

УДК [616-006+616.15:616.155.011

СОВРЕМЕННЫЕ ПОДХОДЫ К ПРИМЕНЕНИЮ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК В ОНКОГЕМАТОЛОГИИ

**Е. А. ПРИМАКОВА¹⁾, С. И. КРИВЕНКО¹⁾, В. В. СМОЛЬНИКОВА¹⁾, Е. А. НАЗАРОВА¹⁾, А. А. СЫМАНОВИЧ¹⁾,
Е. Г. ЮРКИНА¹⁾, Н. И. ДЕДЮЛЯ¹⁾, И. А. РОМАНОВА¹⁾, Н. Ф. МИЛАНОВИЧ¹⁾**

¹⁾Минский научно-практический центр хирургии, трансплантологии и гематологии,
ул. Семашко, 8, 220045, г. Минск, Беларусь

Образец цитирования:

Примакова ЕА, Кривенко СИ, Смольникова ВВ, Назарова ЕА, Сыманович АА, Юркина ЕГ, Дедюля НИ, Романова ИА, Миланович НФ. Современные подходы к применению мезенхимальных стволовых клеток в онкогематологии. *Журнал Белорусского государственного университета. Экология*. 2025;2:68–77.
<https://doi.org/10.46646/2521-683X/2025-2-68-77>

For citation:

Prymakova EA, Krivenko SI, Smolnikova VV, Nazarova EA, Symanovich AA, Yurkina EG, Dedyulya NI, Romanova IA, Milanovich NF. Modern approaches to the use of mesenchymal stem cells in oncohematology. *Journal of the Belarusian State University. Ecology*. 2025;2:68–77. Russian.
<https://doi.org/10.46646/2521-683X/2025-2-68-77>

Авторы:

Евгения Алексеевна Примакова – врач клинической лабораторной диагностики лаборатории клеточных биотехнологий.

Светлана Ивановна Кривенко – доктор медицинских наук, профессор; заместитель директора по научной работе.

Виктория Владимировна Смольникова – кандидат биологических наук, доцент; ведущий научный сотрудник научного отдела.

Екатерина Александровна Назарова – кандидат биологических наук, врач клинической лабораторной диагностики лаборатории клеточных биотехнологий.

Алла Александровна Сыманович – кандидат биологических наук, доцент; врач лабораторной диагностики лаборатории клеточных биотехнологий.

Екатерина Геннадьевна Юркина – старший научный сотрудник научного отдела.

Наталья Ивановна Дедюля – кандидат биологических наук, доцент; заведующий лабораторией клеточных биотехнологий.

Ирина Александровна Романова – научный сотрудник научного отдела.

Наталья Феодосьевна Миланович – кандидат медицинских наук, доцент; заведующий гематологическим отделением трансплантации костного мозга № 3.

Authors:

Evgeniya A. Prymakova, clinical laboratory diagnostics doctor of the cell biotechnology laboratory.

gane_sel@mail.ru

Svetlana I. Krivenko, doctor of science (medicine), professor; deputy director for research.

svtl_kr@tut.by

Viktorya V. Smolnikova, PhD (biology), docent; leading researcher of science department.

vsmolnikova2603@mail.ru

Ekaterina A. Nazarova, PhD (biology), clinical laboratory diagnostics doctor of the cell biotechnology laboratory.

k.nazarova-86@mail.ru

Alla A. Symanovich, PhD (biology), docent; clinical laboratory diagnostics doctor of the cell biotechnology laboratory.

aleftyna@tut.by

Ekaterina G. Yurkina, senior researcher of science department.

ekatherina999@mail.ru

Nataliya I. Dedyulya, PhD (biology), docent; head of the cell biotechnology laboratory.

nata_2010@tut.by

Iryna A. Romanova, researcher of science department.

romirina1978@gmail.com

Natalya F. Milanovich, PhD (medicine), docent; head of the hematology department of bone marrow transplantation No. 3.

nataly.milanovich@gmail.com

В последние десятилетия взгляды на этиологию и патогенез гемобластозов изменились. Все большее этиологическое значение приобретают неблагоприятные экологические факторы среды (физические и химические). Стратегия и тактика лечения онкогематологических заболеваний постоянно совершенствуется, а трансплантация гемопоэтических стволовых клеток остается «золотым стандартом» в терапии данной патологии. Основным ограничением трансплантации гемопоэтических стволовых клеток является развитие одного из самых тяжелых осложнений – реакции «трансплантат против хозяина». Клеточная терапия, ведущая роль в которой отводится мезенхимальным стволовым клеткам, на сегодняшний день является второй линией терапии данного состояния после кортикостероидов. Для повышения эффективности лечения этого иммунопатологического состояния необходима оптимизация подхода к выбору биомедицинского клеточного продукта на основе мезенхимальных стволовых клеток. В настоящем исследовании проанализировано изменение субпопуляционного состава лимфоцитов реципиентов аллогенных гемопоэтических стволовых клеток с признаками реакции «трансплантат против хозяина» при их совместном культивировании с мезенхимальными стволовыми клетками, полученными от разных доноров. Было показано, что культуры мезенхимальных стволовых клеток, полученные от разных доноров, обладают различным по степени выраженности иммунорегуляторным потенциалом. Предложен метод, который позволяет подобрать наиболее подходящий по иммунологическим характеристикам биомедицинский клеточный продукт на основе мезенхимальных стволовых клеток для клинического применения реакции «трансплантат против хозяина». Анализ эффективности предложенного метода проводился при использовании результатов иммунофенотипирования лимфоцитов 12 реципиентов аллогенных гемопоэтических стволовых клеток с клиническими проявлениями РТПХ, проходившими лечение на базе ГУ «МНПЦ ХТ и Г».

Ключевые слова: реакция «трансплантат против хозяина»; мезенхимальные стволовые клетки; биомедицинский клеточный продукт; субпопуляционный состав лимфоцитов.

MODERN APPROACHES TO THE USE OF MESENCHYMAL STEM CELLS IN ONCOHEMATOLOGY

*E. A. PRYMAKOVA^a, S. I. KRIVENKO^a, V. V. SMOLNIKOVA^a, E. A. NAZAROVA^a,
A. A. SYMANOVICH^a, E. G. YURKINA^a, N. I. DEDYULYA^a, I. A. ROMANOVA^a, N. F. MILANOVICH^a*

*^aMinsk Scientific and Practical Center for Surgery, Transplantology and Hematology,
7 Siamashka Street, Minsk 220045, Belarus*

Corresponding author: E. A. Prymakova (gane_sel@mail.ru)

In recent decades, views on etiology and pathogenesis of hemoblastosis have changed significantly. Unfavorable environmental factors (both physical and chemical) are becoming increasingly important etiologically. The strategy and tactics of treatment of oncohematological diseases are constantly being improved, and hematopoietic stem cell transplantation remains the «gold standard» in the treatment of this pathology. The main limitation of hematopoietic stem cell transplantation is the development of one of the most severe complications, the graft-versus-host disease. Cell therapy, in which mesenchymal stem cells play a leading role, is currently the second line of therapy for this condition after corticosteroids. It is necessary to optimize the approach to choosing a biomedical cell product based on mesenchymal stem cells in order to increase the effectiveness of cell therapy. The present study analyzes changes in the subpopulation composition of lymphocytes from recipients of allogeneic hematopoietic stem cells with signs of a graft-versus-host disease when they are co-cultured with mesenchymal stem cells obtained from different donors. It has been shown that cultures of mesenchymal stem cells obtained from different donors have different immunoregulatory potential. A method is proposed that makes it possible to select the most suitable biomedical cell product based on mesenchymal stem cells in terms of immunological characteristics for the clinical application of the graft-versus-host reaction. The analysis of the effectiveness of the proposed method was carried out using the results of immunophenotyping of lymphocytes from 12 recipients of allogeneic hematopoietic stem cells with clinical manifestations of GVHD treated at the State Institution «MSPC ST and H».

Keywords: graft-versus-host disease; mesenchymal stem cells; biomedical cell product; subpopulation composition of lymphocytes.

Введение

Онкогематологические заболевания (гемобластозы) представляют собой группу неоплазий, возникающих из кроветворной и лимфоидной ткани. Общая заболеваемость гемобластозами составляет 25–30 на 100 тыс. населения. Среди этиологических факторов, приводящих к развитию гемобластозов особое значение принадлежит экологическим факторам, в том числе ионизирующей радиации, другим видам облучения, химическим веществам (бензолу и его производным), а также цитостатическим лекарственным препаратам, РНК- и ДНК-онковирусам.

Несмотря на значительный прогресс в терапии гемобластозов, аллогенная трансплантация гемопоэтических стволовых клеток (аллоТГСК) остается основным методом лечения в онкогематологии. Однако аллоТГСК связана с развитием ряда тяжелых иммунологических осложнений, одно из ведущих мест среди которых занимает реакция «трансплантат против хозяина» (РТПХ). Около 50 % пациентов с резистентными к лечению формами РТПХ погибают, как правило, вследствие ассоциированных с этим процессом инфекций [1–3].

В настоящее время проводится поиск новых стратегий лечения РТПХ, включающих клеточную терапию, ведущую роль в которой занимают мезенхимальные стволовые клетки (МСК) [4–7]. Многочисленные исследования убедительно демонстрируют, что МСК *in vitro* способны регулировать функции различных иммунокомпетентных клеток (ИСК), участвующих в развитии РТПХ, особенно они вовлечены в супрессию Т-клеточной пролиферации и дифференцировки дендритных клеток, что делает МСК важным терапевтическим орудием в профилактике и лечении РТПХ [8–12].

Следует отметить, что иммуномодулирующие функции МСК реализуются не посредством действия какой-то конкретной молекулы, а с помощью сложной взаимозависимой иммунорегуляторной сети, взаимодействие клеток и молекул в которой зависит от воспалительного статуса микроокружения МСК [13].

Несмотря на то что применение МСК в качестве второй линии терапии при стероид-резистентной РТПХ вошло в рутинную практику, механизмы взаимодействия МСК и иммунокомпетентных клеток еще до конца не изучены и иногда кардинально отличаются в исследованиях различных авторов [14], а эффект, получаемый от клеточной терапии, не всегда предсказуем.

Противоречивые данные об эффективности клеточной терапии РТПХ заставляют исследователей проводить глубокий анализ клинических испытаний с применением МСК [15; 16]. Различия в выборе донора, источнике получения, методах культивирования, пролиферативном потенциале МСК, а также в количестве клеток, кратности их введения и в показаниях для терапии в исследованиях разных авторов не позволяют эффективно сравнить их между собой.

Так, группа ученых продемонстрировала, что существуют различия в культурах МСК, полученных от доноров аналогичного возраста и пола как по пролиферативному потенциалу, так и по иммуномодулирующим свойствам [17]. Отмечалось также, что «донорский фактор» играет далеко не последнюю роль в биологической изменчивости МСК, что в конечном итоге может определить эффективность клеточной терапии.

Однако не только различия в иммунорегуляторном потенциале различных культур МСК, но и в микроокружении, в которое попадают эти клетки, влияет на эффективность проводимой клеточной терапии. В экспериментальных условиях было показано, что при праймировании интерфероном-гамма МСК способны выполнять функции антиген-презентирующих клеток (АПК) и презентировать антигены Т-лимфоцитам [18]. Таким образом, эффект от клеточной терапии во многом может зависеть от условий культивирования МСК (присутствие в культуральной среде интерферона-гамма, фактора некроза опухоли альфа), а также от микроокружения, в которое они впоследствии попадают (про/противовоспалительное).

Цель исследования – оптимизация подхода к выбору биомедицинского клеточного продукта на основе МСК, используемого в комплексной терапии РТПХ. Для реализации цели проводилась оценка изменения субпопуляционного состава лимфоцитов реципиентов аллогенных гемопоэтических стволовых клеток без проявлений и с проявлениями острой РТПХ при их совместном культивировании с МСК, полученными от различных доноров.

Материалы и методы исследования

Материалы исследования: 1) мезенхимальные стволовые клетки, выделенные из жировой ткани и костного мозга человека; 2) моноклеарная фракция периферической крови реципиентов аллогенных гемопоэтических стволовых клеток (в период зафиксированной отстройки кроветворения без клинических признаков РТПХ и при появлении признаков оРТПХ).

Выделение и культивирование мезенхимальных стволовых клеток из жировой ткани. Выделение МСК из жировой ткани проводили по разработанному ранее протоколу с некоторыми модификациями¹. Параумбиликальную жировую ткань, иссеченную стерильными ножницами, смешивали с равным объемом стерильного фосфатно-солевого буфера и центрифугировали в течение 10 мин при 1500 об./мин при комнатной температуре. Образовавшийся поверх PBS слой адипоцитов собирали в стерильные полипропиленовые центрифужные пробирки объемом 50 мл. Полученную суспензию смешивали с равным объемом 0,06 % раствора коллагеназы I типа и инкубировали в течение 60 мин при температуре 37 °С и легком помешивании, после чего фермент нейтрализовали добавлением к смеси равного объема среды Игла в модификации Дульбекко (DMEM), содержащей 10 % эмбриональной телячьей сыворотки. Полученную

¹МПК C12N5/0775 (20101863). Способ выделения мезенхимальных стволовых клеток: патент 18051 Респ. Беларусь / С. И. Кривенко, Е. С. Бузук, Н. И. Дедюля; дата публ.: 28.02.2014.

смесь центрифугировали в течение 10 мин при 4000 об./мин при комнатной температуре. Осадок собирали и ресуспендировали в 50 мл среды DMEM. Процедуру центрифугирования повторяли (10 мин при 1500 об./мин при комнатной температуре). Осадок ресуспендировали в 10–15 мл среды для культивирования МСК. Подсчет клеток производили по стандартной методике с уксусной кислотой, подкрашенной метиленовым синим. Оценку жизнеспособности клеток проводили по общепринятой методике по исключению трипанового синего. Клеточную суспензию доводили средой для культивирования МСК до посевной концентрации и высевали в культуральные флаконы. Через 48 ч инкубации (37 °C, 5 % CO₂, 90 % влажность) неадгезировавшиеся к поверхности флакона клетки смывали стерильным PBS и заполняли флаконы специализированной средой для культивирования МСК. Замену среды в объеме ½ от первоначального производили каждые 3–4 дня до достижения клетками 70–80 % конфлюэнтности.

Выделение и культивирование МСК из пункта костного мозга. Для выделения моноклеаров из костного мозга человека пунктат костного мозга (25–50 мл) после добавления равного объема фосфатного буферного раствора, центрифугировали в течение 10 мин при 1500 об./мин. Клеточный осадок ресуспендировали в 50 мл стерильного фосфатного буфера и наслаивали на градиент плотности Ficoll-Paque ($\rho = 1,077$) в соотношении 3:1. Центрифугировали 30 мин при 1500 об./мин. Кольцо моноклеаров переносили в пробирку, содержащую полную среду DMEM (10% ЭТС, 1 % антибиотика, 1 % глутамина) и двукратно отмывали центрифугированием. Полученные клетки ресуспендировали в среде DMEM, содержащей 10 % специализированной сыворотки (сапплемент), 1% антибиотика и 1 % глутамина, а затем засевали в концентрации 900–1200 тыс. клеток/см² площади поверхности в стерильные пластиковые флаконы для адгезивных культур.

Через 48 ч производили смену культуральной среды для удаления неприкрепившихся клеток. В дальнейшем смену среды производили на каждые четвертые сутки.

Морфологический анализ культур клеток. Культуры клеток исследовали на универсальном инвертированном микроскопе (*Micros*, Австрия и *Nikon*, Япония) с применением методов фазового контраста.

Выделение и культивирование лимфоцитов периферической крови. Выделение лимфоцитов периферической крови проводили по общепринятой методике: 5–10 мл периферической крови смешивали с равным объемом стерильного PBS и наслаивали на градиент плотности Ficoll-Paque ($\rho = 1,077$) в соотношении 3:1. Центрифугировали 30 мин при 1500 об./мин при комнатной температуре. Кольцо моноклеаров переносили в пробирку объемом 15 мл, содержащую стерильный фосфатный буфер. Моноклеарные клетки отмывали центрифугированием в течение 10 мин при 1500 об./мин при комнатной температуре. Клеточный осадок ресуспендировали в 5 мл полной среды RPMI-1640, содержащей 10 % эмбриональной телячьей сыворотки, 1 % антибиотика и 1 % L-глутамина. Подсчет клеток производили по стандартной методике с уксусной кислотой, подкрашенной метиленовым синим. Клеточную суспензию помещали в стерильный культуральный флакон для суспензионных культур с газопроницаемой крышкой. Флакон с культурой помещали в CO₂-инкубатор (37 °C, 5 % CO₂, 90 % влажность).

Определение фенотипа мезенхимальных стволовых клеток и субпопуляционного состава лимфоцитов методом проточной цитофлуориметрии. Для определения мезенхимальных стволовых клеток методом проточной цитофлуориметрии использовали следующую панель моноклональных антител (МКАТ): CD 45 PC7, CD 34 APC, CD 105 PE, CD 90 FITC, CD 13 PE, HLA-DR, CD 73 PE, CD 29 APC, CD 31 FITC (Beckman Coulter).

Для определения субпопуляционного состава лимфоцитов использовалась стандартная панель МКАТ, которая позволяла идентифицировать следующие субпопуляции: Т-лимфоциты (CD3⁺), В-лимфоциты (CD19⁺), натуральные киллеры (CD16⁺CD56⁺), Т-хелперы (CD3⁺CD4⁺), цитотоксические Т-лимфоциты (CD3⁺CD8⁺), активированные Т-хелперы (CD4⁺DR⁺), активированные цитотоксические Т-лимфоциты (CD8⁺DR⁺), Т-натуральные киллеры (CD3⁺CD16⁺CD56⁺), Т-регуляторные лимфоциты (CD4⁺CD25⁺CD127⁺).

К суспензии клеток (0,5–1 млн клеток) добавляли МКАТ в объеме, согласно рекомендации фирмы производителя и 100 мкл PBS + 1 % BSA, инкубировали в темноте 30 мин при $t = 4$ °C. После инкубации клетки дважды отмывали центрифугированием 1500 об./мин 5 мин в PBS и фиксировали 1 % параформальдегидом.

Загрузка образцов проводилась на проточном цитофлуориметре FACSCanto (Becton Dickinson), оснащенном двумя лазерами: 488 и 630 нм, что позволяет оценить клетку по шести параметрам одновременно. Учет проводился в рабочей программе FACSDiva.

Постановка совместных культур МСК и лимфоцитов периферической крови. Для экспериментов по со-культивированию МСК рассевали в ячейки 6-ти и 24-луночных планшетов по 5000 клеток/см². На 4–5 сутки в те же ячейки вносили лимфоциты, выделенные из крови реципиентов аллогСК (по 500 тыс. клеток в лунку). Схема представлена на рис. 1.

Со-культивирование проводили в течение 3–4 суток в среде DMEM с добавлением 10 % эмбриональной телячьей сыворотки (Gibco, Life technologies). Контролем служили нестимулированные лимфоциты тех же пациентов, культивированные в отсутствие МСК. Все эксперименты были поставлены в 3–5 повторах.

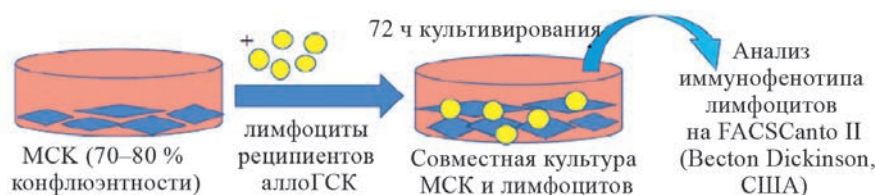


Рис. 1. Схема постановки совместных культур МСК и лимфоцитов реципиентов аллоГСК с РТПХ и без проявлений РТПХ

Fig. 1. Scheme of mixed cultures MSCs and lymphocytes of alloHSCT recipients with GVHD and without manifestations of GVHD

Статистическая обработка данных. Статистическую обработку проводили с помощью пакета прикладных программ *STATISTICA (Version 6.0, StatSoft Inc.)* для медико-биологических исследований и *Microsoft Excel*. Параметры распределения количественных переменных, отличных от нормального, представляли в виде медианы с 25 и 75 % квантилями. Для сравнительного анализа применяли непараметрические методы статистики: для сравнения двух независимых групп по одной количественной переменной использовали Mann – Whitney U-test. Различия считали достоверными при значении $p < 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение

Так как в настоящее время клеточная терапия РТПХ вошла в рутинную практику ГУ «МНПЦ ХТ и Г», а количество пациентов с данной патологией неуклонно растет, актуальной задачей по-прежнему остается поиск путей повышения эффективности проводимой клеточной терапии.

Использование в комплексной терапии аллогенного БМКП обладает рядом преимуществ перед аутологичным. Во-первых, позволяет существенно сократить сроки ожидания БМКП (2 ч вместо 2–3 недель), что является определяющим в терапии таких острых состояний, как РТПХ. Во-вторых, дает возможность выбрать наиболее подходящую по иммунологическим характеристикам культуру МСК, учитывая особенности конкретного пациента.

С 2010 г. на базе УЗ «9-я ГКБ» (с 2018 г. по настоящее время ГУ «МНПЦ ХТ и Г») создан и функционирует Банк мезенхимальных стволовых клеток, в фонде которого насчитывается более 100 образцов МСК, полученных от разных доноров. С совершенствованием методов культивирования МСК появилась возможность среди множества образцов выбрать наиболее подходящий для терапии РТПХ не только исходя из его клеточности, пассажа и источника получения, но и учитывая его иммуномодулирующие свойства.

В опубликованном нами ранее исследовании [19] было показано, что у реципиентов аллоГСК с РТПХ детектируются достоверно более высокие уровни ФНО- α ($p = 0,019$, Mann – Whitney U-test), ИЛ-8 ($p = 0,0005$, Mann – Whitney U-test) и низкие уровни ИЛ-17A ($p = 0,02$, Mann – Whitney U-test) и ИФН- γ ($p = 0,035$, Mann – Whitney U-test) по сравнению со здоровыми донорами. Данный факт свидетельствует о наличии аллореактивного микроокружения, в которое предстоит попасть МСК. Поэтому представляется нецелесообразным изучение иммуномодулирующих свойств МСК в контексте РТПХ в совместных культурах с лимфоцитами здоровых доноров, чему посвящено большинство публикаций.

В данном исследовании оценивали изменение субпопуляционного состава лимфоцитов реципиентов аллогенных гемопоэтических стволовых клеток без проявлений и с проявлениями острой РТПХ при их совместном культивировании с МСК, полученными от различных доноров. Для реализации данной задачи было поставлено 22 культуры лимфоцитов (из них – 14 от реципиентов с РТПХ и 8 – без проявлений РТПХ в период отстройки кроветворения) и 33 совместные культуры на подложке из МСК жировой ткани (МСК ЖТ) и костного мозга (КМ) (20 – от реципиентов с РТПХ и 13 – без проявлений РТПХ). Лимфоциты добавляли к культурам МСК КМ и ЖТ при достижении МСК 70 % конфлюэнтности и культивировали в течение 3–4 суток. На рис. 2 представлена микрофотография совместной культуры лимфоцитов и МСК.



Рис. 2. Морфологические характеристики совместной культуры лимфоцитов и МСК, 4 дня культивирования, $\times 100$, фазовый контраст

Fig. 2. Morphological characteristics of mixed culture of lymphocytes and MSCs, 4 days of cultivation, $\times 100$, phase contrast

При анализе данных, полученных при иммунофенотипировании лимфоцитов, культивированных без и на подложке из МСК, при РТПХ была выявлена тенденция к уменьшению количества Т-лимфоцитов в популяции, культивированной на подложке МСК ЖТ и КМ (85 [45; 97,4] %, $n = 20$) по сравнению с лимфоцитами, культивированными без подложки (95,2 [59,9; 98,6] %, $n = 20$). Однако данные различия не были статистически значимы (табл.1). Аналогичная тенденция к уменьшению процентного соотношения Т-лимфоцитов наблюдалась при совместном культивировании с МСК лимфоцитов реципиентов аллоГСК без признаков РТПХ (табл. 2).

Таблица 1

Субпопуляционный состав лимфоцитов реципиентов аллоГСК с РТПХ при совместном культивировании с МСК

Table 1

Subpopulations of lymphocytes in recipients of alloHSCT with GVHD during co-cultivation with MSCs

Субпопуляции лимфоцитов	Лимфоциты реципиентов с РТПХ ($n = 20$)	Лимфоциты реципиентов с РТПХ на подложке из МСК ($n = 20$)	Уровень значимости (Mann – Whitney U-test)
CD3 ⁺	95,2 [59,9; 98,6] %	85 [45; 97,4]	$p = 0,17$
CD16 ⁺ CD56 ⁺	6 [1,2;32,5] %	13 [2,2;46,8] %	$p = 0,22$
CD4 ⁺ CD25 ⁺ CD127 ⁻ от CD4 ⁺	2,03 [0; 8,35] %	3,03 [0; 9] %	$p = 0,16$
CD3 ⁺ CD8 ⁺	34,05 [6,7; 57,4] %	31,4 [15,1; 54,8] %	$p = 0,53$
CD8 ⁺ DR ⁺	3,1 [1,1; 18,6] %	3,1 [1,1; 26,1] %	$p = 0,52$

Таблица 2

Субпопуляционный состав лимфоцитов реципиентов аллоГСК без РТПХ при совместном культивировании с МСК

Table 2

Subpopulations of lymphocytes in recipients of alloHSCT without GVHD during co-cultivation with MSCs

Субпопуляции лимфоцитов	Лимфоциты реципиентов без РТПХ ($n = 13$)	Лимфоциты реципиентов без РТПХ на подложке из МСК ($n = 13$)	Уровень значимости (Mann – Whitney U-test)
CD3 ⁺	84,3 [46,1; 92,4] %	80,8 [43,4; 98,6]	$p = 0,92$
CD16 ⁺ CD56 ⁺	9,8 [4,2; 49,1] %	11,8 [1; 50] %	$p = 0,84$
CD4 ⁺ CD25 ⁺ CD127 ⁻ от CD4 ⁺	3,42 [0,6; 16] %	5,4 [0,8; 22] %	$p = 0,14$
CD3 ⁺ CD8 ⁺	25,8 [4,1; 61,2] %	24,4 [5,1; 59,4] %	$p = 0,80$
CD8 ⁺ DR ⁺	3,6 [0,3; 18,1] %	4,2 [0; 10,8] %	$p = 0,65$

Так как решающую роль в развитии РТПХ играют цитотоксические лимфоциты донора (CD3⁺CD8⁺-лимфоциты), целесообразным было оценить влияние МСК на данную субпопуляцию лимфоцитов. В табл. 1 и 2 отражено изменение процентного соотношения субпопуляции CD3⁺CD8⁺-лимфоцитов, а также активированных CD8⁺DR⁺ в интактных и совместных культурах при РТПХ и при отстройке кроветворения.

Отсутствие статистически значимых различий ($p > 0,05$) по процентному соотношению ключевых субпопуляций лимфоцитов, имеющих значение при РТПХ, при культивировании на подложке из МСК можно объяснить как различными иммуномодулирующими свойствами каждой конкретной культуры МСК и, соответственно, способностью культуры модулировать иммунный ответ, так и различной степенью активации микроокружения МСК (в данном случае – лимфоцитов от реципиентов с РТПХ и без).

Так, при культивировании лимфоцитов одного и того же реципиента одновременно на подложках из двух различных культур МСК наблюдали разнонаправленный эффект. Количество CD3⁺CD8⁺ клеток изменялось на подложке из различных культур МСК в равной степени, в то время как процентное соотношение CD3⁺CD4⁺HLA-DR⁺, CD3⁺CD8⁺HLA-DR⁺ и CD3⁺CD16⁺CD56⁺ клеток на подложке из различных культур МСК отличалось практически в 2 раза (рис. 3).

Полученные данные свидетельствуют о том, что культуры МСК, полученные от разных доноров, обладают различным по степени выраженности иммунорегуляторным потенциалом.

При анализе данных, полученных при культивировании лимфоцитов от 2-х реципиентов аллоГСК с признаками РТПХ и без на одной и той же культуре МСК ЖТ РЗ, при имеющейся общей тенденции процентное соотношение субпопуляций лимфоцитов отличалось на этой культуре МСК в несколько раз (рис. 4).

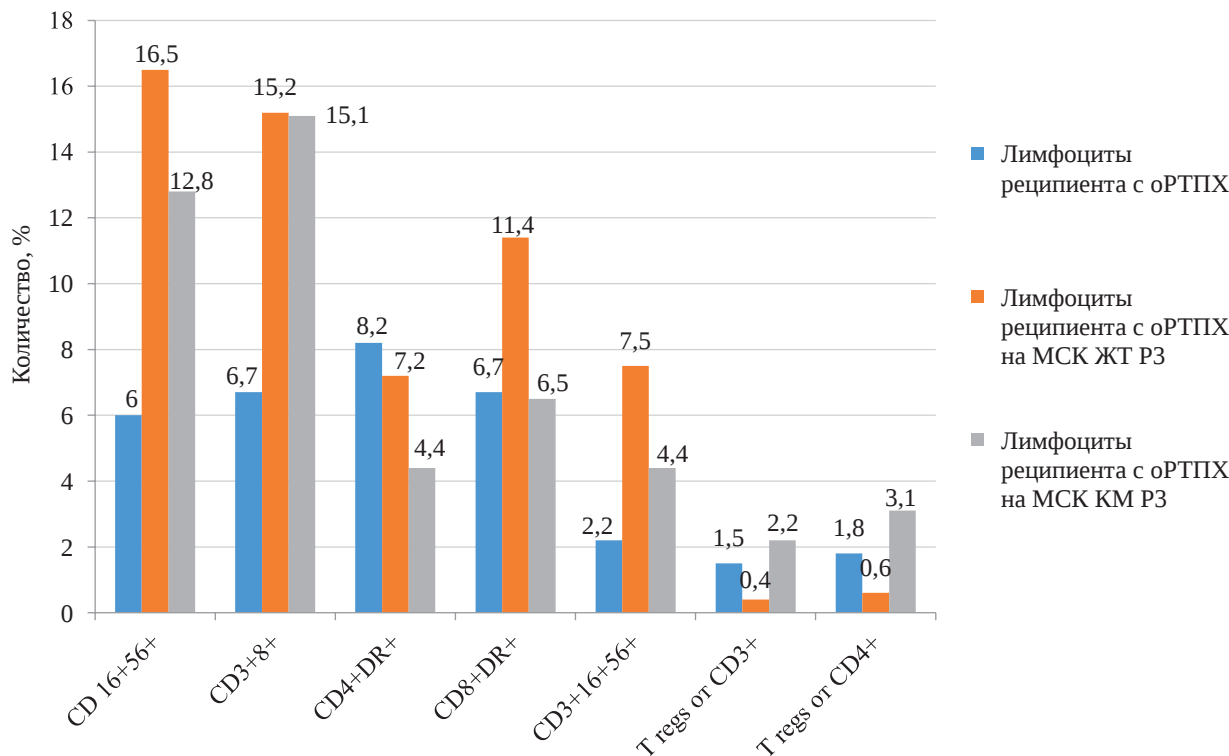


Рис. 3. Изменение субпопуляционного состава лимфоцитов реципиента аллоГСК с признаками оРТПХ на подложке из 2-х различных культур МСК

Fig. 3. Changes in lymphocytes' subpopulation of alloHSCT recipient with signs of aGVHD on a substrate of 2 different MSC cultures

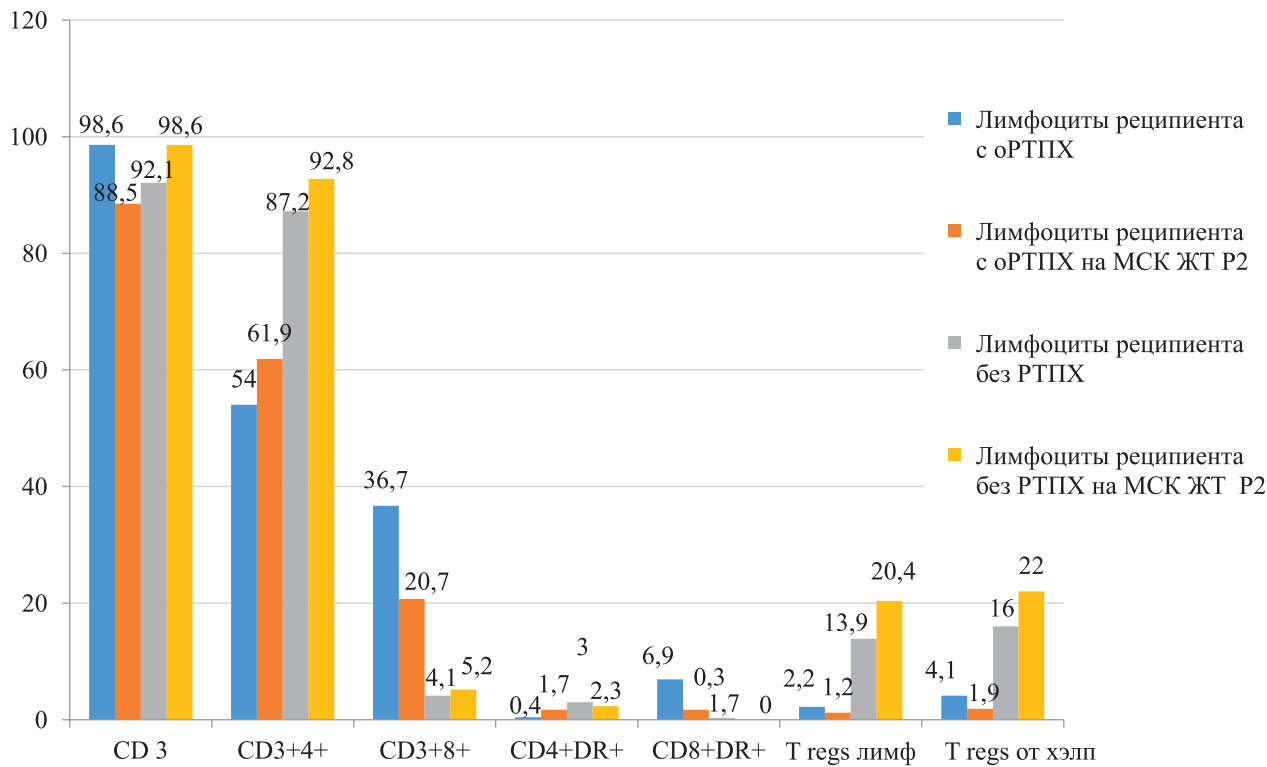


Рис. 4. Изменение субпопуляционного состава лимфоцитов 2-х реципиентов аллоГСК с признаками оРТПХ и без на подложке из одной и той же культуры МСК

Fig. 4. Changes in lymphocytes' subpopulation of 2 alloHSCT recipients with and without signs of aGVHD on a substrate of the same MSC culture

Таким образом, аллореактивное микроокружение влияет на способность МСК модулировать иммунный ответ и перераспределять $CD4^+$ и $CD8^+$ субпопуляции Т-лимфоцитов. Для повышения эффективности клеточной терапии необходим персонифицированный подход к подбору БМКП на основе МСК.

Культивирование лимфоцитов реципиентов аллоГСК с РТПХ одновременно на подложке из нескольких культур МСК представляют собой простой *in vitro* способ для моделирования влияния МСК на алло-реактивные лимфоциты реципиента с РТПХ.

Предложенный метод был апробирован при подборе оптимального БМКП на основе МСК для комплексной терапии РТПХ на 26 реципиентах аллоГСК с клиническими проявлениями РТПХ, проходившими лечение на базе ГУ «МНПЦ ХТ и Г».

Поскольку РТПХ является острым иммунопатологическим состоянием, требующим незамедлительной терапии, первое введение БМКП осуществлялось без постановки совместных культур лимфоцитов реципиента аллоГСК с МСК. Подбор МСК для подготовки БМКП проводили при появлении первых клинических симптомов РТПХ у пациентов, которым ранее не проводилась клеточная терапия. Для этого несколько культур МСК (2–4) отбирались из Банка мезенхимальных стволовых клеток и высевались в 24-луночные планшеты для постановки совместных культур с лимфоцитами. Для подбора МСК требовалось от 4 до 6 дней, что соответствовало временному промежутку до следующего введения БМКП.

Количество введений БМКП у данных пациентов варьировало от 1 до 9 (при медиане = 3, $n = 26$). Одно введение получили 9 пациентов, 2 введения – 3 пациента, 3 введения и более – 14 пациентов. Кратность введения зависела от тяжести и формы РТПХ, а также от выбора подходящего БМКП. Анализ эффективности предложенного метода проводили, используя результаты иммунофенотипирования лимфоцитов 12 пациентов, так как только 12 из 26 пациентов проходили терапию в стационаре достаточно продолжительное для анализа время. По результатам иммунофенотипирования предпочтительней считалось использование культуры МСК для подготовки БМКП со следующими характеристиками:

- снижение процентного соотношения $CD3^+$ -лимфоцитов на подложке из МСК по сравнению с интактными мононуклеарами периферической крови (МНК ПК);
- снижение процентного соотношения $CD3^+CD8^+$ -лимфоцитов на подложке из МСК по сравнению с интактными МНК ПК;
- снижение процентного соотношения $CD8^+HLA-DR^+$ -лимфоцитов на подложке из МСК по сравнению с интактными МНК ПК;
- увеличение процентного соотношения $CD4^+CD25^+CD127^-$ -лимфоцитов на подложке из МСК по сравнению с интактными МНК ПК.

Согласно утвержденной МЗ РБ инструкции по применению «Методы медицинской профилактики и терапии реакции “трансплантат против хозяина” после аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток» от 23.12.2022 г. рег. № 142–1222 показаниями к назначению клеточной терапии пациентам из группы высокого риска по развитию РТПХ являются увеличение количества $CD3^+ > 75\%$, увеличение количества $CD3^+CD4^+ > 45\%$, увеличение количества $CD3^+CD8^+ > 40\%$, увеличение количества активированных $CD3^+HLA-DR^+$ Т лимфоцитов $> 11\%$.

В нашем исследовании 5 из 12 пациентов (42 %) соответствовали данным иммунологическим критериям. Двое из этих 5-ти пациентов умерли вследствие нарастания тяжести РТПХ (кишечная форма), несмотря на продолжительную клеточную терапию (кратность 5 и 9 раз). Следует отметить, что данным пациентам удалось ввести подходящий по иммунофенотипическим параметрам БМКП только по 1 разу, несмотря на то что для подбора использовали 15 различных культур МСК. Положительный клинический эффект длился после введения БМКП у этих пациентов до 8 дней.

Всего из 12 пациентов кожная форма РТПХ была у 7 пациентов, кишечная – у 2-х, кожная и кишечная – у 3-х пациентов. По результатам подбора МСК 7 пациентов получили БМКП, полностью соответствующий установленным иммунофенотипическим критериям, 2 пациента – частично соответствующий и 3-м пациентам (2 из которых умерли) не удалось подобрать БМКП с оптимальными параметрами.

Из 7 пациентов, получивших подобранный БМКП, у шестерых купирование симптомов РТПХ произошло за 1–4 дня (кожная форма РТПХ – 5 пациентов, кожная и кишечная – 1 пациент), у одного пациента прошел месяц до закрепления эффекта (кожная и кишечная форма РТПХ).

У 2 пациентов, получивших частично соответствующий БМКП, купирование симптомов РТПХ произошло через 11 (кишечная форма) и 30 дней (кожная форма). Этим пациентам дважды вводили подобранные БМКП.

Анализируя полученные данные, можно заключить, что предложенный метод позволяет выбрать наиболее подходящий по иммунологическим характеристикам БМКП на основе МСК для клинического применения при РТПХ и может быть использован для персонификации и оптимизации клеточной терапии РТПХ.

Заключение

Культуры МСК, полученные от разных доноров, обладают различным по степени выраженности иммунорегуляторным потенциалом.

Для повышения эффективности клеточной терапии РТПХ необходим персонализированный подход к подбору биомедицинского клеточного продукта на основе МСК.

Культивирование лимфоцитов реципиентов аллогенских с РТПХ одновременно на подложке из нескольких культур МСК представляет собой простой *in vitro* метод для моделирования влияния МСК на аллореактивные лимфоциты реципиента с РТПХ и позволяет оптимизировать клеточную терапию РТПХ.

Библиографические ссылки

1. Arai S, Margolis J, Zahurak M. Poor outcome in steroid-refractory graft-versus-host disease with antithymocyte globulin treatment. *Biology and Blood Marrow Transplantation*. 2002;8:155–160.
2. Levine JE, Logan B, Wu J. Graft-versus-host disease treatment: predictors of survival. *Biology and Blood Marrow Transplantation*. 2010;16:1693–1699.
3. Westin JR, Saliba RM, De Lima M. Steroid-refractory acute GVHD: Predictors and outcomes. *Advances in Hematology*. 2011;2011:8.
4. Dotoli GM, De Santis GC, Orellana MD. Mesenchymal stromal cell infusion to treat steroid-refractory acute GvHD III/IV after hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplantation*. 2017;52(6):859–862.
5. Ball LM, Bernardo ME, Roelofs H. Multiple infusions of mesenchymal stromal cells induce sustained remission in children with steroid-refractory, grade III-IV acute graft-versus-host disease. *British Journal of Haematology*. 2013;163:501–509.
6. Le Blanc K, Rasmusson I, Sundberg B. Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells. *Lancet*. 2004;363(2004):1439–1441.
7. Le Blanc K, Frassonni F, Ball L. Mesenchymal stem cells for treatment of steroid-resistant, severe, acute graft-versus-host disease: a phase II study. *Lancet*. 2008;371(9624):1579–1586.
8. Yanez R, Lamana ML, Garcia-Castro J. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells have in vivo immunosuppressive properties applicable for the control of the graft-versus-host disease. *Stem Cells*. 2006;24:2582–2591.
9. DelaRosa O, Sa´nchez-Correa B, Morgado S. Human adipose-derived stem cells impair natural killer cell function and exhibit low susceptibility to natural killer-mediated lysis. *Stem Cells and Development*. 2012;21(8):1333–1343.
10. Glennie S, Soeiro I, Dyson PJ. Bone marrow mesenchymal stem cells induce division arrest anergy of activated T cells. *Blood*. 2005;105:2821–2827.
11. Nauta AJ, Kruisselbrink AB, Lurvink E. Mesenchymal stem cells inhibit generation and function of both CD34⁺-derived and monocyte-derived dendritic cells. *The Journal of Immunology*. 2006;177:2080–2087.
12. Corcione A, Benvenuto F, Ferretti E. Human mesenchymal stem cells modulate B-cell functions. *Blood*. 2006;107(1):367–372.
13. Salem HK, Thiemermann C. Mesenchymal stromal cells: Current understanding and clinical status. *Stem Cells*. 2010;28:585–596.
14. Nauta AJ, Fibbe WE. Immunomodulatory properties of mesenchymal stromal cells. *Blood*. 2007;110(10):3499–3506.
15. Munneke JM, Spruit MJA, Cornelissen AS. The Potential of Mesenchymal Stromal Cells as Treatment for Severe Steroid-Refractory Acute Graft-Versus-Host Disease. *Transplantation*. 2016;100(11):2309–2314.
16. Galipeau J, Sense´be´ L. Mesenchymal Stromal Cells: Clinical Challenges and Therapeutic Opportunities. *Cell Stem Cell*. 2018;22(6):824–833.
17. Maged G, Abdelsamed MA, Wang H. The potency of mesenchymal stem/stromal cells: does donor sex matter? *Stem Cell Research & Therapy*. 2024;15(1):112.
18. Carvalho AÉS, Sousa MRR, Alencar-Silva T. Mesenchymal stem cells immunomodulation: The road to IFN-γ licensing and the path ahead. *Cytokine & Growth Factor Reviews*. 201;47:32–42.
19. Примакова ЕА, Кривенко СИ, Сыманович АА. Цитокины плазмы крови как потенциальные биомаркеры реакции «трансплантат против хозяина» в раннем посттрансплантационном периоде. *Новости медико-биологических наук*. 2023;2:55–61.

References

1. Arai S, Margolis J, Zahurak M. Poor outcome in steroid-refractory graft-versus-host disease with antithymocyte globulin treatment. *Biology and Blood Marrow Transplantation*. 2002;8:155–160.
2. Levine JE, Logan B, Wu J. Graft-versus-host disease treatment: predictors of survival. *Biology and Blood Marrow Transplantation*. 2010;16:1693–1699.
3. Westin JR, Saliba RM, De Lima M. Steroid-refractory acute GVHD: Predictors and outcomes. *Advances in Hematology*. 2011;2011:8.
4. Dotoli GM, De Santis GC, Orellana MD. Mesenchymal stromal cell infusion to treat steroid-refractory acute GvHD III/IV after hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplantation*. 2017;52(6):859–862.
5. Ball LM, Bernardo ME, Roelofs H. Multiple infusions of mesenchymal stromal cells induce sustained remission in children with steroid-refractory, grade III-IV acute graft-versus-host disease. *British Journal of Haematology*. 2013;163:501–509.
6. Le Blanc K, Rasmusson I, Sundberg B. Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells. *Lancet*. 2004;363(2004):1439–1441.
7. Le Blanc K, Frassonni F, Ball L. Mesenchymal stem cells for treatment of steroid-resistant, severe, acute graft-versus-host disease: a phase II study. *Lancet*. 2008;371(9624):1579–1586.
8. Yanez R, Lamana ML, Garcia-Castro J. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells have in vivo immunosuppressive properties applicable for the control of the graft-versus-host disease. *Stem Cells*. 2006;24:2582–2591.
9. DelaRosa O, Sa´nchez-Correa B, Morgado S. Human adipose-derived stem cells impair natural killer cell function and exhibit low susceptibility to natural killer-mediated lysis. *Stem Cells and Development*. 2012;21(8):1333–1343.

10. Glennie S, Soeiro I, Dyson PJ. Bone marrow mesenchymal stem cells induce division arrest anergy of activated T cells. *Blood*. 2005;105:2821–2827.
11. Nauta AJ, Kruisselbrink AB, Lurvink E. Mesenchymal stem cells inhibit generation and function of both CD34+-derived and monocyte-derived dendritic cells. *The Journal of Immunology*. 2006;177:2080–2087.
12. Corcione A, Benvenuto F, Ferretti E. Human mesenchymal stem cells modulate B-cell functions. *Blood*. 2006;107(1):367–372.
13. Salem HK, Thiemermann C. Mesenchymal stromal cells: Current understanding and clinical status. *Stem Cells*. 2010;28:585–596.
14. Nauta AJ, Fibbe WE. Immunomodulatory properties of mesenchymal stromal cells. *Blood*. 2007;110(10):3499–3506.
15. Munneke JM, Spruit MJA, Cornelissen AS. The Potential of Mesenchymal Stromal Cells as Treatment for Severe Steroid-Refractory Acute Graft-Versus-Host Disease. *Transplantation*. 2016;100(11):2309–2314.
16. Galipeau J, Sense'be' L. Mesenchymal Stromal Cells: Clinical Challenges and Therapeutic Opportunities. *Cell Stem Cell*. 2018;22(6):824–833.
17. Maged G, Abdelsamed MA, Wang H. The potency of mesenchymal stem/stromal cells: does donor sex matter? *Stem Cell Research & Therapy*. 2024;15(1):112.
18. Carvalho AÊS, Sousa MRR, Alencar-Silva T. Mesenchymal stem cells immunomodulation: The road to IFN- γ licensing and the path ahead. *Cytokine & Growth Factor Reviews*. 201;47:32–42.
29. Primakova EA, Krivenko SI, Symanovich AA. *Citokiny plazmy krovi kak potencial'nye biomarkery reakcii «transplantat protiv hozjaina» v rannem posttransplantacionnom periode* [Plasma Cytokines as Potential Biomarkers of Graft-Versus-Host Disease in the Early Posttransplant Period]. *Novosti mediko-biologicheskikh nauk*. 2023;2:55–61. Russian.

Статья поступила в редколлегию 05.05.2025.
Received by editorial board 05.05.2025.