

Генерация мегакариоцитов из образцов костного мозга как диагностический и исследовательский метод: разработка и валидация.

Научный руководитель – Пантелеев Михаил Александрович

Михалкин Н.Б.¹, Бутов К.Р.², Хорева А.Л.³, Осипова Е.Ю.⁴, Тутов Н.С.⁵, Шальнева Д.В.⁶

1 - Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова, Москва, Россия, *E-mail: mikhanik00@gmail.com*; 2 - Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова, Москва, Россия, *E-mail: krbutov@gmail.com*; 3 - Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова, Москва, Россия, *E-mail: kamushek2609@gmail.com*; 4 - Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, Биотехнологический факультет, Москва, Россия, *E-mail: hirobrine26@mail.ru*; 5 - Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова, Москва, Россия, *E-mail: nikitasergeevichpochta@gmail.com*; 6 - Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова, Москва, Россия, *E-mail: dariashal1999@gmail.com*

Дефекты мегакариоцитарного роста и продукции тромбоцитов — одна из самых частых причин тромбоцитопений у детей[2]. Количество мегакариоцитов (МК) в костном мозге не превышает 1%[1], что делает прямое выделение клеток непрактичным. Опубликованные методы продукции МК сложны и требуют больших объемов биоматериала для инициации культуры[3]. Таким образом, необходим адаптированный метод экспансии первичных МК для эффективного изучения их физиологии.

Целью исследования является разработка метода экспансии МК из малых объемов педиатрических образцов костного мозга (КМ), получаемых рутинно для диагностических исследований в клинике.

В экспериментах были использованы минимальные объемы (~0,3-0.5 мл) образцов аспирационной биопсии КМ педиатрических пациентов в ремиссии ОЛЛ, получающих лечение различными цитостатиками (n=3), и поддерживающую терапию (n=3). Мононуклеарные клетки изолировались на градиенте плотности с Lymphopure-H (Cedarline) по протоколу производителя. Культивирование осуществлялось в питательной среде IMDM со стабильным глутамином GlutaMAX (Gibco), обогащенной фетальной бычьей сывороткой (FBS) (10%), пенициллином-стрептомицином (1%), в течение 14 дней в CO₂-инкубаторе (37 °C, 5% CO₂). Для стимуляции дифференцировки применялась смесь рекомбинантных цитокинов: тромбопоэтин (ТРО), интерлейкина-6 (IL-6) и фактора стволовых клеток (SCF). Анализ клеток производился с помощью проточной цитофлуориметрии, иммунофлуоресцентной (ИФ) и дифференциальной интерференционно-контрастной микроскопии.

В первые 3-4 дня наблюдалась активная пролиферация с увеличением CD34+ событий с 5-7% до 13-15% в среднем. В последующем отмечалось нарастание больших CD41+CD42b+ событий до 30-35% от всех клеток. В среднем, плоидность половины CD41+ составляла >4N. Результаты между группами пациентов значительных отличий не показали. При изоляции на градиенте плотности FBS в 14 день количество CD41+ клеток возросло до 70%. При ИФ конфокальной микроскопии визуализировались относительно большие CD41+CD62p+ клетки с многодольчатыми ядрами. Прижизненная микроскопия в течение 12 часов показала ~3-5% МК в процессе генерации протромбоцитов.

Полученные результаты позволяют использовать культуры из малого объема образцов КМ для генерации полностью функциональных мегакариоцитов как перспективный метод изучения человеческих МК ex vivo и in vitro.

Источники и литература

- 1) Machlus, K.R., & Italiano, J.E. The incredible journey: From megakaryocyte development to platelet formation // *Journal of Cell Biology*, 2013, Volume 201, Issue 6, p. 785–796.
- 2) Smock, K.J., & Perkins, S.L. Thrombocytopenia: An update // *International Journal of Laboratory Hematology*, April 2014, Volume 36, Issue 3, p. 269–278.
- 3) Van Den Oudenrijn, S., Von Dem Borne, A.E.G.K., & 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 // *Experimental Hematology*, 2000, Volume 28, Issue 9, p. 1054–1061.