и $106,33 \pm 6,04 \times 10^4$ кл/мл; на 11-е сутки — $326,02 \pm 11,86 \times 10^4$ и $197,26 \pm 10,55 \times 10^4$ кл/мл соответственно (рис. 2).

Созревание мегакариоцитов. Появление мегакариоцитов наблюдалось уже с 7-х суток культивирования

и на кондиционированной МСК среде, и на IMDM (рис. 3).

Анализ экспрессии $CD41a$ маркера показал, что с 4-х по 13-е сутки соотношение $CD41a^+$ клеток увеличилось с $1,65 \pm 0,26\%$ клеток общей популяции на кондиционированной среде до $42,05 \pm 1,71\%$ и с $2,08 \pm 0,43\%$ на среде IMDM до $61,78 \pm 1,71\%$ (рис. 4).

Выявлены значимые отличия в экспрессии $CD42b$ антигена между полученными *ex vivo* $CD41a^+$ мегакариоцитами (рис. 5).

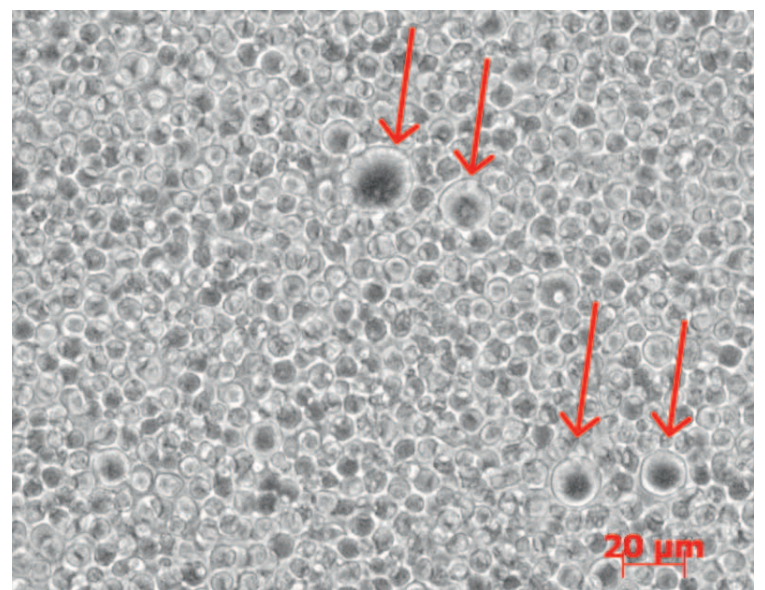


Рисунок 3. Микрофотография мегакариоцитов в культуре клеток на 7-е сутки, ув. $\times 100$

Figure 3. Microphotography of megakaryocytes in culture on day 7, magnification $\times 100$

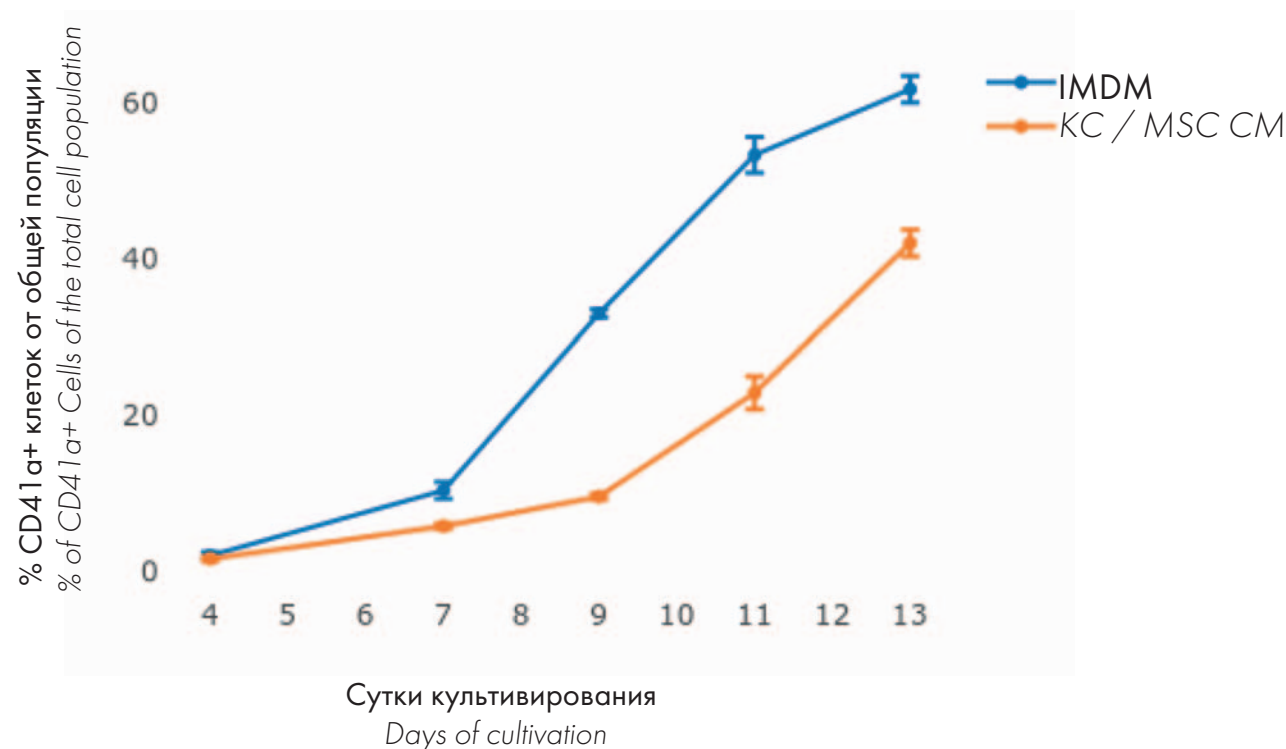


Рисунок 4. Изменение экспрессии CD41a маркера в процессе культивирования
Figure 4. Changing of CD41a expression level during cultivation

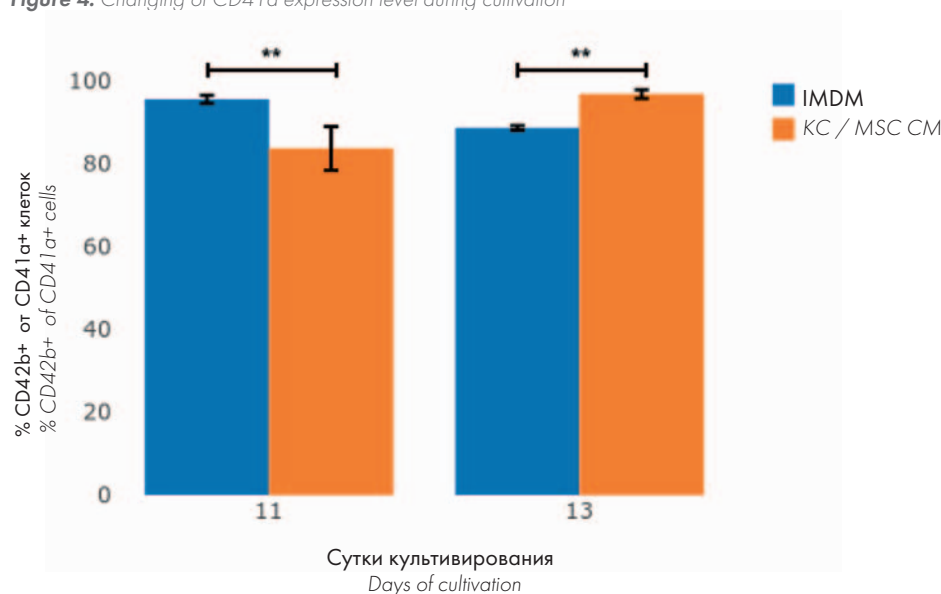


Рисунок 5. Процентное соотношение CD42b+ клеток от CD41a+ клеток на 11-е и 13-е сутки культивирования
Figure 5. Percentage of CD42b+ cells from CD41a+ cells on days 11 and 13 of culture

На 11-е сутки культивирования $83,73 \pm 5,3\%$ CD41a+ клеток экспрессировали CD42b на кондиционированной среде и $95,6 \pm 0,99\%$ — на IMDM, а на 13-е сутки $96,85 \pm 1,06\%$ на кондиционированной среде и $88,7 \pm 0,56\%$ на IMDM соответственно.

Образование протромбоцитов и высвобождение тромбоцитов. Образование протромбоцитов и высвобождение тромбоцитов наблюдалось, начиная с 12-х сут. культивирования (рис. 6).

Отмечены различия в экспрессии маркеров клеточной дифференцировки CD41a и CD42b на тромбоцитоподобных частицах (ТПЧ), полученных в протоколе с приме-

нением кондиционированной среды, и тромбоцитами, полученными в протоколе с использованием только IMDM среды, а также их отличия от контрольных тромбоцитов венозной крови взрослого донора. В среднем, только $68,98 \pm 6,1\%$ ТПЧ, полученных с использованием кондиционированной МСК среды, экспрессировали CD41a+, против $68,98 \pm 6,1\%$ с использованием IMDM. В контроле $98,16 \pm 0,19\%$ тромбоцитов венозной крови экспрессировали CD41a. Количество ТПЧ, коэкспрессирующих характерные CD41a и CD42b, также отличалось между ТПЧ, полученными с использованием кондиционированной среды, IMDM и контрольными тромбоцитами

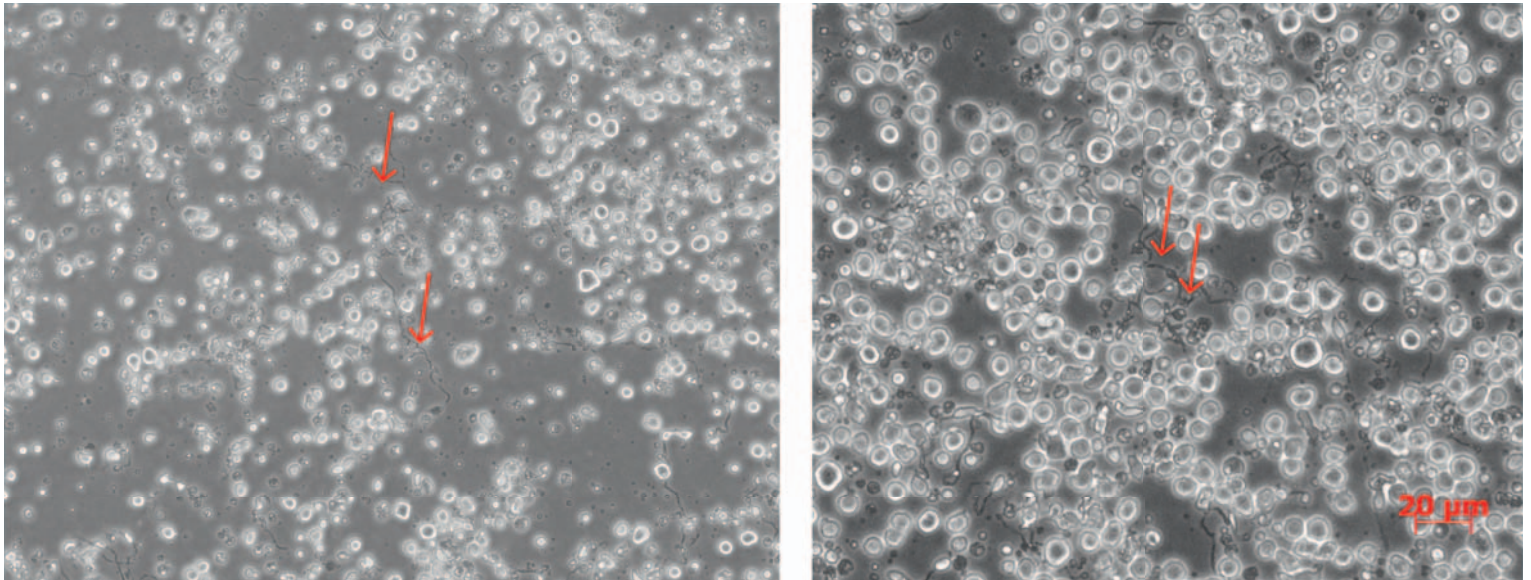


Рисунок 6. Микрофотографии протромбоцитов в культуре клеток на 12-е сутки, ув. $\times 100$, среда IMDM (протромбоциты отмечены стрелками)
Figure 6. Microphotography of proplatelets in culture on day 12, magnification $\times 100$ (proplatelets indicated with arrows)

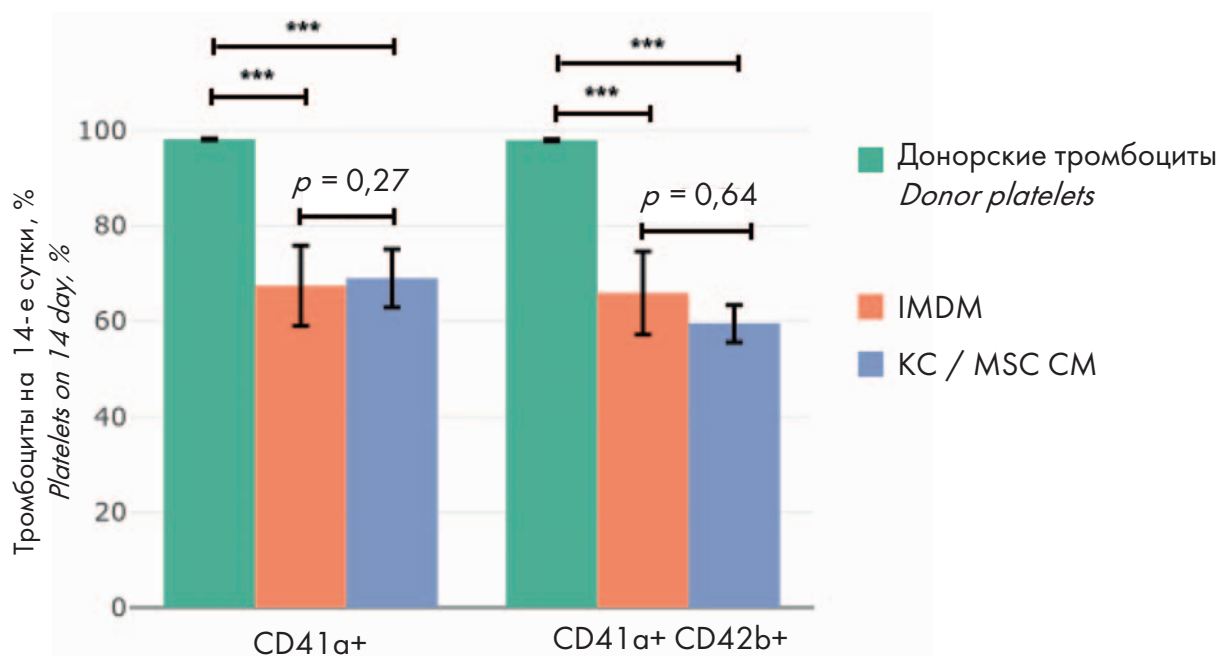


Рисунок 7. Средние значения процентного значения CD41a⁺ и CD41a⁺/CD42b⁺ тромбоцитов, полученных в эксперименте и контрольных тромбоцитах (***) — $p < 0,001$)

Figure 7. Mean of percentage of CD41a⁺ and CD41a⁺/CD42b⁺ platelet number produced in experiment vs control platelets (***) — $p < 0,001$)

венозной крови. В среднем, только $59,51 \pm 3,86\%$ ТПЧ, полученных с использованием кондиционированной среды, экспрессировали CD41a и CD42b, $65,88 \pm 8,73\%$ — с использованием IMDM, и $97,95 \pm 0,23\%$ контрольных тромбоцитов (рис. 7).

Таким образом, соотношение тромбоцитов, экспрессирующих CD41a и CD42b, достоверно отличалось, и средние значения составляли $48,27 \pm 5,22\%$ для кондиционированной среды и $54,53 \pm 8,01\%$ для IMDM. Среднее процентное отношение живых CD41a⁺/CD42b⁺ тромбоцитов в контроле составляло $96,11 \pm 0,89\%$. При пересчете на абсолютное количество средние значения CD41a⁺/CD42b⁺ тромбоцитов, полученных с использованием кондиционированной

среды, составили $117 \pm 7,42 \times 10^4$ кл/мл, с использованием IMDM — $115,3 \pm 32,06 \times 10^4$ кл/мл (рис. 8).

Эффективность протокола. Образование мегакариоцитов на кондиционированной МСК среде было достоверно ниже, чем на IMDM, и составило $73,25 \pm 6,01 \times 10^4$ кл/мл на кондиционированной среде и $105,87 \pm 7,15 \times 10^4$ кл/мл на IMDM на 11-е сутки. Кроме этого отмечено, что количество зрелых мегакариоцитов также было достоверно ниже на кондиционированной среде, чем на среде на основе IMDM и составило $61,33 \pm 5,03 \times 10^4$ кл/мл (SD; SE 1,59) против $101,21 \pm 6,83 \times 10^4$ кл/мл (рис. 8).

Проведенный анализ показал, что при использовании кондиционированной среды средний выход CD41a⁺ ме-

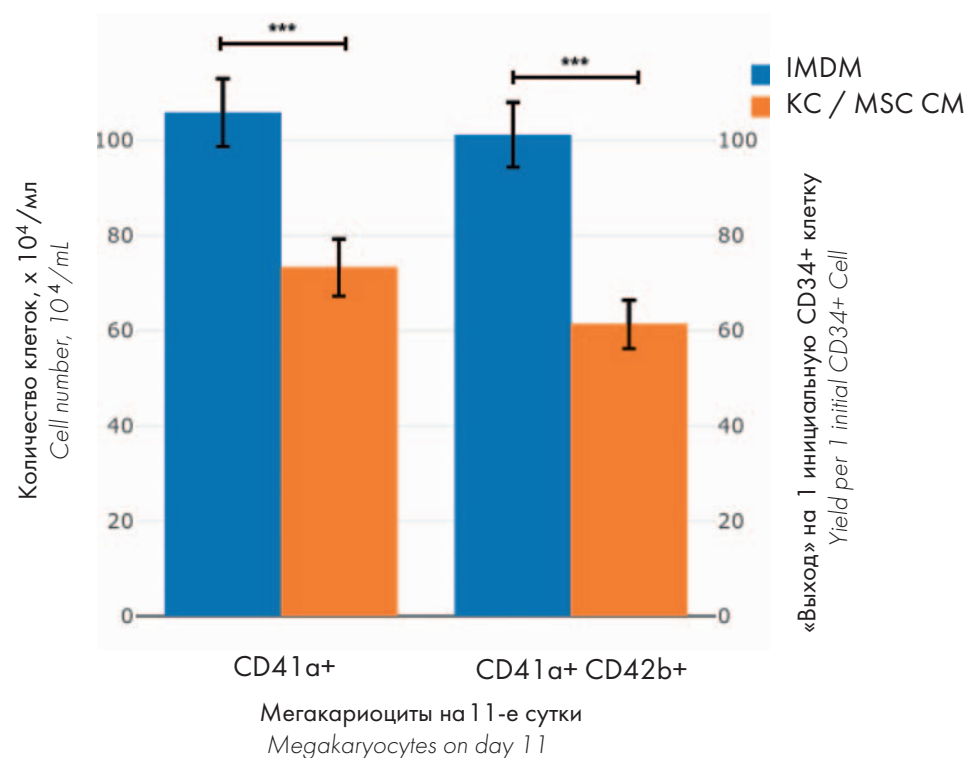


Рисунок 8. Абсолютное количество CD41a⁺ мегакариоцитов и зрелых CD41a⁺/CD42b⁺ мегакариоцитов на 11-е сутки культивирования (***) — $p < 0,001$

Figure 8. Absolute quantity of CD41a⁺ megakaryocytes and mature CD41a⁺/CD42b⁺ megakaryocytes on day 11 (***) — $p < 0.001$

гакариоцитов составил $73,25 \pm 6,01$ на 1 инициальную CD34⁺ ГСК, зрелых CD41a⁺/CD42b⁺ мегакариоцитов — $61,33 \pm 5,03$ на 1 инициальную CD34⁺ ГСК; при использовании среды IMDM средний выход CD41a⁺ мегакариоцитов составил $105,87 \pm 7,15$ на 1 инициальную CD34⁺ ГСК, зрелых CD41a⁺/CD42b⁺ мегакариоцитов — $101,21 \pm 6,83$ на 1 инициальную CD34⁺ ГСК. При этом один зрелый CD41a⁺/CD42b⁺ мегакариокит в среднем образовывал $117 \pm 27,42$ CD41a⁺/CD42b⁺ тромбоцитов на кондиционированной среде и $115,3 \pm 32,06$ — на IMDM.

Теоретический кумулятивный выход мегакариоцитов при использовании кондиционированной МСК среды и среды на основе IMDM также достоверно отличался. На 4-е сут. была проведена замена половины среды (фактор разведения 1–2), а на 7-е сут. в лунках с IMDM культура была разведена в 1,93 раза (фактор разведения 2–1,93), в культуре с кондиционированной средой в 2,89 раза (фактор разведения 2–2,89). Факторы разведения для расчета для культуры с IMDM составили 3,86, а для кондиционированной среды — 5,78. Таким образом, при применении кондиционированной среды среднее значение теоретического кумулятивного выхода CD41a⁺ мегакариоцитов составило $423,39 \pm 34,73$, а при применении среды на основе IMDM — $408,64 \pm 27,58$. Теоретический кумулятивный выход зрелых CD41a⁺/CD42b⁺ мегакариоцитов при применении кондиционированной среды составил $354,5 \pm 29,08$, а при применении среды на основе IMDM — $390,66 \pm 26,37$. Теоретический кумулятивный выход живых CD41a⁺/CD42b⁺ тромбо-

цитов при применении кондиционированной среды составил $676,26 \pm 58,5$, а при применении IMDM — $445,06 \pm 123,75$. Данные по теоретическому кумулятивному выходу на 1 инициальную CD34⁺ ГСК представлены на рисунке 9.

Обсуждение

Использование кондиционированной среды приводило к достоверному увеличению пролиферации ядродержащих клеток в процессе культивирования (на 11-е сутки — $326,02 \pm 11,86 \times 10^4$ кл/мл). Предположительно, такое действие обусловлено содержанием в кондиционированной среде секрета МСК человека, состоящего из цитокинов, хемокинов, молекул клеточной адгезии, ростовых факторов, гормонов, микровезикул и экзосом, и играющих ключевую роль в регуляции взаимодействия между клетками и нишей для обеспечения их биологических функций [35]. Ростовые факторы, содержащиеся в кондиционированной МСК среде (секрете МСК), увеличивают пролиферацию клеток [29]. Секрет МСК также стимулирует *ex vivo* экспансию CD34⁺ клеток [30–33], влияя тем самым на общую эффективность получения мегакариоцитов.

С другой стороны, использование кондиционированной МСК среды ведет к значительному уменьшению степени дифференцировки в мегакариотитарную линию. К 11-м суткам при использовании кондиционированной среды процент зрелых мегакариоцитов, коэкспрессирующих CD41a и CD42b в культуре клеток, составил всего $19,2 \pm 1,77\%$. Предполагается, что это

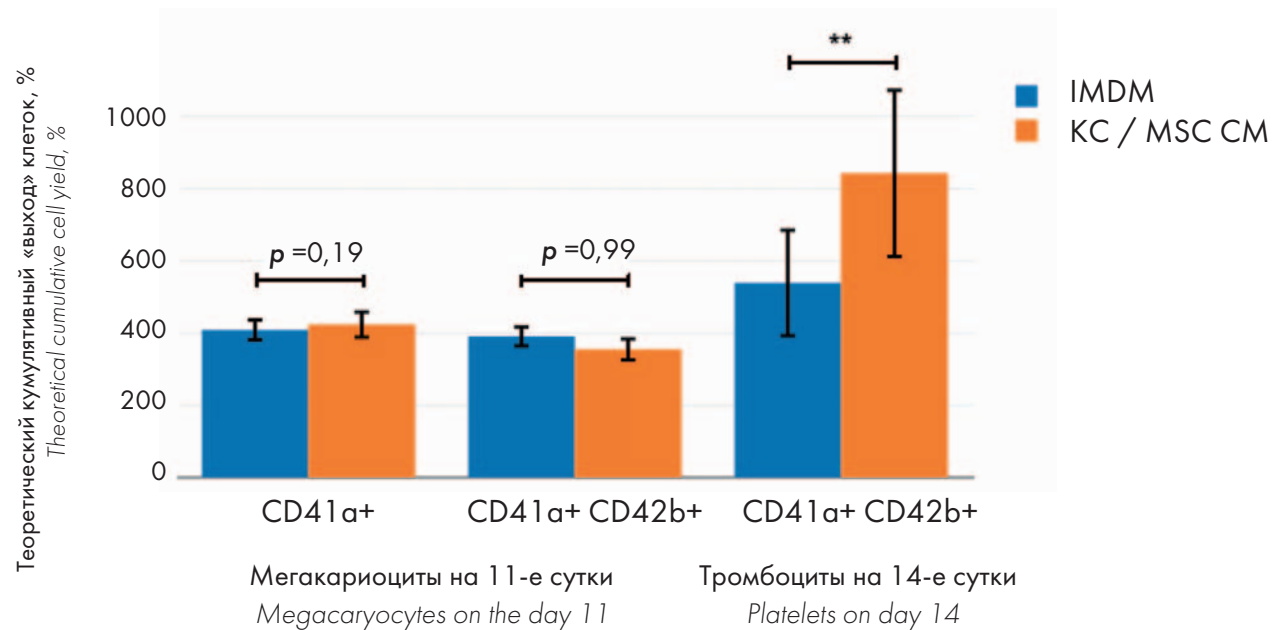


Рисунок 9. Выход CD41⁺ мегакариоцитов, зрелых CD41⁺/CD42b⁺ мегакариоцитов и CD41⁺/CD42b⁺ тромбоцитов (** — $p < 0,01$)
Figure 9. Yield of CD41⁺ megakaryocytes and mature CD41⁺/CD42b⁺ megakaryocytes and CD41⁺/CD42b⁺ platelets (** — $p < 0.01$)

происходит по той причине, что в секрете МСК содержатся и ростовые факторы (ФСК, SDF-1), способствующие самообновлению ГСК. В костном мозге CD34⁺ ГСК взаимодействуют со стромальными клетками, и SDF-1, конститутивно экспрессируемый МСК, участвует в адгезии клеток для того, чтобы они оставались в нише. Сам процесс созревания мегакариоцитов пространственно разобщен в разных нишах костного мозга. ГСК локализуются в эндостальных нишах, тогда как созревание мегакариоцитов происходит в периваскулярных нишах. Условия микроокружения в эндостальных и периваскулярных нишах отличаются [36]. В секрете МСК могут содержаться факторы, способствующие экспансии клеток и сохранению их в незрелом состоянии.

Для увеличения эффективности протоколов по получению мегакариоцитов *ex vivo* необходимо разделять этапы экспансии и созревания. Сам по себе процесс созревания в культуре клеток происходит асинхронно, поэтому разделить процесс по времени и клетки — технически очень сложная задача. Кроме этого, в культуре клеток мегакариоциты начинают образовывать протромбоциты, не достигнув своего «физиологического» размера (~50 мкм) [37]. Начиная с 10-х сут. часть клеток размером порядка 20 мкм начинает образовывать протромбоциты. Показано, что размеры мегакариоцитов коррелируют с количеством образуемых ими тромбоцитов [38]. В этом может быть причина образования гораздо меньшего количества тромбо-

цитов в экспериментах *ex vivo* в сравнении количеством тромбоцитов, образующихся из одного мегакариоцита в костном мозге *in vivo*. Предположительно это может быть связано с отсутствием в эксперименте фактора ниши, либо дефицитом отдельных ростовых факторов.

Не менее интересен и вопрос, отличается ли экспрессия CD41a и CD42b на полученных *ex vivo* тромбоцитах от экспрессии на тромбоцитах, полученных из венозной крови взрослого донора. Возможно, не все ТПЧ являются тромбоцитами, а часть из них являются клеточным дебрисом, фрагментами клеточных структур. Данный вопрос требует дополнительных исследований. Использование кондиционированной МСК среды позволяет увеличить экспансию клеток в процессе культивирования, однако уменьшает степень дифференцировки ГСК в мегакариоцитарную линию. Тромбоциты человека, полученные в протоколе с использованием кондиционированной МСК среды по степени экспрессии CD41a и CD42b достоверно не отличаются от тромбоцитов, полученных в протоколе с использованием IMDM.

Благодарности

Авторы выражают благодарность Бриллиантовой Варваре Витальевне, научному сотруднику лаборатории молекулярной биологии НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева; Трусовой Ларисе Михайловне, заведующей лабораторией иммунологического типирования ГБУЗ «МЦ Династия».

Литература

1. Grozovsky R., Giannini S., Falet H., Hoffmeister K.M. Regulating billions of blood platelets: Glycans and beyond. *Blood*. 2015; 126(16): 1877–84. DOI: 10.1182/blood-2015-01-569129.
2. Lam F.W., Vijayan K.V., Rumbaut R.E. Platelets and their interactions with other immune cells. *Compr Physiol*. 2015; 5(3): 1265–80. DOI: 10.1002/cphy.c140074.
3. Сидоров С.К., Чемоданов И.Г., Аюпова Р.Ф. и др. Стандарты и индивидуальные подходы в клинической трансфузиологии. *Трансфузиология*. 2017; 2(18): 55–66.
4. Зарубин М.В., Малых Т.Н., Курносов Н.В., Веревкина Л.Н. и др. Менеджмент крови донора: пулирование тромбоцитов. *Менеджер здравоохранения*. 2016; (2): 29–34.
5. Зарубин М.В., Зазнобов М.Е., Курносов Н.В. и др. Управление запасами тромбоцитов в региональной службе крови. *Казанский медицинский журнал*. 2015; 96(3): 407–13.
6. Frazier S.K., Higgins J., Bugajski A., et al. Adverse reactions to transfusion of blood products and best practices for prevention. *Crit Care Nurs Clin North Am*. 2017; 29(3): 271–90. DOI: 10.1016/j.cnc.2017.04.002.
7. DiBuduo C.A., Kaplan D.L., Balduini A. In vitro generation of platelets: Where do we stand? *Transfusion*. 2017; 24(3): 273–6. DOI: 10.1016/j.traci.2017.06.013.
8. Choi E., Nichol J., Hokom M., et al. Platelets generated in vitro from proplatelet-displaying human megakaryocytes are functional. *Blood*. 1995; 85(2): 402–13.
9. Iancu-Rubin C., Hoffman R., Migliaccio A.R. Whirling platelets away for transfusion. *Cell*. 2018; 174(3): 503–4. DOI: 10.1016/j.cell.2018.07.018.
10. Sim X., Poncz M., Gadue P., French D.L. Understanding platelet generation from megakaryocytes: implications for in vitro-derived platelets. *Blood*. 2016; 127(10): 1227–33. DOI: 10.1182/blood-2015-08-607929.
11. Gollomp K., Lambert M.P., Poncz M. Current status of blood ‘pharming’: Megakaryocyte transfusions as a source of platelets. *Curr Opin Hematol*. 2017; 24(6): 565–71. DOI: 10.1097/MOH.0000000000000378.
12. Lambert M.P., Sullivan S.K., Fuentes R., et al. Challenges and promises for the development of donor-independent platelet transfusions. *Blood*. 2013; 121(17): 3319–24. DOI: 10.1182/blood-2012-09-455428.
13. Nurhayati R.W., Ojima Y., Taya M. Recent developments in ex vivo platelet production. *Cytotechnology*. 2016; 68(6): 2211–21. DOI: 10.1007/s10616-016-9963-4.
14. Wang Y., Hayes V., Jarocha D., et al. Comparative analysis of human ex vivo generated platelets vs megakaryocyte-generated platelets in mice: A cautionary tale. *Blood*. 2015; 125(23): 3627–36. DOI: 10.1182/blood-2014-08-593053.
15. Strassel C., Gachet C., Lanza F. On the way to in vitro platelet production. *Front Med*. 2018; 5: 239. DOI: 10.3389/fmed.2018.00239.
16. Sugimoto N., Eto K. Platelet production from induced pluripotent stem cells. *J Thromb Haemost*. 2017; 15(9): 1717–27. DOI: 10.1111/jth.13736.
17. Moreau T., Evans A.L., Vasquez L., et al. Large-scale production of megakaryocytes from human pluripotent stem cells by chemically defined forward programming. *Nat Commun*. 2016; 7: 11208. DOI: 10.1038/ncomms11208.
18. Liu Y., Wang Y., Gao Y., et al. Efficient generation of megakaryocytes from human induced pluripotent stem cells using Food and Drug Administration-approved pharmacological reagents. *Stem Cells Transl Med*. 2015; 4(4): 309–19. DOI: 10.5966/sctm.2014-0183.
19. Börger A.K., Eicke D., Wolf C., et al. Generation of HLA-universal iPSC-derived megakaryocytes and platelets for survival under refractoriness conditions. *Mol Med*. 2016; 22: 274–85. DOI: 10.2119/molmed.2015.00235.
20. Feng Q., Shabrani N., Thon J.N. et al. Scalable generation of universal platelets from human induced pluripotent stem cells. *Stem Cell Reports*. 2014; 3(5): 817–31. DOI: 10.1016/j.stemcr.2014.09.010.

References

1. Grozovsky R., Giannini S., Falet H., Hoffmeister K.M. Regulating billions of blood platelets: Glycans and beyond. *Blood*. 2015; 126(16): 1877–84. DOI: 10.1182/blood-2015-01-569129.
2. Lam F.W., Vijayan K.V., Rumbaut R.E. Platelets and their interactions with other immune cells. *Compr Physiol*. 2015; 5(3): 1265–80. DOI: 10.1002/cphy.c140074.
3. Sidorov S.K., Chemodanov I.G., Aiupova R.F., Kozhemyako O.V., et al. Standards and individual approaches in clinical transfusion medicine. *Transfusiologiya*. 2017; 2(18): 55–66. (In Russian).
4. Zarubin M.V., Malykh T.N., Kursanov M.V., Verevkin L.N., et al. Management of blood donor: Platelet pooling. *Manager zdravoochraneniya*. 2016; (2): 29–34. (In Russian).
5. Zarubin M.V., Zaznobov M.E., Kurnosov N.V., et al. Managing platelets bank in the regional blood supply service. *Kazanskiy meditsinskiy journal*. 2015; 96(3): 407–13. DOI: 10.17750/KMJ2015-407. (In Russian).
6. Frazier S.K., Higgins J., Bugajski A., et al. Adverse reactions to transfusion of blood products and best practices for prevention. *Crit Care Nurs Clin North Am*. 2017; 29(3): 271–90. DOI: 10.1016/j.cnc.2017.04.002.
7. DiBuduo C.A., Kaplan D.L., Balduini A. In vitro generation of platelets: Where do we stand? *Transfusion*. 2017; 24(3): 273–6. DOI: 10.1016/j.traci.2017.06.013.
8. Choi E., Nichol J., Hokom M., et al. Platelets generated in vitro from proplatelet-displaying human megakaryocytes are functional. *Blood*. 1995; 85(2): 402–13.
9. Iancu-Rubin C., Hoffman R., Migliaccio A.R. Whirling platelets away for transfusion. *Cell*. 2018; 174(3): 503–4. DOI: 10.1016/j.cell.2018.07.018.
10. Sim X., Poncz M., Gadue P., French D.L. Understanding platelet generation from megakaryocytes: implications for in vitro-derived platelets. *Blood*. 2016; 127(10): 1227–33. DOI: 10.1182/blood-2015-08-607929.
11. Gollomp K., Lambert M.P., Poncz M. Current status of blood ‘pharming’: Megakaryocyte transfusions as a source of platelets. *Curr Opin Hematol*. 2017; 24(6): 565–71. DOI: 10.1097/MOH.0000000000000378.
12. Lambert M.P., Sullivan S.K., Fuentes R., et al. Challenges and promises for the development of donor-independent platelet transfusions. *Blood*. 2013; 121(17): 3319–24. DOI: 10.1182/blood-2012-09-455428.
13. Nurhayati R.W., Ojima Y., Taya M. Recent developments in ex vivo platelet production. *Cytotechnology*. 2016; 68(6): 2211–21. DOI: 10.1007/s10616-016-9963-4.
14. Wang Y., Hayes V., Jarocha D., et al. Comparative analysis of human ex vivo generated platelets vs megakaryocyte-generated platelets in mice: A cautionary tale. *Blood*. 2015; 125(23): 3627–36. DOI: 10.1182/blood-2014-08-593053.
15. Strassel C., Gachet C., Lanza F. On the way to in vitro platelet production. *Front Med*. 2018; 5: 239. DOI: 10.3389/fmed.2018.00239.
16. Sugimoto N., Eto K. Platelet production from induced pluripotent stem cells. *J Thromb Haemost*. 2017; 15(9): 1717–27. DOI: 10.1111/jth.13736.
17. Moreau T., Evans A.L., Vasquez L., et al. Large-scale production of megakaryocytes from human pluripotent stem cells by chemically defined forward programming. *Nat Commun*. 2016; 7: 11208. DOI: 10.1038/ncomms11208.
18. Liu Y., Wang Y., Gao Y., et al. Efficient generation of megakaryocytes from human induced pluripotent stem cells using Food and Drug Administration-approved pharmacological reagents. *Stem Cells Transl Med*. 2015; 4(4): 309–19. DOI: 10.5966/sctm.2014-0183.
19. Börger A.K., Eicke D., Wolf C., et al. Generation of HLA-universal iPSC-derived megakaryocytes and platelets for survival under refractoriness conditions. *Mol Med*. 2016; 22: 274–85. DOI: 10.2119/molmed.2015.00235.
20. Feng Q., Shabrani N., Thon J.N. et al. Scalable generation of universal platelets from human induced pluripotent stem cells. *Stem Cell Reports*. 2014; 3(5): 817–31. DOI: 10.1016/j.stemcr.2014.09.010.

21. Rezanejad H., Matin M.M. Induced pluripotent stem cells: Progress and future perspectives in the stem cell world. *Cell Reprogram.* 2012; 14(6): 459–70. DOI: 10.1089/cell.2012.0039.
22. Poulos J. The limited application of stem cells in medicine: A review. *Stem Cell Res Ther.* 2018; 9(1): 1. DOI: 10.1186/s13287-017-0735-7.
23. Nakamura S., Takayama N., Hirata S., et al. Expandable megakaryocyte cell lines enable clinically applicable generation of platelets from human induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell.* 2014; 14(4): 535–48. DOI: 10.1016/j.stem.2014.01.011.
24. van den Oudenrijn S., von dem Borne A., de Haas M. Differences in megakaryocyte expansion potential between CD34⁺ stem cells derived from cord blood, peripheral blood, and bone marrow from adults and children. *Exp Hematol.* 2000; 28(9): 1054–61. DOI: 10.1016/s0301-472x(00)00517-8.
25. Fong H., Mosoyan G., Patel A., et al. Preclinical development of a cryopreservable megakaryocyte cell product from cord blood derived hematopoietic stem cells. *Blood.* 2016; 59(12): 3698–3713. DOI: 10.1182/blood.V128.22.3859.3859.
26. Bertolini F., Battaglia M., Pedrazzoli P., et al. Megakaryocytic progenitors can be generated ex vivo and safely administered to autologous peripheral blood progenitor cell transplant recipients. *Blood.* 1997; 89(8): 2679–88.
27. Xi J., Zhu H., Liu D., et al. Infusion of megakaryocytic progenitor products generated from cord blood hematopoietic stem/progenitor cells: Results of the phase 1 study. *PLoS One.* 2013; 8(2): e54941 DOI: 10.1371/journal.pone.0054941.
28. Kumar P.S., Chandrasekhar C., Srikanth L., Sarma P.V.G.K. In vitro large scale production of megakaryocytes to functional platelets from human hematopoietic stem cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2018; 505(1): 168–75. DOI: 10.1016/j.bbrc.2018.09.090.
29. Vizoso F.J., Eiro N., Cid S., et al. Mesenchymal stem cell secretome: Toward cell-free therapeutic strategies in regenerative medicine. *Int J Mol Sci.* 2017; 18(9): 1852. DOI: 10.3390/ijms18091852.
30. Lin H.D., Bongso A., Gauthaman K., et al. Human wharton's jelly stem cell conditioned medium enhances freeze-thaw survival and expansion of cryopreserved CD34⁺ cells. *Stem Cell Rev Rep.* 2013; 9(2): 172–83. DOI: 10.1007/s12015-013-9426-7.
31. Wang J.F., Wang L.J., Wu Y.F., et al. Mesenchymal stem/progenitor cells in human umbilical cord blood as support for ex vivo expansion of CD34(+) hematopoietic stem cells and for chondrogenic differentiation. *Haematologica.* 2004; 89(7): 837–44.
32. Jang Y.K., Jung D.H., Jung M.H., et al. Mesenchymal stem cells feeder layer from human umbilical cord blood for ex vivo expanded growth and proliferation of hematopoietic progenitor cells. *Ann Hematol.* 2006; 85(4): 212–25. DOI: 10.1007/s00277-005-0047-3.
33. Khoury M., Drake A., Chen Q., et al. Mesenchymal stem cells secreting angiopoietin-like-5 support efficient expansion of human hematopoietic stem cells without compromising their repopulating potential. *Stem Cells Dev.* 2011; 20(8): 1371–81. DOI: 10.1089/scd.2010.0456.
34. R Core Team (2019). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <https://www.R-project.org>
35. Kumar P., Kandoi S., Misra R., et al. The mesenchymal stem cell secretome: A new paradigm towards cell-free therapeutic mode in regenerative medicine. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2019; 46: 1–9. DOI: 10.1016/j.cytogfr.2019.04.002.
36. Tamma R., Ribatti D. Bone niches, hematopoietic stem cells, and vessel formation. *Int J Mol Sci.* 2017; 18(1): 151. DOI: 10.3390/ijms18010151.
37. Geddis A.E. Megakaryocytopoiesis. *Semin Hematol.* 2010; 47(3): 212–9. DOI: 10.1053/j.seminhematol.2010.03.001.
21. Rezanejad H., Matin M.M. Induced pluripotent stem cells: Progress and future perspectives in the stem cell world. *Cell Reprogram.* 2012; 14(6): 459–70. DOI: 10.1089/cell.2012.0039.
22. Poulos J. The limited application of stem cells in medicine: A review. *Stem Cell Res Ther.* 2018; 9(1): 1. DOI: 10.1186/s13287-017-0735-7.
23. Nakamura S., Takayama N., Hirata S., et al. Expandable megakaryocyte cell lines enable clinically applicable generation of platelets from human induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell.* 2014; 14(4): 535–48. DOI: 10.1016/j.stem.2014.01.011.
24. van den Oudenrijn S., von dem Borne A., de Haas M. Differences in megakaryocyte expansion potential between CD34⁺ stem cells derived from cord blood, peripheral blood, and bone marrow from adults and children. *Exp Hematol.* 2000; 28(9): 1054–61. DOI: 10.1016/s0301-472x(00)00517-8.
25. Fong H., Mosoyan G., Patel A., et al. Preclinical development of a cryopreservable megakaryocyte cell product from cord blood derived hematopoietic stem cells. *Blood.* 2016; 59(12): 3698–3713. DOI: 10.1182/blood.V128.22.3859.3859.
26. Bertolini F., Battaglia M., Pedrazzoli P., et al. Megakaryocytic progenitors can be generated ex vivo and safely administered to autologous peripheral blood progenitor cell transplant recipients. *Blood.* 1997; 89(8): 2679–88.
27. Xi J., Zhu H., Liu D., et al. Infusion of megakaryocytic progenitor products generated from cord blood hematopoietic stem/progenitor cells: Results of the phase 1 study. *PLoS One.* 2013; 8(2): e54941 DOI: 10.1371/journal.pone.0054941.
28. Kumar P.S., Chandrasekhar C., Srikanth L., Sarma P.V.G.K. In vitro large scale production of megakaryocytes to functional platelets from human hematopoietic stem cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2018; 505(1): 168–75. DOI: 10.1016/j.bbrc.2018.09.090.
29. Vizoso F.J., Eiro N., Cid S., et al. Mesenchymal stem cell secretome: Toward cell-free therapeutic strategies in regenerative medicine. *Int J Mol Sci.* 2017; 18(9): 1852. DOI: 10.3390/ijms18091852.
30. Lin H.D., Bongso A., Gauthaman K., et al. Human wharton's jelly stem cell conditioned medium enhances freeze-thaw survival and expansion of cryopreserved CD34⁺ cells. *Stem Cell Rev Rep.* 2013; 9(2): 172–83. DOI: 10.1007/s12015-013-9426-7.
31. Wang J.F., Wang L.J., Wu Y.F., et al. Mesenchymal stem/progenitor cells in human umbilical cord blood as support for ex vivo expansion of CD34(+) hematopoietic stem cells and for chondrogenic differentiation. *Haematologica.* 2004; 89(7): 837–44.
32. Jang Y.K., Jung D.H., Jung M.H., et al. Mesenchymal stem cells feeder layer from human umbilical cord blood for ex vivo expanded growth and proliferation of hematopoietic progenitor cells. *Ann Hematol.* 2006; 85(4): 212–25. DOI: 10.1007/s00277-005-0047-3.
33. Khoury M., Drake A., Chen Q., et al. Mesenchymal stem cells secreting angiopoietin-like-5 support efficient expansion of human hematopoietic stem cells without compromising their repopulating potential. *Stem Cells Dev.* 2011; 20(8): 1371–81. DOI: 10.1089/scd.2010.0456.
34. R Core Team (2019). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <https://www.R-project.org>
35. Kumar P., Kandoi S., Misra R., et al. The mesenchymal stem cell secretome: A new paradigm towards cell-free therapeutic mode in regenerative medicine. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2019; 46: 1–9. DOI: 10.1016/j.cytogfr.2019.04.002.
36. Tamma R., Ribatti D. Bone niches, hematopoietic stem cells, and vessel formation. *Int J Mol Sci.* 2017; 18(1): 151. DOI: 10.3390/ijms18010151.
37. Geddis A.E. Megakaryocytopoiesis. *Semin Hematol.* 2010; 47(3): 212–9. DOI: 10.1053/j.seminhematol.2010.03.001.

38. Kaushansky K. Determinants of platelet number and regulation of thrombopoiesis. Hematology Am Soc Hematol Educ Program. 2009; 147–52. DOI: 10.1182/asheducation-2009.1.147.

Информация об авторах

Ключников Дмитрий Юрьевич*, биолог лаборатории иммунологического типирования, ГБУЗ «Самарский областной медицинский центр Династия»,
e-mail: dmkyu@gmail.com
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4934-5619>

Языкова Марина Юрьевна, доктор биологических наук, профессор кафедры биохимии, биотехнологии и биоинженерии, ФГАОУ ВО «Самарский национальный исследовательский университет им. академика С.П. Королева»,
e-mail: yazykovasamgu@mail.ru
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1085-634X>

Александр Александрович Степанов, научный сотрудник, ФГБНУ «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича»,
e-mail: aleks.a.stepanov@gmail.com
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9113-9440>

Волчков Станислав Евгеньевич, кандидат медицинских наук, заместитель директора по контролю качества, ГБУЗ «Самарский областной медицинский центр Династия», e-mail: quality@cordbank.ru
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2569-9394>

Тюмина Ольга Владимировна, доктор медицинских наук, профессор кафедры госпитальной терапии ФГБОУ ВО «СамГМУ» Минздрава России, директор ГБУЗ «Самарский областной медицинский центр Династия»,
e-mail: centr123@bk.ru
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5608-1925>

* Автор, ответственный за переписку

Поступила: 17.12.2020

Принята в печать: 11.10.2021

38. Kaushansky K. Determinants of platelet number and regulation of thrombopoiesis. Hematology Am Soc Hematol Educ Program. 2009; 147–52. DOI: 10.1182/asheducation-2009.1.147.

Information about the authors

Dmitry Y. Klyuchnikov*, Biologist at the Tissue Typing Laboratory, Medical Centre Dynasty,
e-mail: dmkyu@gmail.com
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4934-5619>

Marina Y. Yazykova, Dr. Sci. (Biol.), Professor of the Department of Biochemistry, Biotechnology and Bioengineering, Samara National Research University,
e-mail: yazykovasamgu@mail.ru
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1085-634X>

Alexander A. Stepanov, Scientific Researcher, Institute of Biomedical Chemistry,
e-mail: aleks.a.stepanov@gmail.com
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9113-9440>

Stanislav E. Volchkov, Cand. Sci. (Med.), Deputy Director, Medical Centre Dynasty,
e-mail: quality@cordbank.ru
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2569-9394>

Olga V. Tyumina, Dr. Sci. (Med.), Professor at the Hospital Therapy Dept. of FSBEI HE SamSMU, Director of Medical Centre Dynasty,
e-mail: centr123@bk.ru
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5608-1925>

* Corresponding author

Received 17.12.2020

Accepted 11.10.2021