

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ
БЕЛОРУССКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
БИОЛОГИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ

Кафедра генетики

ПИЛЮТИНА
Ольга Юрьевна

ДИФФЕРЕНЦИРОВКА CD34+ КЛЕТОК ПУПОВИННОЙ
КРОВИ ЧЕЛОВЕКА В МЕГАКАРИОЦИТАРНОМ
НАПРАВЛЕНИИ *IN VITRO*

Аннотация
к дипломной работе

Научный руководитель:
кандидат химических наук
зав лабораторией
биотехнологии кроветворных
клеток РНПЦ трансфузиологии
и медицинских биотехнологий
Н. В. Петевка

Минск, 2017

РЕФЕРАТ

Дипломная работа 47 с., 21 рис., 1 табл., 66 источников, 1 приложение.

ДИФФЕРЕНЦИРОВКА CD34+ КЛЕТОК ПУПОВИННОЙ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА В МЕГАКАРИОЦИТАРНОМ НАПРАВЛЕНИИ *IN VITRO*

Объекты исследования: CD34+-клетки пуповинной крови человека.

Цель: провести дифференцировку CD34+ клеток пуповинной крови в мегакариоцитарном направлении *in vitro* под воздействием различных цитокинов и изучить влияние подслоя мезенхимальных стволовых клеток (МСК) и предшественников эндотелиальных клеток (ЭК) пуповинной крови на прирост и степень дифференцированности клеток.

Методы исследования: ведение культур клеток, учет количества клеток и определение их жизнеспособности, проточная цитометрия, световая микроскопия, статистическая обработка данных.

Исследовано влияние комбинаций цитокинов (SCF, TPO, Flt-3L, IL-3, IL-6, IL-11) в присутствии вспомогательных МСК костного мозга или ЭК пуповинной крови на экспансию и дифференцировку CD34+ клеток в мегакариоцитарном направлении. Замена Flt-3L на IL-3 в дифференцировочной среде, содержащей смесь ростовых факторов SCF, TPO IL-6/IL-11 приводит к приросту общей клеточной массы в ходе мегакариоцитарной дифференцировки как без использования вспомогательных клеток, так и в случае сокультивирования с ними ($p=0,04$, t-test). Замена IL-6 на IL-11 не приводит к статистически значимым различиям в приросте CD45+ клеток ($p=0,07$), для целевых мегакариоцитарных предшественников эти различия есть ($p=0,04$). Сокультивирование с МСК способствует приросту CD45+клеток ($p=0,01$) и ранних CD41+мегакариоцитарных предшественников ($p=0,04$) в сравнении с аналогичными вариантами сокультивирования с ЭК или культивирования без использования подложки. Для более поздних CD41+CD42+ предшественников статистически значимых различий по приросту не выявлено. Показано, что с МСК адгезируют преимущественно ранние CD41+CD42- мегакариоцитарные предшественники, тогда как с ЭК адгезируют более зрелые CD41+CD42+клетки. В наиболее эффективном варианте культивирования SCF, TPO, IL-3, IL-6+МСК количество целевых CD41+клеток, полученных *in vitro* в расчете на 1 исходную CD34+ клетку, составило 65.

Сравнительная дифференцировка CD34+ клеток в присутствии МСК и ЭК пуповинной крови была проведена впервые. Результаты исследований стали основой для подачи на конкурс в БРФФИ проекта «Изучить регуляцию поздних стадий неонатального мегакариоцитопоэза в клеточном микроокружении васкулярной ниши *in vitro* под воздействием факторов воспаления и иммунитета». Проект получил финансирование с апреля 2017г.

РЭФЕРАТ

Дыпломная праца 47 с., 21 мал., 1 табл., 66 крыніц, 1 дадатка.

ДЫФЕРЭНЦЫЎКА CD34+ КЛЕТАК ПУПАВІННАЙ КРЫВІ ЧАЛАВЕКА ў МЕГАКАРЫАЦЫТАРНЫМ НАПРАМКУ.

Аб'екты даследавання: CD34+ клеткі пупавіннай крыві чалавека.

Мэта: правесці дыферэнцыўку CD34+ клетак пупавіннай крыві ў мегакарыацытарным напрамку *in vitro* і пад уздзеяннем розных цытакінаў і даследаваць уплыў падсоя мезенхімальных ствалавых клетак (МСК) і папярэднікаў эндатэліяльных клетак (ЭК) пупавіннай крыві на прырост і ступень клетачнай дыферэнцыўкі.

Метады даследавання: вядзенне культур клетак, падлік колькасці клетак і вызначэнне іх жыццяздольнасці, праточная цытаметрыя, светлавая мікраскапія, статыстычная апрацоўка вынікаў.

Даследаван уплыў камбінацый цытакінаў (SCF, TPO, Flt-3L, IL-3, IL-6, IL-11) у прысутнасці дапаможных МСК коснага мозгу або ЭК пупавіннай крыві на экспансію і дыферэнцыўку CD34+ клетак у мегакарыацытарным напрамку. Замена Flt-3 на IL-3 у сераде для дыферэнцыўкі, якая змяшчае фактары росту SCF, TPO, IL-6/11 вядзе да прыросту агульнай клетачнай масы ў мегакарыацытарнай дыферэнцыўкі як у адсутнасці, так і ў прысутнасці дапаможных клетак ($p=0,04$, t-тэст). Замена IL-6 на IL-11 не вядзе да статыстычна значных адрозненняў у прыросце CD45+ клетак ($p=0,07$), для мегакарыацытарных папярэднікаў гэтыя адрозненні ёсць ($p=0,04$). Сумеснае культываванне з МСК спрыяе прыросту CD45+ клетак ($p=0,01$) і ранніх CD41+ мегакарыацытарных папярэднікаў ($p=0,04$) у параўнанні з аналагічнымі варыянтамі сумеснага культывавання з ЭК або культывавання без дапамогі падложкі. Для больш позніх CD41+CD42+ папярэднікаў статыстычна значных адрозненняў па прыросту няма. На падложке МСК адгезіруюць пераважна раннія CD41+CD42– папярэднікі, а з ЭК – больш познія (CD41+CD42+) клеткі. У найбольш эфектыўным варыянце культывавання SCF, TPO, IL-3, IL-6 + МСК колькасць CD41+ клетак, якія атрыманы *in vitro* у разліку на 1 пачатковую CD34+ клетку, саставіла 65.

Параўнальная дыферэнцыўка CD34+ клетак у прысутнасці МСК і ЭК пупавіннай крыві была праведзена ўпершыню. Вынікі даследаванняў – аснова для падачы на конкурс у БРФФД праекта «Даследаваць рэгуляцыю позніх стадый неонатальном мегакарыоцитопоеза ў клеткавым асяроддзі васкулярнай нішы *in vitro* пад уздзеяннем фактараў запалення і імунітэту» Праект атрымаў фінансаванне з красавіка 2017г.

ABSTRACT

Graduate work 47 p., 21 fig., 1 tabl., 66 references, 1 attachment.

IN VITRO MEGAKARYOCYTE DIFFERENTIATION OF UMBILICAL CORD BLOOD CD34+ CELL

The objects of research: human umbilical cord blood CD34+cells, megakaryocyte progenitor cells.

Aim: megakaryocyte differentiation of CD34+ cord blood cells *in vitro* in coculture with bone marrow mesenchymal stromal cells (MSC) or cord blood progenitor endothelial cells (EC) stimulated with cytokine cocktails.

Research methods: coculture, counting of cells and determine their viability, flow cytometry, light microscopy, statistical data analysis.

The effects of cytokines combinations (SCF, TPO, Flt-3L, IL-3, IL-6, IL-11) in the presence of bone marrow MSC or umbilical cord blood EC on the expansion and megakaryocytic differentiation of CD34 + cells are studied. The replacement of Flt-3L by IL -3 in growth factor cocktail SCF, TPO, IL-6/IL-11 increase in total nuclear cells during megakaryocytic differentiation both without the use of supporting cells or in coculture with them ($p = 0,04$, t-test.) The replacement of IL-6 by IL-11 does not result in increasing CD45+cells ($p=0,07$), but there are differences for the megakaryocytic progenitors ($p=0,04$). Co-cultivation with MSC promotes an increase in CD45 + cells ($p = 0,01$) and early CD41 + megakaryocytic progenitors ($p=0,04$) compared to similar co-cultivation with EC or liquid culture. Statistically significant differences in growth mature CD41+CD42+ precursors are not detected. CD41+CD42- megakaryocytic progenitors attach to MSC, whereas more mature CD41 + CD42 + cells attach to EC. The most effective cytokine cocktail SCF, TPO, IL-3, IL-6 + MSC, gave rise to 65 CD41 + cells per input CD34 + cell.

The results of the research became the basis of BRFFR project "To study the regulation of terminal neonatal megakaryocytopoiesis in the cellular microenvironment of the vascular niche *in vitro* under the influence of inflammation and immunity factors". The project received funding from April.