

ПОЛУЧЕНИЕ ТРОМБОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА В УСЛОВИЯХ EX VIVO

© 2015 Д.Ю.Ключников

Самарский областной центр планирования семьи и репродукции

Статья поступила в редакцию 26.10.2015

Клеточные технологии во всем мире развиваются очень быстрыми темпами. А недавние успехи в получении тромбоцитов человека из стволовых клеток обещают перспективу по созданию технологии для получения тромбоцитов в условиях ex vivo для клинического применения. Переливание тромбоцитов спасает миллионы жизней по всему миру, и необходимость в донорских тромбоцитах с каждым днем растет. Несмотря на все разработанные на сегодняшний день подходы, желаемого количества тромбоцитов получить пока не удалось. В данной статье предлагается обзор на недавние исследования и стратегии в этой области, обсуждаются трудности, с которыми сталкиваются, разработанные на сегодняшний день подходы, а также пути увеличения эффективности процесса по получению тромбоцитов человека в культуре. Несмотря на большую работу, которую еще только предстоит проделать в этой области, уже достигнут большой прогресс на пути к получению тромбоцитов человека в условиях ex vivo для клинического применения.

Ключевые слова: тромбоциты, мегакариоциты, мегакариоцитопоэз, тромбоцитопоэз, CD34+, гемопоэтические стволовые клетки, ГСК, получение тромбоцитов ex vivo, клеточные технологии.

Введение. Технологии с использованием стволовых клеток в настоящее время развиваются быстрыми темпами. Некоторые из них уже проходят клинические испытания в области регенеративной медицины, разработаны стратегии для лечения рефрактерного язвенного колита, инфаркта миокарда, гепатокарциномы, коленного остеоартрита¹, заболеваний печени с использованием стволовых клеток², восстановления зубов³. В то же время использование стволовых клеток для получения тромбоцитов может восполнить растущую необходимость в них в клинике.

В РФ состояние донорства компонентов крови является достаточно сложным. По данным на 2011 г. показатель числа доноров на 1000 человек населения в среднем по России не превышал 13,5,

в то время как по Европе достигал 40. Важно отметить, что кроме традиционного использования компонентов крови в хирургической, акушерской, педиатрической, онкологической и гематологической практике, в последние годы развивается необходимость в обеспечении высокотехнологичных медицинских методов лечения, таких, как, например, трансплантация гемопоэтических стволовых клеток, часто сопровождающейся тяжелыми тромбоцитопениями вследствие перенесенной высокодозной химиотерапии⁴. Эти методы все шире внедряются в практику, что также сопряжено с увеличением потребности в донорской крови и ее компонентах, в том числе и тромбоцитах⁵.

Возможность получения тромбоцитов человека из стволовых клеток для клинического применения в связи с этим вызывает большой интерес, особенно в последние годы. Первые успехи в получении тромбоцитов из стволовых клеток пу-

^о Ключников Дмитрий Юрьевич, биолог.

E-mail: dmkyu@gmail.com

¹ Dusko, I. Latest developments in the field of stem cell research and regenerative medicine compiled from publicly available information and press releases from nonacademic institutions from March 1, 2014 until April 30, 2014 / I.Dusko // Regenerative Medicine. 2014. Vol. 9 (4). – P. 417 – 422.

² Rashid, T. Novel strategies for liver therapy using stem cells / T.Rashid, T.Takebe, H.Nakauchi // Gut. 2014. – P.1 – 4.

³ Arany, P.R. Photoactivation of endogenous latent transforming growth factor-β1 directs dental stem cell differentiation for regeneration / P.R.Arany, A.Cho, T.D.Hunt, G.Sidhu, K.Shin, E.Hahm, G.X.Huang, J.Weaver, A.C.Chen, B.L.Padwa, M.R.Hamblin, M.H.Barcellos-Hoff, A.B.Kulkarni, J.D.Mooney // Sci Transl Med. 2014. Vol. 6 (238). – P. 238 – 269.

⁴ Gluckman, E. Current status of umbilical cord blood hematopoietic stem cell transplantation / E.Gluckman // Experimental Hematology. 2000. Vol. 28. – P. 1197 – 1205.

⁵ Селиванов, Е.А. Современные проблемы донорства в Российской Федерации / Е.А.Селиванов, С.С.Бесмельцев, И.Г.Дуткевич, Т.Н.Данилова, В.А.Лаврова, А.В.Чечеткин, В.К.Красняков, Л.В.Щелкунова, И.Н.Дегтерева, М.Ш.Григорьян // Вестник службы крови России. – 2011. – № 1. – С. 5 – 14; Погорелов, В.М. Регенераторный ответ тромбоцитопоэза у доноров тромбоцитов (обзор литературы) / В.М.Погорелов, В.Ю.Уфимцева, Б.М.Уртаев, Г.И.Козинец // Вестник службы крови России. – 2012. – № 2. – С. 55 – 63.

винной крови были достигнуты еще 8 лет назад⁶, и несмотря на то, что количество тромбоцитов и их выход оказался недостаточным для применения для клинических целей, была доказана сама принципиальная возможность разработки подобной технологии. Создание условий для высокоэффективного получения тромбоцитов человека является главной задачей в этой области на сегодняшний день. И для ее решения требуется более полное понимание самих процессов экспансии ГСК, дифференцировки в мегакариоциты, их созревания, а также образования протромбоцитов и высвобождение тромбоцитов.

Созревание мегакариоцитов. В процессе своего созревания ГСК дифференцируются в общие миелоидные предшественники (ОМП) и бипотенциальные мегакариоцитарно-эритроидные предшественники (МЭП), которые дают начало как мегакариоцитарной, так и эритроцитарной линии в костном мозге. Регуляция дальнейшего пути дифференцировки МЭП определяется множеством транскрипционных факторов, включая Runx1, Gata1, Fli1 и c-Myb. Экспрессия c-Myb в МЭП предполагает их дифференцировку в эритроцитарную линию, и наоборот его экспрессия подавляется при дифференцировке в мегакариоцитарную. Gata1 и его ко-фактор Fog1 играют важные роли в процессе дифференцировки в мегакариоцитарно-эритроидном направлении, в то же самое время ингибируя экспрессию Pu.1 и миелоидную дифференцировку. Действие Runx1 опосредовано через Gata1 и Fli1, чьи сайты связывания могут быть обнаружены в энхансерах многих специфичных для мегакариоцитов генах. При этом Fli1 увеличивает активность Gata1 в промоторах мегакариоцитов и угнетает активность эритроидных факторов в эритроидных промоторах⁷.

Следует отметить, что одним из важнейших агентов в процессе мегакариопоэза является тромбopoэтин (ТПО). ТПО (также известный как c-Mpl лиганд) – гликопротеин, который взаимодействует с c-Mpl рецептором, стимулируя пролиферацию и созревание мегакариоцитов, а так-

же он играет важную роль в поддержании и пролиферации ГСК⁸.

Сам процесс созревания мегакариоцитов начинается в остеобластной нише стволовых клеток. В процессе созревания мегакариоциты покидают нишу стволовых клеток посредством негативной регуляции поверхностных рецепторов и попадают в периваскулярную нишу. Интересно, что ниша стволовых клеток и периваскулярная ниша могут и не быть физически разделены. Предполагается, что изменяются взаимодействия мегакариоцитов и ниши. Отличительными признаками созревания мегакариоцитов являются эндорепликация (полиплоидизация) и увеличение массы цитоплазмы. Размер зрелых мегакариоцитов увеличивается до 100 – 150 мкм в диаметре (это самые крупные крупные гемопоэтические клетки в костном мозге), а пloidность до 128N. Следует отметить, что существует корреляция между уровнем пloidности и количеством образующихся тромбоцитов⁹.

Образование тромбоцитов. До недавнего времени существовало две модели объясняющие процесс образования тромбоцитов из мегакариоцитов. В фрагментационной модели, мегакариоциты мигрируют из костного мозга в легкие, где в микроциркуляционных частях сосудистого русла разламываются на тромбоциты. В альтернативной модели, которая на сегодняшний день подтверждена экспериментально, мегакариоциты образуют огромное количество ветвей (протромбоцитов) внутри сунусоидов костного мозга, которые высвобождают тромбоциты в кровяное русло¹⁰.

Протромбоциты образуются из выростов цитоплазмы мегакариоцитов, оканчивающихся выпуклостями размером с тромбоцит. А сами мембраны протромбоцитов образуются из системы демаркационных мембран, которые являются огромным впячиванием мембраны мегакариоцита на всем протяжении ее поверхности. Протяженность системы демаркационных мембран коррелирует с количеством протромбоцитов образующихся с мегакариоцита. Микротрубочки запускают элонгацию, а актин и миозин содействуют транспорту органелл по стволу протромбоцитов для формирования тромбоцитов, в это время актин запускает еще и ветвление протромбоцитов.

⁶ Matsunaga, T. Ex vivo large-scale generation of human platelets from cord blood CD34+ cells / T.Matsunaga, I.Tanaka, M.Kobune, Y.Kawano, M.Tanaka, K.Kuribayashi, S.Iyama, T.Sato, Y.Sato, R.Takimoto, T.Takayama, J.Kato, T.Ninomiya, H. Hamada, Y.Niitsu // Stem Cells. – 2006. – Vol. 24(12). – P. 287.

⁷ Geddis, A.E. Megakaryopoiesis / A.E.Geddis // Semin Hematol. – 2010. Vol. 47(3). – P. 212 – 219.

⁸ Deutsch, V.R. Megakaryocyte development and platelet production / V.R.Deutsch, A.Tomer // Br J Haematol. 2006. Vol. 134(5). – P. 453 – 466.

⁹ Geddis, A.E. Megakaryopoiesis – P. 212 – 219; Deutsch, V.R. Megakaryocyte development and platelet production – P. 453 – 466.

¹⁰ Geddis, A.E. Megakaryopoiesis – P. 212 – 219.

Предполагается, что ветвление увеличивает количество тромбоцитов образуемое мегакариоцитом¹¹. Зрелость мегакариоцитов и уровень полиплоидизации играют важную роль в количестве образованных тромбоцитов на клетку. Микроокружение периваскулярной ниши обеспечивает внешние стимулы, включая фибронектин, фибриноген и Фактор фон Виллебранда, необходимые для индукции тромбоцитообразования. Однако конечный триггер заставляющий мегакариоциты образовывать протромбоциты не известен. Несмотря на то, что связь протромбоцитообразования и апоптоза пока не ясна, апоптоз также может играть в этом процессе важную роль.

Еще одним важным компонентом в конечном образовании тромбоцитов является механическое раздражение внутри синусоидальных сосудов костного мозга. Оно может индуцировать цитоплазматическую элонгацию и отделение тромбоцитов, совместно с белками внеклеточного матрикса¹². Существуют работы, демонстрирующие возможность размножения тромбоцитов *in vitro*. Эти исследования показывают возможность размножения тромбоцитов человека при условии помещения их с суспендирующую среду аутоплазмы и специальных сред¹³. Несмотря на то, что данные исследования требуют подтверждения, подобные работы также могут приблизить к реальности возможность *ex vivo* получения тромбоцитов человека для клинического применения.

Источники стволовых клеток. Существует несколько источников стволовых клеток, которые могут быть использованы для получения тромбоцитов в культуре. Каждый из них имеет свои преимущества и недостатки в отношении количества клеток, функциональности конечного продукта и регламентирующих отношений. ГСК (номинально CD34+), возможно, технологически самый простой материал для получения тромбоцитов. Они могут быть выделены из пуповинной и периферической крови, а также из костного мозга.

Несмотря на то, в единице пуповинной крови (ЕПК) содержится наименьшее по сравнению с другими источниками ГСК, именно этот источник является наиболее популярным. К примеру, одна ЕПК содержит порядка 1×10^6 ГСК, в то время как одна доза тромбоцитов, полученная при аферезе, содержит минимум 3×10^{11} тромбоцитов. Таким образом, для того чтобы получить одну дозу тромбоцитов *ex vivo* необходима 3×10^5 -тикратная экспансия. Каждый мегакариоцит в костном мозге способен образовывать минимум 1×10^5 тромбоцитов, и для получения эквивалентного количества тромбоцитов требуется 3×10^8 мегакариоцитов в костном мозге. Таким образом, 1×10^6 ГСК из одной ЕПК потребует дифференцировать в 3×10^8 полностью зрелых мегакариоцитов, которые должны будут образовать 3×10^{11} тромбоцитов для получения всего одной дозы тромбоцитов¹⁴. Нарращивание общего количества ГСК перед дифференцировкой в мегакариоциты преследует цель повысить их конечный выход. Были разработаны некоторые подходы для увеличения количества гемопоэтических прогениторных клеток более, чем в 100 раз, первоначально связанные с использованием пуповинной крови для снижения время приживления¹⁵.

Достигнутые успехи. Технологии по получению тромбоцитов в условиях *ex vivo* активно развиваются по всему миру. Большинство из них основано на использовании в качестве индукторов цитокинов, таких как ТПО, ИЛ-3, ИЛ-6, ИЛ-9, ИЛ-11, фактор стволовых клеток, гомолога фактора стволовых клеток и колониестимулирующего фактора 1 – Flt3 лиганда, а также некоторых других цитокинов (например, пегилированного рекомбинантного фактора роста мегакариоцитов – PEG-rHuMGDF и ингибитора семейства киназ Src – SU6656) и добавок. В некоторых стратегиях прибегают к использованию некоторых микроРНК, которые в норме высоко экспрессируются в мегакариоцитах, для увеличения эффективности образования тромбоцитов *ex vivo*¹⁶. Было доказано,

¹¹ Patel, S.R. Differential roles of microtubule assembly and sliding in proplatelet formation by megakaryocytes / S.R.Patel, J.L. Richardson, H.Schulze, E.Kahle, N.Galjart, K.Drabek, R.A.Shivdasani, J.H.Hartwig, J.E. Italiano // Blood. – 2005. – Vol. 106(13). – P. 4076 – 4085.

¹² Dunois-Lardé, C. Exposure of human megakaryocytes to high shear rates accelerates platelet production / C.Dunois-Lardé, C.Capron, S.Fichelson, T.Bauer, E.Cramer-Bordé, D.Baruch // Blood. – 2009. – Vol. 114(9). – P. 1875 – 1883.

¹³ Малыш, П.Н. Размножаются ли тромбоциты *in vitro*? / П.Н.Малыш, С.А.Кондрашев, Е.В.Фролова, В.Я.Гусакова, Н.Б.Щеголева, В.Р.Саргсян, Л.П.Маснева // Мир медицины и биологии. – 2011. – Т. 7, вып. 3. – С. 16 – 21.

¹⁴ Avanzi, M.P. Ex vivo production of platelets from stem cells / M.P.Avanzi, W.B.Mitchell // Br J Haematol. – 2014. – Vol. 165(2). – P. 237 – 247.

¹⁵ Айзенштадт, А.А. Современные проблемы культивирования гемопоэтических стволовых клеток пуповинной крови для трансплантации в онкогематологии и их решение / А.А.Айзенштадт, В.В.Багаева, А.С.Хрупина, Е.Ю.Кананыхина, Д.А.Иволгин, А.Б.Смолянинов // Вестник СЗГМУ им. И.И.Мечникова. – 2012. – Т. 4, вып. 4. – С. 12 – 18.

¹⁶ Emmrich, S. miRNAs can increase the efficiency of *ex vivo* platelet generation / S.Emmrich, K.Henke, J.Hegermann, M.Ochs, D.Reinhardt, J.H.Klusmann // Ann Hematol. – 2012. – Vol.91(11). – P. 1673 – 1684.

что miR-125b и miR-660 позитивно влияют на выход мегакариоцитов и тромбоцитов в культуре. Кроме того, существуют работы, в которых ГСК культивируются совместно со стромальными клетками, которые предположительно и должны обеспечивать необходимые для дифференцировки сигналы.

В большинстве работ по культивированию мегакариоцитов из ГСК не используют сыворотку, а заменяют ее цитокиновыми коктейлями или, например, такими заменителями как смесь бычьего сывороточного альбумина, инсулина и

трансферина для того, чтобы точно знать состав культуральной среды. Разрабатываемые подходы часто состоят из нескольких этапов культивирования, на первом из которых для увеличения конечного выхода мегакариоцитов и тромбоцитов предусматривается экспансия самих ГСК. В среднем продолжительность всего культивирования составляет около 14 суток в однофазных протоколах и 14 – 21 в двух- и трехфазных. Сводные данные по некоторым работам по получению мегакариоцитов и тромбоцитов в условиях *ex vivo* приведены в таблице.

Таб.1. Анализ источников по получению тромбоцитов человека из ГСК

Источник клеток	Использование сыворотки	Добавки и количество этапов			Период культивирования, дней	Выход мегакариоцитов на инициальную CD34+ клетку	Выход тромбоцитов на инициальную CD34+ клетку	Источник
		1	2	3				
Аферез, CD34+	Да	10% апластичной собачьей сыворотки, 8 – 12 дней	10% huAB плазма, 2 – 3 дня	-	11 – 15	-	-	[17]
Аферез и КМ, CD34+	Нет	IL-3, PEG-rHuMGDF	-	-	11 – 14	18	300*	[17]
ПК, CD34+	Нет	SCF, IL-3, TPO, 7 дней	TPO, 14 дней	-	21	-	-	[17]
ПК, CD34+	Нет	IL-6, SCF, FL, TPO; 7 дней	IL-6, SCF, FL, TPO; 10 дней	-	17	135	142**	[17]
Аферез, CD34+	Да	IL-1 β , IL-6, SCF, TPO;	-	-	21	-	-	[17]
КМ, CD34+/CD38low	Нет	IL-3, IL-6, SCF, TPO; 10 дней	TPO, SU6656; 6 дней	-	16	-	-	[17]
ПК, CD34+	Нет	Сокультивирование с hTERT + SCF, TPO, FL; 14 дней	Сокультивирование с hTERT + SCF, TPO, FL, IL-11; 14 дней	SCF, TPO, FL, IL-11; 5 дней	33	500	42000***	[17]
ПК, CD34+	Да	SCF, TPO, FL, IL-6; 2 – 3 дня	TPO, FL; 7 дней	TPO, SCF, IL-6, IL-9, SU6656; >11 дней	>21	-	20*	[17]
ПК, CD34+	Нет	SCF, TPO, IL-6, IL-9	-	-	14	-	-	[18]
ПК, CD34+	Нет	SCF, TPO, IL-6, IL-9/ TPO, FLT-3, SCF; 14/4 дня	-/ SCF, TPO, IL-6, IL-9; 10 дней	-	12 – 16	-	-	[19]

ПК, CD34+	Нет	SCF, TPO, IL-6, IL-9	-	-	14			[20]
ПК, CD34+	Нет	TPO, SCF, IL-6, IL-9 / TPO, SCF, FL, IL-6, IL-3, G-SCF / TPO, SCF, FL / TPO, SCF, FL, IL-6 / TPO, IL-3, FL, IL-6 / SCF, IL-3, FL, IL-6; 4 дня	SCF, TPO, IL-6, IL-9; 10 – 14 дней	-	14 – 18	-	-	[21]
Аферез, CD34+	Нет	TPO, SCF, IL-3, IL-6, IL-11; 5 дней	TPO, SCF, IL-3, IL-6, IL-11; 2 дня	TPO, SCF, IL-3, IL-6, IL-11; 6 дней	13	-	-	[22]
ПК и Аферез, CD34+	Нет	TPO, IL-3, протеогликаны, выделенные из голов лосося и хряща носовых перегородок китов Брайда	-	-	14	520	-	[23]

*CD41a+/CD41a-, **Количество тромбоцитов, активированных тромбином, *** CD41a+/CD42b+

Большой интерес вызывают недавние работы по получению тромбоцитов в биореакторах. Группа ученых под руководством Cedric Ghevaert разрабатывает технологии по культивированию стволовых клеток на трехмерных подложках (частицах) в биореакторах для увеличения эффективности технологии. Проводятся работы по культивированию мегакариоцитов в ячейках чиповых 2-х поточных биореакторов, в которых мегакариоциты зафиксированы и не могут покинуть свои ниши, но образуемы ими тромбоциты вымываются потоком среды.

При этом, как показывают результаты, количество полученных тромбоцитов получается больше, чем в стационарных системах примерно в 1,5 – 3,8 раза¹⁷. Следует отметить работу по использованию микроструйного биореактора из инертного полидиметилсилоксана с имитацией эндотелия и сосудистого канала. Мегакариоциты не могли пройти через отверстия в стенках искусственного эндотелия, в то время как протромбоциты могли и превращались в тромбоциты уже в русле имитирующем сосудистый кровоток. В этом биореакторе один мегакариоцит образовывал примерно 30 тромбоцитов¹⁸.

Трудности и ограничения технологии. Одной из больших трудностей, с которыми сталкиваются все без исключения предложенные подходы к получению тромбоцитов в культуре, является меньшая эффективность созревания мегакарио-

цитов и образование тромбоцитов. Полученные из стволовых клеток мегакариоциты обладают более низким уровнем полиплоидизации, и образуют, в конечном счете, количество тромбоцитов соизмеримое с мегакариоцитами периферической крови. А количество образуемых тромбоцитов напрямую зависит от уровня полиплоидизации мегакариоцита¹⁹. Пока неясно связано ли это с незрелостью гемопоэтического прогениторного компартмента или самопрограммированию мегакариоцитов.

В процессе полиплоидизации участвуют несколько метаболических путей. Первый, сигнальный миозиновый путь, который требуется для формирования борозды дробления и сократительного кольца (внутриклеточного комплекса, образованного нитями актина и миозина) в течение последних этапов цитокинеза. Ингибирование активности миозина во время клеточного деления позволяет мегакариоцитам реплицировать ДНК. Путь ROCK действует через MYLK3 и филламин и активирует как образование тонофибрилл, так и ламеллоподий. Ингибирование этого пути снижает миозиновую активацию и препятствует образованию сократительного кольца, что в целом заставляет мегакариоциты подвергаться эндомитозу. Доказано, что при определенных условиях культивирования ГСК на коллагеновых подложках, препятствующих митозу посредством нарушения образования борозды дробления при ингибировании пути ROCK (ингибирование миозина-II с помощью блебистатина) приводит к увеличению количества ме-

¹⁷ Nakagawa, Y. Production system of platelet from iPS cells by two-way flow bioreactor / Y.Nakagawa, S.Ikeda, T.Fukuda, F.Arai, S.Nakamura, K.Eto // Micro-NanoMechatronics and Human Science (MHS). 2012. – P. 178 – 181.

¹⁸ Thon, J.N. Platelet bioreactor-on-a-chip / J.N.Thon, L.Mazutis, S.Wu, J.L.Sylman, A.Ehrlicher, K.R.Machlus, Q.Feng, S.Lu, R.Lanza, K.B.Neeves, D.A.Weitz, J.E.Italiano // Blood. – 2014. – Vol.124 (12). – P. 1857 – 1867.

¹⁹ Mattia, G. Different ploidy levels of megakaryocytes generated from peripheral or cord blood CD34+ cells are correlated with different levels of platelet release / G.Mattia, F.Vulcano, L.Milazzo, A.Barca, G.Macioce, A.Giampaolo, H.J.Hassan // Blood. – 2002. – Vol. 99 (3). – P. 888 – 897.

гакариоцитов с высоким уровнем полиплоидизации сопоставимым с уровнем мегакариоцитов костного мозга в 3-10, а также к увеличению образованных тромбоцитов²⁰. Второй метаболический путь, который играет большую роль в процессе полиплоидизации мегакариоцитов, это путь с участием гена TP53, чья активность увеличивает синтез ДНК и полиплоидизацию. Культивирование ГСК с ингибитором ROCK и никотинамидом увеличивало плоидность и образование тромбоцитов еще больше. Также было показано, что киназы семейства Src ингибируют пролиферацию и дифференцировку мегакариоцитов. Соответственно, ингибирование этих киназ увеличивает полиплоидизацию мегакариоцитов и образование протромбоцитов, что продемонстрировано на линиях лейкемических клеток через путь Lyn / Fyn, а также ингибирование актиновой полимеризации²¹. Еще одним важным моментом является тот факт, что лишь небольшой процент мегакариоцитов, выращенных в культуре в действительности дает тромбоциты. В культуре обнаруживаются мегакариоциты с высокой степенью полиплоидизации, которые тем не менее не образуют протромбоциты.

Образование протромбоцитов у человека регулируется при участии белков внеклеточного матрикса. Мегакариоциты в нише стволовых клеток костного мозга ингибируются от образования протромбоцитов через взаимодействие с коллагеном I через GPVI и $\alpha\beta 1$ рецептор интегрин. Фибронектин 1 также играет роль на ранних этапах созревания мегакариоцитов в нишах стволовых клеток. Созревая, мегакариоциты покидают нишу стволовых клеток, следуя сигналам из периваскулярной ниши, в частности CXCL12. Так в периваскулярной нише мегакариоциты взаимодействуют с компонентами внеклеточного матрикса в частности с фактором Фон-Виллебранда и фибриногеном через GPIb-IX-V и $\alpha IIb\beta 3$ интегрин. Окружение периваскулярной ниши стимулирует образование протромбоцитов, возможно с помощью активации микротрубочек. Было обнаружено, что существует большая разница в образовании протромбоцитов в

ответ на каждый белок внеклеточного матрикса, что говорит о комплексности системы²².

Важнейшим вопросом остается вопрос о функциональности выращенных в культуре тромбоцитов. Как известно, тромбоциты играют важные роли в восстановлении стенок сосудов, процессе воспаления и др., и пока неясно какие из этих нормальных функций способны осуществить выращенные в культуре тромбоциты, а также насколько они все необходимы для полученных тромбоцитов. Около 60% полученных в культуре тромбоцитов экспрессируют CD62P в присутствии агонистов тромбина и АДФ²³. Есть данные о том, что большое количество полученных *ex vivo* тромбоцитов уже находятся в полуактивированном состоянии даже в отсутствии тромбина²⁴. Способность выращенных в культуре тромбоцитов человека к образованию сгустка можно узнать с помощью стандартной агрегометрии, однако для тестирования требуется слишком большое количество тромбоцитов.

Заключение. На пути к получению тромбоцитов в условиях *ex vivo* проделано уже немало работы, и эта тема продолжает очень активно изучаться в мире. Становится очевидным, что прогресс в этом направлении сделает тромбоциты, выращенные в культуре, реальным источником для клинического применения. Но, несмотря на такое бурное развитие на пути к получению достаточного для этого количества тромбоцитов человека стоит немало трудностей и нерешенных вопросов. Чтобы воплотить в жизнь подобную технологию требуется более точно изучить механизмы регуляции мегакариоцитопоэза: какие взаимодействия с нишей необходимы для созревания мегакариоцитов, какие и как именно метаболические пути участвуют в полиплоидизации, как, воздействуя через системы цитоскелета увеличить плоидность мегакариоцитов, какие белки внеклеточного матрикса индуцируют образование протромбоцитов, какие транскрипционные факторы могут быть использованы,

²⁰ *Avanzi, M.P.* Ex vivo production of platelets from stem cells – P. 237 – 247; *Shin, J.W.* Myosin-II inhibition and soft 2D matrix maximize multinucleation and cellular projections typical of platelet-producing megakaryocytes / *J.W.Shin, J.Swift, K.R.Spinler, D.E.Discher* // *Proc Natl Acad Sci USA.* – 2011. – Vol. 108(28). – P. 11458 – 1163.

²¹ *Avanzi, M.P.* Ex vivo production of platelets from stem cells – P. 237 – 247.

²² *Balduini, A.* Adhesive receptors, extracellular proteins and myosin IIA orchestrate proplatelet formation by human megakaryocytes / *A.Balduini, I.Pallotta, A.Malara, P.Lova, A.Pecci, G.Viarengo, C.L.Balduini, M.Torti* // *Thromb Haemost.* – 2008. – Vol. 6 (11). – P. 1900 – 1907.

²³ *Pallotta, I.* Three-dimensional system for the in vitro study of megakaryocytes and functional platelet production using silk-based vascular tubes / *I.Pallotta, M.Lovett, D.L.Kaplan, A.Balduini* // *Tissue Eng Part C Methods.* – 2011. Vol. 17(12). – P. 1223 – 1232.

²⁴ *Sullenbarger, B.* Prolonged continuous in vitro human platelet production using 3D scaffolds / *B.Sullenbarger, J.H.Bahng, R.Gruner, N.Kotov, L.C.Lasky* // *Exp Hematol.* – 2009. – Vol. 37(1). – P. 101 – 110.

и, наконец, способны ли тромбоциты к делению. Кроме того важным остается и вопрос о выборе материала и увеличении (наращивании) ГСК.

Ответы на все эти вопросы помогут увеличить эффективность получения тромбоцитов *ex vivo*. С другой стороны производство тромбоцитов должно быть четко рассчитано во времени для того, чтобы постоянно давать определенное количество продукта. Подобная система должна быть точно синхронизирована. Данных о сроках хранения и продолжительности жизни, полученных в культуре тромбоцитов пока нет, и предположительно, время на их использование ограничено 5 сутками. В связи с этим потребуются по-

строение определенных схем их использования. Не последними остаются также моменты о законодательном регулировании в использовании клеточных продуктов и их безопасности. Тромбоциты в этом плане выгодно отличаются от других клеток, по той причине, что не имеют ядра и способности к онкогенезу, и могут быть подвергнуты облучению перед использованием. Текущие успехи и огромный интерес показывают нам, что область развивается очень быстрыми темпами и вероятно уже в ближайшем будущем тромбоциты, полученные в культуре, станут альтернативой тромбоцитам, полученным от доноров.

EX VIVO HUMAN PLATELET PRODUCTION

© 2015 D.Y.Klyuchnikov^o

Samara Regional Center of Family Planning and Reproduction

Cell technologies are on the upswing around the world. And recent successes in the production of human platelets from stem cells are opening the prospect for development of the technology for *ex vivo* platelet production for clinic. Platelet transfusion saves millions of lives around the world and the needs for donor platelets are growing by the day. Despite all the developed strategies yet, the desired amount of platelets has not yet been achieved. In the present paper a review of recent studies of the strategies in this field is presented. The challenges of the developed approaches are discussed as well as the ways to increase the efficiency of *ex vivo* human platelet production. In spite of forthcoming efforts great progress in *ex vivo* human platelet production for clinic has already been gained.

Key words: platelets, megakaryocytes, megakaryocytopoiesis, thrombocytopoiesis, CD34+, hematopoietic stem cells, HSC, *ex vivo* platelet production, cell technologies.

^o Dmitry Yurevich Klyuchnikov, Biologist. E-dmklyu@gmail.com