

ГОСУДАРСТВЕННОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«РЕСПУБЛИКАНСКИЙ НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ ЦЕНТР
ТРАНСФУЗИОЛОГИИ И МЕДИЦИНСКИХ БИОТЕХНОЛОГИЙ»

Объект авторского права
УДК [616.149.8:616.155.01]+[616.46:616.155.01]-036]:602.9

ЛЯХ
Елена Геннадьевна

**ФАКТОРЫ ПРОГНОЗА ЭФФЕКТИВНОСТИ ЗАГОТОВКИ
КОНЦЕНТРАТА ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК
ПУПОВИННОЙ КРОВИ И МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ
КЛЕТОК ПЛАЦЕНТЫ ДЛЯ КЛИНИЧЕСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ**

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук
по специальности 14.01.21 – гематология и переливание крови

Минск 2025

Научная работа выполнена в государственном учреждении «Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии»

Научный руководитель **Исайкина Янина Ивановна**, кандидат биологических наук, доцент, заведующий лабораторией клеточных биотехнологий и цитотерапии научного отдела государственного учреждения «Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии»

Официальные оппоненты: **Державец Лилия Александровна**, доктор биологических наук, профессор, заведующий клинико-диагностической лабораторией государственного учреждения «Республиканский научно-практический центр онкологии и медицинской радиологии им. Н.Н. Александрова»

Назарова Екатерина Александровна, кандидат биологических наук, врач клинической лабораторной диагностики лаборатории клеточных биотехнологий государственного учреждения «Минский научно-практический центр хирургии, трансплантологии и гематологии»

Оппонирующая организация ГУ «Республиканский научно-практический центр радиационной медицины и экологии человека»

Защита состоится «23» декабря 2025 года в 14.00 на заседании совета по защите диссертаций Д 03.11.01 при государственном учреждении «Республиканский научно-практический центр трансфузиологии и медицинских биотехнологий» по адресу: 220080, г. Минск, Долгиновский тракт, 160, телефон ученого секретаря +375 17 271 35 02, e-mail: erasiuk@blood.by.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке государственного учреждения «Республиканский научно-практический центр трансфузиологии и медицинских биотехнологий».

Автореферат разослан «18» ноября 2025 г.

Ученый секретарь совета по защите диссертаций Д 03.11.01, кандидат биологических наук

 Е.Д. Расюк

ВВЕДЕНИЕ

Гемопозитические стволовые клетки (ГСК) пуповинной крови (ПК) применяются для проведения аллогенной трансплантации у пациентов с онкологическими и гематологическими заболеваниями [Ballen K.K. et al., 2013]. Создание публичных банков ПК расширяет возможности подбора ГСК для проведения неродственных трансплантаций, а персонифицированные коммерческие банки ПК обеспечивают заготовку и хранение ПК для собственных нужд донора [Kurtzberg J. et al., 2017]. Потенциал использования образца ПК зависит от его клеточного состава, поэтому для публичных банков ПК установлены международные стандарты по сбору, хранению и выдаче ПК NetCord-FACT (NetCord-FACT International Standards for Cord Blood Collection, Banking, and Release for Administration): число ядродержащих клеток (ЯСК) в образце – не менее 5×10^8 , $CD34^+$ клеток – не менее $1,25 \times 10^6$ [NetCord-FACT, 2023], но лишь 25–40% образцов ПК удовлетворяют этим критериям [Guilcher G. M. et al., 2015; Laue J. et al., 2025]. Связь различных факторов с получением ПК заданного качества активно изучается, но нет единого мнения о влиянии условий сбора, обработки ПК, перинатальных показателей (данные матери и неонатальные показатели новорожденного) на количественные параметры ПК. Поэтому остается актуальным установление надежных прогностических критериев для получения образца, отвечающего международным требованиям, что в дальнейшем может быть использовано для создания публичного банка ПК в Республике Беларусь.

Мезенхимальные стволовые клетки (МСК) все шире используют в лечении заболеваний, в клинический протокол лечения которых входит проведение иммуносупрессивной терапии (ИСТ) [Song N. et al., 2020]. Одним из источников МСК служит плацента, которая в процессе своего развития формируется из тканей материнского и плодного происхождения [Araujo A.B. et al., 2018]. Тем не менее стандартизированный протокол выделения МСК из тканей плаценты и производства биомедицинского клеточного продукта (БМКП) отсутствует. Не решен вопрос и о приоритетности материнской (децидуальная ткань) или плодной (хорион и амнион) частей плаценты для получения заведомо высокой клеточной массы МСК, что требует исследования содержания и пролиферативного потенциала МСК из различных частей плаценты [Rylova Y.V. et al., 2015; Choi Y. et al., 2017]. Получение МСК с высокой иммуносупрессивной активностью для эффективного применения при проведении ИСТ инициирует дальнейшее изучение супрессивного потенциала этих клеток, выделенных из различных частей плаценты, так как результаты, отраженные в научных публикациях, варьируют [González P.L. et al., 2015; Ringdén O. et al., 2018]. Исследование влияния сверхнизкой температуры -196°C на сохранность функциональных свойств МСК плаценты имеет как научное, так и практическое

значение для их депонирования в криобанке, так как отвечает на вопрос о возможности бессрочного криохранения МСК плаценты с целью дальнейшей экспансии и получения БМКП для клинического применения.

БМКП на основе МСК плаценты применяется для лечения острой реакции «трансплантат против хозяина» (oРТПХ) у взрослых, но лишь единичные клинические исследования эффективности их использования для лечения oРТПХ у детей имели место, причем исследуемые группы пациентов детского возраста были очень малочисленны [Ringdén O. et al., 2022].

Таким образом, установление прогностических критериев, влияющих на клеточный состав концентрата гемопоэтических стволовых клеток ПК, поможет в отборе и заготовке образцов ПК в соответствии со стандартами NetCord-FACT. Сравнительная оценка пролиферативного и иммуносупрессивного потенциала МСК из различных частей плаценты и влияние на эти характеристики низких температур вносит вклад не только в расширение теоретических знаний, но имеет важное практическое значение для заготовки МСК плаценты и их применения в клеточной терапии. Клиническое исследование, разработанное нами БМКП «Клетки мезенхимальные стволовые плаценты человека» (далее – БМКП МСК плаценты) и доказательство безопасности и эффективности его применения для лечения II–IV степени oРТПХ у детей является актуальным и поможет улучшить качество оказания медицинской помощи пациентам.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Связь работы с научными программами (проектами), темами

Диссертация выполнена на базе государственного учреждения «Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии» (далее – Центр детской онкологии, гематологии и иммунологии) в рамках задания ГП «Научно-технические технологии и техника» (раздел 2 «Молекулярные и клеточные биотехнологии»): «Усовершенствовать технологию получения и создать криобанк мезенхимальных стволовых клеток плаценты с высоким иммуносупрессивным потенциалом» (№ госрегистрации 20200204, срок выполнения 2019–2024 гг.); задания ГНТП «Научно-техническое обеспечение качества и доступности медицинских услуг» подпрограммы «Клеточная терапия и высокотехнологичные методы замещения поврежденных органов и тканей»: «Разработать и внедрить метод иммуносупрессивной терапии мезенхимальными стволовыми клетками плаценты хронической идиопатической (иммунной) тромбоцитопенической пурпуры и приобретенной апластической анемии у детей» (№ госрегистрации 20213815, срок выполнения 2021–2026 гг.).

Тема диссертации соответствует пункту 2 перечня приоритетных направлений научной, научно-технической и инновационной деятельности на 2021–2025 годы в Республике Беларусь «Биологические, медицинские,

фармацевтические и химические технологии и производства» подпункту биотехнологии (геномные и постгеномные, клеточные, микробные, медицинские, промышленные), утвержденных Указом Президента Республики Беларусь от 7 мая 2020 г. № 156 «О приоритетных направлениях научной, научно-технической и инновационной деятельности на 2021–2025 годы».

Цель, задачи, объект и предмет исследования

Цель исследования – установить прогностические критерии, определяющие качество заготавливаемых образцов концентрата гемопоэтических стволовых клеток пуповинной крови, и исследовать функциональные свойства мезенхимальных стволовых клеток плаценты человека и эффективность их применения для иммуносупрессивной терапии.

Задачи исследования:

1. Проанализировать взаимосвязи между количественными показателями образцов пуповинной крови персонифицированного банка пуповинной крови Центра детской онкологии, гематологии и иммунологии и оценить влияние на эти параметры условий сбора, обработки ПК и показателей перинатального анамнеза.

2. Исследовать пролиферативную активность МСК, выделенных из материнской и плодной частей плаценты, и оценить влияние криогенной температуры (-196 °C) на пролиферативный потенциал МСК.

3. Провести исследование иммуномодулирующего потенциала МСК, выделенных из различных анатомических слоев плаценты, и проанализировать влияние срока культивирования клеток на их супрессивную активность.

4. Оценить эффективность применения БМКП на основе МСК плаценты при проведении комбинированной иммуносупрессивной терапии детям с острой РТПХ после аллогенной трансплантации ГСК.

Объект исследования – образцы ПК, депонированные в банке пуповинной крови Центра детской онкологии, гематологии и иммунологии; МСК, полученные из материала плаценты; МСК, полученные из костного мозга доноров; пациенты детского возраста с онкологическими и гематологическими заболеваниями, у которых после аллогенной ТГСК развилась oРТПХ II–IV степени.

Предмет исследования – количественные показатели образцов ПК, сведения из анамнеза матери, показатели перинатального периода, условия сбора и обработки ПК, пролиферативные и иммуносупрессивные свойства МСК плаценты и костного мозга человека, безопасность и эффективность применения БМКП МСК для лечения oРТПХ.

Научная новизна

Впервые установлен комплекс прогностических факторов, включающий объем ПК 40 мл и более, вес новорожденного 3500 г и более и заготовку ПК

от первых родов, который позволяет получить образец ПК от доноров Республики Беларусь, удовлетворяющий международному стандарту хранения NetCord-FACT ПК в публичных банках (содержание ЯСК $\geq 5 \times 10^8$ и CD34⁺ клеток $\geq 1,25 \times 10^6$ в образце).

Впервые доказано, что пролиферативный потенциал МСК из децидуальной ткани и хориона плаценты сопоставим и остается высоким при длительном культивировании, обеспечивая преумножение клеток к 9 пассажу более, чем в 10^{10} раз, что в 10^3 раз выше, чем у МСК из амниотической оболочки, с сохранением иммуносупрессивной активности клеток.

Впервые проведены клинические испытания и доказана эффективность применения БМКП МСК плаценты в дозе $\geq 2 \times 10^6$ /кг для лечения оРТПХ II–IV степени у детей, подтвержденная получением ответа на лечение более чем у 80% пациентов.

Положения, выносимые на защиту

1. Прогностическим критерием, наиболее значимо влияющим на получение образца пуповинной крови, удовлетворяющего установленному международному стандарту NetCord-FACT (содержание ЯСК $\geq 5 \times 10^8$ и CD34⁺клеток $\geq 1,25 \times 10^6$ в образце), является объем нативной пуповинной крови 40 мл и более ($p < 0,0001$). Показателями, имеющими прогностическую ценность, также являются вес новорожденного 3500 г и более и первые роды ($p < 0,05$).

2. Содержание КОЕ-Ф в децидуальной ткани и хорионе плаценты, а также способность МСК из этих тканей к самовоспроизведению в культуре сопоставимы и статистически значимо выше, чем аналогичные показатели клеток амниона. Высокая пролиферативная активность МСК плаценты сохраняется в течение 9 пассажей после замораживания и криохранения.

3. Депонированные при криогенной температуре (-196°C) МСК, выделенные из хориона, амниотической оболочки и децидуальной ткани плаценты, после экспансии клеток *in vitro* обладают сопоставимо высоким антипролиферативным действием на Т-хелперы и цитотоксические Т-лимфоциты, ингибируют раннюю и позднюю активацию Т-лимфоцитов и сохраняют иммуносупрессивную активность на поздних пассажах, при этом их супрессивный потенциал сопоставим с потенциалом МСК костного мозга.

4. Применение БМКП МСК плаценты в дозе более 2×10^6 клеток на кг массы тела пациента при проведении иммуносупрессивной терапии острой РТПХ II–IV степени у детей после аллогенной ТГСК является эффективным, так как обеспечивает достижение общего ответа на лечение более чем у 80% пациентов, что выше, чем при проведении медикаментозной терапии ($p = 0,0386$).

Личный вклад соискателя ученой степени

Планирование и разработка этапов работы проводилась соискателем совместно с научным руководителем. Автором самостоятельно проведен сбор и

анализ информации в исследуемой области, патентно-информационный поиск, оценка актуальности изучаемых вопросов; выбраны оптимальные методы исследования. Личным вкладом соискателя является: сбор данных и анализ показателей перинатального анамнеза и параметров образцов ПК персонифицированного банка ПК; получение культур МСК из плодной и материнской частей плаценты человека, разработка и постановка экспериментов для исследования КОЕ-Ф, пролиферативного потенциала и иммуносупрессивных свойств МСК; создание криобанка МСК плаценты для клинического использования; получение БМКП МСК плаценты для лечения оРТПХ у детей; статистическая обработка полученных результатов; написание всех разделов диссертации. Диссертантом в соавторстве опубликованы основные научные результаты диссертации, разработан лабораторный регламент на производство культуры МСК для клинического применения. Доля личного участия в публикациях составляет 80%.

Автор выражает благодарность сотрудникам Центра детской онкологии, гематологии и иммунологии: ведущему программисту отдела автоматизированных систем управления Быданову О.И. за помощь в статистической обработке данных по влиянию перинатальных показателей на параметры образцов ПК; старшему научному сотруднику лаборатории молекулярно-генетических исследований Волочник Е.В. за помощь в генетическом исследовании культур МСК плаценты; врачу детскому гематологу отделения трансплантации костного мозга Марейко Ю.Е. за помощь в оценке эффективности лечения оРТПХ у детей. Работа сотрудников, принимавших участие в исследованиях, отражена в совместных публикациях.

Апробация результатов диссертации и информация об использовании ее результатов

Результаты диссертации представлены в докладах на Республиканском научно-практическом семинаре «Современные клеточные технологии в медицине» (5 декабря 2019, Минск), Международной научной конференции «Современные проблемы клеточной инженерии, иммунологии и аллергологии» (20–21 мая, 2021 Минск), XVI Международной конференции «Актуальные вопросы детской онкологии, гематологии и иммунологии» (21–22 октября 2021, Минск), Международной конференции «Современные проблемы клеточной инженерии, иммунологии и аллергологии» (13–14 октября 2022, Минск), IX Республиканском съезде трансфузиологов и гематологов (11–12 мая 2023, Минск), Всероссийском конгрессе с международным участием «Инновации в детской гематологии, онкологии и иммунологии: от науки к практике» (1–3 июня 2023, Москва).

Результаты диссертации внедрены в работу Центра детской онкологии, гематологии и иммунологии (3 акта о внедрении, 1 инструкция по применению, утвержденная Министерством здравоохранения Республики Беларусь).

Опубликованность результатов диссертации

По материалам диссертационного исследования опубликовано 13 работ: 3 статьи в рецензируемых научных журналах, соответствующих требованиям пункта 19 Положения о присуждении ученых степеней и присвоении ученых званий в Республике Беларусь, 5 статей в рецензируемых сборниках научных трудов, 2 материалов конференций, 2 тезисов, 1 инструкция по применению. Общий объем опубликованных материалов составляет 4,0 авторских листа.

Структура и объем диссертации

Диссертация представлена на 146 страницах текста, содержит 33 рисунка, 24 таблицы. Работа состоит из введения, общей характеристики работы, обзора литературных источников, материалов и методов исследований, 4 глав результатов собственных исследований, заключения, библиографического списка, включающего 206 источников (17 – на русском языке, 189 – на английском языке) и 13 собственных публикаций автора, 12 приложений.

ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

Материал и методы исследований

Объектом исследования являлись: образцы ПК (n=1396), депонированные в банке персонифицированного хранения пуповинной крови Центра детской онкологии, гематологии и иммунологии; фрагменты плаценты здоровых доноров-родильниц (после получения информированного согласия на использование биоматериала) (n=9); культуры МСК плаценты (n=70); образцы аспирата костного мозга доноров (n=27); пациенты с онкологическими и гематологическими заболеваниями с оРТПХ II–IV степени (n=24).

Анализ перинатальных показателей включал данные из анамнеза матери: возраст матери, паритет родов, способ родоразрешения, срок гестации и неонатальные параметры новорожденного: пол и вес при рождении.

Колониеобразующую активность клеток-предшественников гемопоэза определяли посевом 1×10^5 мононуклеарных клеток (МНК) ПК в среду метилцеллюлозы, содержащую рекомбинантные ростовые факторы, с последующим подсчетом колониеобразующих единиц гранулоцитов и макрофагов (КОЕ-ГМ), бурстобразующих единиц эритроцитов (БОЕ-Э) и колониеобразующих единиц гранулоцитов, эритроцитов, моноцитов и мегакариоцитов (КОЕ-ГЭММ) под инвертированным микроскопом ($\times 100$).

Для получения МСК плаценты проводили механическое разделение анатомических слоев плаценты (амниотическая оболочка, децидуальная ткань и хорион), их фрагментирование с последующей ферментативной дезагрегацией клеток 0,07% раствором коллагеназы I. Выделенные клетки культивировали в среде IMDM с 10% АВ (IV) сывороткой при 37 °С и 5% CO₂, полученный монослой МСК дезаггезировали с поверхности флакона 0,25% раствором

трипсин-ЭДТА через 18–20 дней (первичная культура). Пересев клеток *in vitro* проводили до 9 пассажей включительно. Культуру КМ-МСК получали выделением из МНК костного мозга здоровых доноров на градиенте фиколла плотностью 1,077 г/см³. Культивирование выполняли в аналогичных условиях до 6 пассажей включительно. Подсчет колониеобразующих единиц фибробластов (КОЕ-Ф) проводили культивированием клеток плаценты или МНК костного мозга в количестве 1×10^6 в среде IMDM с 10% ЭТС МСК в течение 14 дней. После фиксации метанолом колонии окрашивали красителем Гимза и подсчитывали под инвертированным микроскопом ($\times 40$). Проллиферативную активность МСК оценивали в культуре, определяя популяционное удвоение (ПУ) клеток. Проводили подсчет МСК на выходе в каждом пассаже и рассчитывали ПУ для каждой культуры МСК на 1–9 пассажах с применением формулы: $ПУ = \log(\text{кол-во клеток на выходе} / \text{кол-во клеток исходное}) / \log 2$. Принадлежность культуры МСК плаценты к плодной либо материнской частям определяли методом фрагментарного анализа коротких tandemных повторов микросателлитных ДНК (STR-анализ), либо методом интерфазной флуоресцентной *in situ* гибридизации (i-FISH) с использованием ДНК-зондов на альфа-сателлитную ДНК X и Y хромосом в случае получения материала от новорожденных мужского пола. Иммуносупрессивную активность МСК исследовали в модели совместного культивирования МНК из периферической крови здоровых доноров на подложке МСК в соотношении 1:1 в присутствии фитогемагглютина (ФГА) в концентрации 2 мкг/мл. Исследование субпопуляционного состава проводили на 0-е и 5-е сутки культивирования и рассчитывали кратность прироста клеток. Иммунофенотипический анализ клеток выполняли методом проточной цитометрии по стандартной методике с использованием антител, меченных флуорохромами (CD3, CD4, CD8, CD34, CD38, CD45, CD73, CD90, CD105, CD106, CD273, CD274, CD276, CD HLA-DR). Замораживание образцов ПК выполняли с применением криопротектора на основе 6% гидроксизетилкрахмала с 10% ДМСО, МСК – 5% сывороточного альбумина с 10% ДМСО.

Для клинического исследования выполняли 1 или 2 в/в введения БМКП МСК плаценты 9 пациентам в дозе не менее 2×10^6 /кг в объеме 15–20 мл 0,9% раствора натрия хлорида (у законных представителей пациентов получены информированные согласия на введение МСК). Пилотное клиническое исследование было одобрено на заседании комитета по этике Центра детской онкологии, гематологии и иммунологии от 9 января 2019 года (протокол №1).

Статистическую обработку данных проводили с помощью программного обеспечения Statistica 7, Microsoft Office Excel 2016, языка R версии 4.3.1 в среде разработки RStudio. Для сравнения независимых выборок использовали U-критерий Манна-Уитни (Mann-Whitney U Test), для зависимых выборок –

критерий Уилкоксона (Wilcoxon Matched Pairs Test), для анализа зависимости между показателями применяли коэффициент корреляции Спирмана (r , Spearman Rank Order Correlations); для бинарных данных использовали метод анализа таблиц сопряженности по критерию хи-квадрат (χ^2). Для определения пороговых значений использовали ROC-анализ. Для многофакторного анализа применяли метод логистической регрессии (статистическая значимость определялась по тесту Вальда, а 95% доверительные интервалы для OR – методом профильного правдоподобия). При уровне значимости $p < 0,05$ различия показателей считались достоверными.

Результаты собственных исследований

Взаимосвязь между количественными параметрами образцов ПК и влияние на них методов обработки ПК. Оценены взаимосвязи между количеством ЯСК, CD34⁺ клеток, КОЕ-ГМ, БОЕ-Э и объемом собранной ПК ($n=1396$). Установлена корреляционная зависимость между объемом ПК и количеством ЯСК в нативной ПК ($r = 0,6745$, $p < 0,05$), в концентрате ПК – между объемом ПК и количеством ЯСК ($r = 0,5177$, $p < 0,05$), содержанием CD34⁺ клеток ($r = 0,4393$, $p < 0,05$), КОЕ-ГМ ($r = 0,5299$, $p < 0,05$) и БОЕ-Э ($r = 0,4850$, $p < 0,05$). В концентрате ПК содержание ЯСК высоко коррелировало с количеством CD34⁺ клеток ($r = 0,6314$, $p < 0,05$), КОЕ-ГМ ($r = 0,6027$, $p < 0,05$) и БОЕ-Э ($r = 0,5166$, $p < 0,05$). Установлена взаимосвязь между абсолютным количеством CD34⁺ клеток в концентрате ПК и числом КОЕ-ГМ ($r = 0,5849$, $p < 0,05$) и БОЕ-Э ($r = 0,5469$, $p < 0,05$).

Процессинг образцов ПК проводили 2-мя способами: методом двойного центрифугирования (по Рубинштейну) [Rubinstein P. et al., 1995] ($n=183$) и с применением автоматического сепаратора клеток крови ($n=1213$). Сравнительный анализ показал, что при использовании обоих методов наблюдалось достоверное снижение ЯСК ($p < 0,05$). При этом количество ЯСК в концентрате ПК после использования автоматического и ручного методов не отличалось между собой, как и выход ЯСК (соотношение ЯСК в образцах концентрата ПК после процессинга к ЯСК в исходном материале ПК), который составил $71,21 \pm 1,45\%$ и $70,81 \pm 0,57\%$, соответственно ($p = 0,8234$).

Сравнительная оценка количественных показателей в образцах концентрата ПК ($n=24$) до и после хранения при криогенной температуре (-196 °С) в течение $6,6 \pm 0,8$ месяцев показала, что применяемая методика замораживания с использованием криопротектирующего раствора 10% ДМСО с 6% гидроксипропилкрахмалом позволяет сохранить $86,4 \pm 3,9\%$ ЯСК в образце ПК и функциональную активность ГСК. Так, сохранность КОЕ-ГМ и БОЕ-Э в образцах ПК установлена на уровне $95,6 \pm 8,0\%$ и $96 \pm 11,6\%$, соответственно.

Влияние перинатальных показателей на количественные параметры образца ПК. Согласно стандартам NetCord-FACT для публичных банков

регламентировано содержание в образце ПК ЯСК $\geq 5 \times 10^8$ и CD34⁺ клеток $\geq 1,25 \times 10^6$. Построение ROC-кривой со значением площади под кривой (AUC) $0,763$ ($0,735-0,791$), указывающим на высокую дискриминационную способность рассчитанной модели, позволило установить минимальное пороговое значение объема ПК 40 мл, позволяющего получить образец ПК, соответствующий требованиям NetCord-FACT. Методом логистической регрессии оценена значимость влияния следующих факторов: объем собранной ПК, возраст матери, паритет родов, способ родоразрешения, срок гестации, пол и вес новорожденного для получения образца ПК с заявленными параметрами ($n=1213$) (таблица 1).

Таблица 1 – Влияние различных факторов на количественные параметры пуповинной крови (логистический регрессионный анализ)

Параметр	Отношение шансов	95% ДИ	p
Объем ПК			
<40 мл	1		
≥ 40 мл	1,49	1,37–1,62	<0,0001*
Паритет родов			
1	1		
2+	0,93	0,89–0,99	0,0208*
Срок гестации			
<39 недель	1		
≥ 39 недель	0,94	0,88–1,00	0,0500
Способ родоразрешения			
физиологические роды	1		
оперативные роды	0,99	0,93–1,05	0,6802
Пол новорожденного			
мужской	1		
женский	1,04	0,98–1,10	0,1650
Вес новорожденного			
<3500 г	1		
≥ 3500 г	1,19	1,13–1,25	<0,0001*

Примечание: * – статистически значимое изменение показателя ($p < 0,05$)

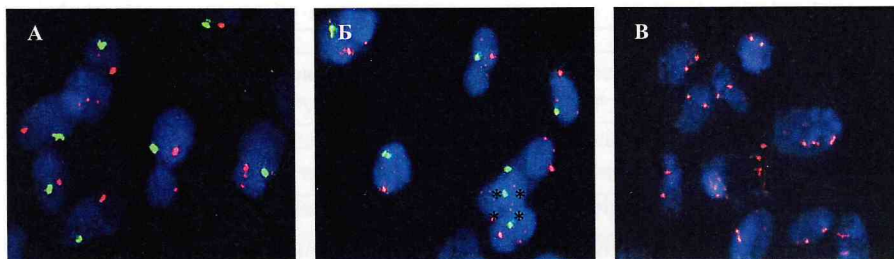
Методом многофакторного анализа установлено, что основной вклад в получение образца ПК, соответствующего стандарту NetCord-FACT, вносят такие факторы как объем ПК, вес ребенка и паритет родов: объем собираемой ПК 40 мл и более увеличивает шанс заготовки образца ПК на 49% а вероятность его получения достигает 70,2% ($p < 0,0001$), вес младенца 3500 г и более – на 19% ($p < 0,0001$), первые роды – на 7% ($p < 0,05$). При сочетании всех трех факторов, а именно, объем собираемой ПК 40 мл и более, заготовка ПК от новорожденных весом не менее 3500 г и от первых родов, шанс получить образец ПК, соответствующий стандарту, составляет 89,7%.

Функциональные свойства МСК из различных анатомических слоев плаценты. Для проведения дезагрегации клеток плаценты нами была применена коллагеназа I, что позволило получить культуру МСК из всех 9 образцов

плаценты, т. е. в 100% случаев. При этом клетки, полученные из децидуальной ткани (Дц-МСК), хориона (Х-МСК) и амниона (Ам-МСК) всех плацент (n=27), морфологически не отличались и имели характерную для МСК веретенообразную форму, которая сохранялась при дальнейшей экспансии. Таким образом, установлено, что ферментативный метод с применением коллагеназы I одинаково эффективен для выделения МСК из всех анатомических слоев плаценты.

Подлинность МСК в полученных культурах подтверждалась иммунофенотипированием (n=52). Более 90% клеток 3-го пассажа (14–16 дней в субкультуре) и 6-го пассажа (35–38 дней в субкультуре) экспрессировали маркеры МСК – CD90, CD105, CD73, при этом доля гемопоэтических клеток (CD45⁺CD14⁺CD20⁺CD34⁺/HLA-DR⁺) составляла <2%. Это соответствует минимальным критериям МСК и свидетельствует об однородности популяции клеток. По иммунофенотипическим характеристикам клетки Ам-МСК, Х-МСК и Дц-МСК на 3 и на 6 пассажах не отличались между собой (p > 0,05).

Методом STR-анализа доказано, что все исследуемые культуры Дц-МСК (n=5) имели материнское происхождение, все Ам-МСК (n=5) и Х-МСК (n=5) – плодное. Дополнительно в культурах МСК, полученных из 3 плацент новорожденных мальчиков, методом i-FISH установлено наличие XY хромосом в Ам-МСК (n=3) и Х-МСК (n=3), и XX хромосом в Дц-МСК (рисунок 1).



А – МСК из амниона, Б – МСК из ворсин хориона, В – МСК из децидуальной ткани

Рисунок 1 – Пример определения X/Y- хромосом методом i-FISH (донор 2), red-сигнал – альфа-сателлитная ДНК X-хромосомы, green-сигнал – альфа-сателлитная ДНК Y-хромосомы, (×1000)

Оценка содержания и пролиферативной активности МСК, полученных из различных анатомических слоев плаценты. Анализ содержания МСК проводился по оценке способности к колониеобразованию. Медианы содержания КОЕ-Ф на 1×10^6 клеток, выделенных из децидуального слоя (n=8) и хориона (n=8), составляли 12 [10,5; 22,5] и 9,5 [5,5; 12,0], соответственно, и были выше, чем КОЕ-Ф из амниотической оболочки (n=8) – 6 [4,5; 9,5] (p < 0,05) (рисунок 2 А).

Для сравнения пролиферативного потенциала Дц-МСК, Х-МСК и Ам-МСК клетки культивировали в течение 92 суток (9 пассажей). Результаты оценки кинетики роста МСК *in vitro* (n=5 для МСК из каждой ткани) выявили отсутствие достоверно значимой разницы в выходе клеток в основной культуре, тогда как динамика роста клеток в субкультурах показала, что с 1 по 9 пассаж количество Дц-МСК увеличилось в $3,5 \times 10^5$ раз, Х-МСК – в $9,9 \times 10^5$ раз, а Ам-МСК всего в 2×10^3 раз (рисунок 2 Б). Прирост клеток с 5 по 9 пассажи был значительно выше в культурах Дц-МСК и Х-МСК по сравнению с Ам-МСК (p < 0,05).

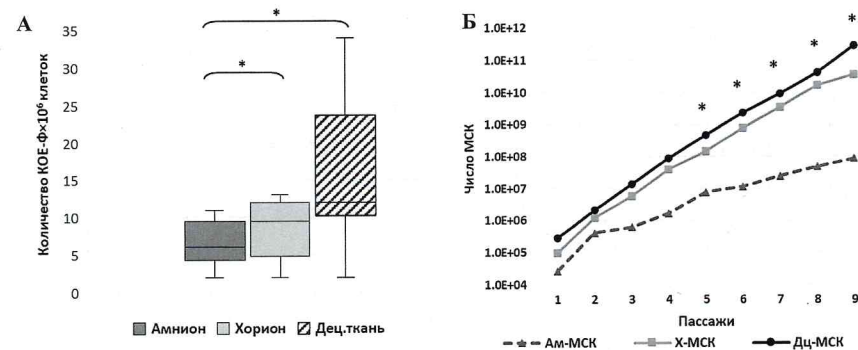


Рисунок 2 – Содержание КОЕ-Ф (А) и динамика роста МСК (Б) из различных анатомических слоев плаценты, *p < 0,05

Таким образом, пролиферативный потенциал Дц-МСК и Х-МСК был сопоставим, сохранялся высоким при длительном культивировании, обеспечивая преумножение клеток к 9 пассажу более, чем в 10^{10} раз, что в 10^3 раз выше, чем у МСК из амниотической оболочки (p < 0,05).

Сравнение динамики роста МСК плаценты (П-МСК) с МСК костного мозга (КМ-МСК) продемонстрировало, что в основной культуре П-МСК проходило в среднем $7,9 \pm 1,2$ популяционных удвоений (ПУ), что не отличалось от КМ-МСК – $8,9 \pm 0,4$ ПУ (p > 0,05). Экспансия П-МСК (n=15) со 2 по 6 пассаж была более мощная и ко 2 пассажу составляла $19,2 \pm 1,7$ ПУ, что в 2 раза выше, чем в культуре КМ-МСК (n=8) ($9,6 \pm 0,5$ ПУ, p = 0,0019), а к 6 пассажу – $29,0 \pm 2,9$ ПУ, что в 2,3 раза выше, чем в КМ-МСК – $12,7 \pm 2,2$ ПУ (p = 0,0018).

Температура криохранения -196°C не оказывала влияния на пролиферативный потенциал П-МСК. Так, кумулятивное ПУ после размораживания и культивирования МСК на протяжении 8 пассажей (n=27) составляло $32,8 \pm 3,2$ и не отличалось от ПУ нативных МСК (n=18) $33,5 \pm 2,4$ (p > 0,05), что обеспечивает возможность использования МСК плаценты для депонирования и последующего создания БМКП.

На основании полученных результатов были разработаны лабораторный регламент на производство «Культура мезенхимальных стволовых клеток из тканей плаценты для клинического применения» (утв. Респ. науч.-практ. центром дет. онкологии, гематологии и иммунологии 10.11.2021 / сост.: Я. И. Исаякина, Е. Г. Лях), технические условия на «Клетки мезенхимальные стволовые плаценты человека» ТУ ВУ 600395123.002-2023 (утв. М-вом здравоохранения Респ. Беларусь 09.11.2023 / ГУ «Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии»; Я. И. Исаякина, Е. Г. Лях, М. Г. Шитикова).

Иммуносупрессивные свойства МСК из различных анатомических слоев плаценты. Иммуносупрессивную активность МСК оценивали по уровню подавления митоген-стимулированной ранней ($CD3^+CD38^+$) и поздней ($CD3^+HLA-DR^+$) активации различных популяций Т-клеток и их пролиферации, после культивирования МНК на монослое Ам-МСК (n=8), Х-МСК (n=11), Дц-МСК (n=14) и МНК без МСК (n=12). Установлено, что П-МСК вне зависимости от источника получения подавляли как раннюю (p < 0,05), так и позднюю (p < 0,001) активацию Т-клеток (рисунок 3 Б–В).

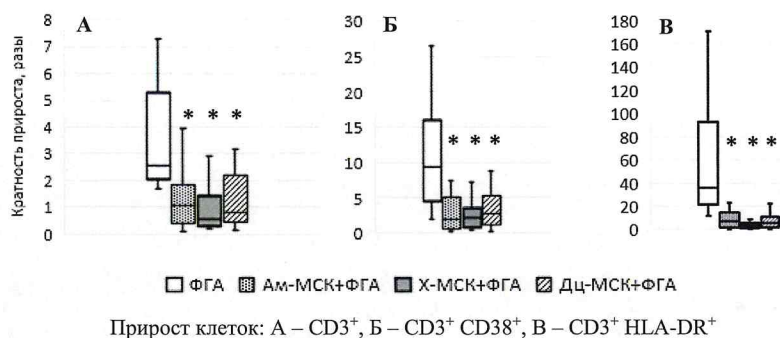


Рисунок 3 – Динамика прироста популяций Т-лимфоцитов, стимулированных ФГА при культивировании на подложке с МСК из различных анатомических слоев плаценты, на 5-е сутки культивирования, *p < 0,05

Наблюдалось снижение прироста $CD3^+$ Т-лимфоцитов в среднем в 2,5 раза при сокультивировании с Ам-МСК (p=0,0071), в 4,3 раза – с Х-МСК (p=0,0044), и в 3 раза – с Дц-МСК (p=0,0045) (рисунок 3 А). Не установлено различий в иммуносупрессивной активности между П-МСК плодного и материнского происхождения в отношении $CD3^+$ клеток. Доказано ингибирование Т-хелперов ($CD3^+CD4^+$) как ранней (p < 0,05), так и поздней активации (p < 0,001) (рисунок 4 Б–В), а также снижение пролиферации Т-хелперов в 3 раза при культивировании с Ам-МСК (p = 0,0139), в 3,5 раз – с Х-МСК (p = 0,0025) и в 2 раза – с Дц-МСК (p = 0,0059) (рисунок 4 А). Установлено супрессирующее

действие МСК, полученных из всех частей плаценты, как в отношении активации, так и в отношении пролиферации цитотоксических Т-лимфоцитов (ЦТЛ) ($CD3^+CD8^+$) (рисунок 4 Г–Е). Так, Ам-МСК подавляли пролиферацию ЦТЛ в 3,3 раза (p = 0,0017), Х-МСК – в 8 раз (p=0,0001), Дц-МСК – в 4,7 раза (p=0,0001). Ингибирующее действие МСК особенно было выражено в отношении поздней активации ЦТЛ (p < 0,001).

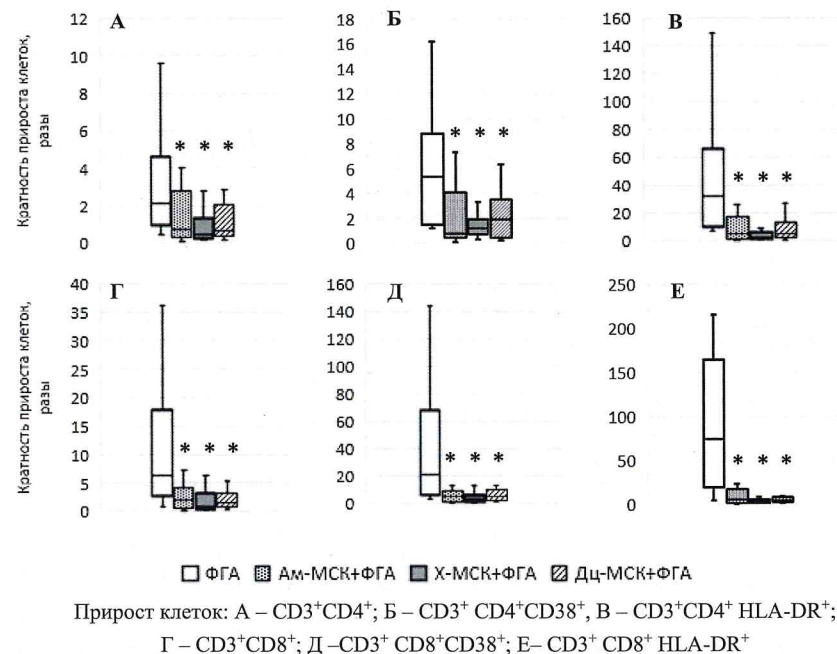


Рисунок 4 – Динамика прироста $CD3^+CD4^+$ и $CD3^+CD8^+$ клеток, стимулированных ФГА при культивировании на подложке с различными типами П-МСК на 5-е сутки культивирования, *p < 0,05

Наблюдалось отсутствие влияния срока культивирования П-МСК на их иммуносупрессивную активность, так как воздействие П-МСК 3-го пассажа (14–16 дней в субкультуре) (n=17) и 6-го пассажа (35–38 дней в субкультуре) (n=16) на активацию и пролиферацию $CD3^+$, $CD3^+CD4^+$ и $CD3^+CD8^+$ лимфоцитов было сопоставимо (p > 0,05). Сравнение П-МСК (n=33) и КМ-МСК (n=8) показало, что оба типа МСК достоверно супрессируют активацию и пролиферацию Т-лимфоцитов (p < 0,001), Т-хелперов (p < 0,001) и ЦТЛ (p < 0,001), и их иммуносупрессивное действие статистически значимо не отличается (p > 0,05).

Исследование на клетках 3 пассажа молекулы адгезии CD106, обеспечивающей межклеточное взаимодействие между МСК и лимфоцитами, выявило превышение уровня ее экспрессии в 1,5 раза на П-МСК (n=12) по сравнению с КМ-МСК (n=6) (65,0% (49,1–80,2) против 42,6% (36,6–46,7), соответственно) (p < 0,001). Тем не менее, длительная экспансия П-МСК с 3 по 6 пассаж *in vitro* приводила к снижению экспрессии CD106 на 12,0% (до 54,0% (35,5–65,8)) (p=0,008).

Полученные *in vitro* результаты иммуносупрессивного действия П-МСК подтверждены нашими клиническими исследованиями по применению БМКП МСК плаценты для лечения приобретенной апластической анемии (ПАА) у детей. Было установлено, что введение БМКП МСК плаценты при проведении иммуносупрессивной терапии у детей с тяжелой формой ПАА не только в 2 раза увеличивает достижение стойкого ответа на терапию, но и по эффективности не уступает БМКП МСК костного мозга и может являться его альтернативой.

Применение БМКП МСК плаценты для лечения острой реакции «трансплантат против хозяина» у детей. В клиническое исследование были включены 24 пациента после аллотГСК, у которых развилась оРТПХ II–IV степени. Все пациенты получали соответствующую медикаментозную ИСТ оРТПХ в полном объеме. Девяти пациентам дополнительно вводили МСК плаценты (МСК+), 15 пациентов МСК не получали и составляли группу сравнения (МСК-). Пациенты обеих групп были сопоставимы по полу, диагнозам, типу трансплантации, количеству ЯСК, CD34⁺ и CD3⁺ клеток в трансплантате, ИСТ, проводимой для профилактики и лечения оРТПХ, и по тяжести и распространенности оРТПХ. Так, в группе МСК+ у 5 пациентов развилась оРТПХ II степени, у 3 – III степени и у 1 – IV степени, а в группе МСК- у 9 – II степени, у 5 – III степени и у 1 – IV степени. У всех пациентов обеих групп наблюдали кожную форму оРТПХ, у 3-х пациентов в каждой группе – печеночную форму оРТПХ, поражение ЖКТ развилось у 6 пациентов в группе МСК+ и у 9 пациентов группы МСК-.

Показаниями для введения БМКП МСК плаценты являлись клинические проявления оРТПХ и недостаточный ответ на ИСТ. Введение пациентам БМКП МСК плаценты проводили в дозе 2,5 (2–9) × 10⁶ /кг массы тела пациента на 46±5 день после аллотГСК. Семи пациентам было выполнено 1 введение БМКП МСК, 2 пациентам – по 2 введения. Внутривенное введение БМКП МСК плаценты пациентам детского возраста с оРТПХ в дозе до 4×10⁶ /кг являлось безопасным и не вызывало побочных реакций и осложнений.

Критерием эффективности применения БМКП МСК плаценты для лечения оРТПХ являлось достижение клинического ответа (общий ответ), при котором полная ремиссия – это исчезновение всех симптомов оРТПХ; частичная

ремиссия – уменьшение количества органов, вовлеченных в патологический процесс или уменьшение степени поражения органа (таблица 2).

Таблица 2 – Эффективность применения БМКП МСК плаценты при оРТПХ

Группы пациентов	Общий ответ			Отсутствие ответа		
	ПР + ЧР			МСК+	МСК-	p
	МСК+	МСК-	p			
оРТПХ:	8/9 (88,9%)	7/15 (46,7%)	0,0386	1/9 (11,1%)	8/15 (53,3%)	0,0389
II ст. оРТПХ	5/5 (100,0%)	7/9 (77,8%)	0,2549	0/5	2/9 (22,2%)	0,2549
III–IV ст. оРТПХ	3/4 (75,0%)	0/6	0,0112	1/4 (25,0%)	6/6 (100,0%)	0,0112

Примечание: ПР – полная ремиссия, ЧР – частичная ремиссия

Полная ремиссия была достигнута у 44,4% (4 из 9) пациентов группы МСК+ после применения БМКП МСК, в то время как в группе МСК- только у 13,3% (2 из 15) пациентов. Значимо, что среди пациентов с оРТПХ III–IV степени после введения БМКП МСК 75,0% (3 из 4) ответили на лечение, при этом в группе сравнения ни один из 6 пациентов не ответил на медикаментозную терапию (p=0,0112). Наибольшая эффективность применения БМКП МСК была достигнута при оРТПХ с поражением ЖКТ и печени. Так, у 71,4% пациентов группы МСК+ с вовлечением этих органов наблюдалась ремиссия, тогда как в группе МСК- – лишь в 20% (p=0,034). Побочных эффектов и осложнений при введении БМКП МСК плаценты не отмечалось. Кроме того, в исследуемой группе 3 (33,3%) пациентам отменили ИСТ и 5 (55,6%) пациентам – снизили дозу метилпреднизолона в 6 раз на 30-й день после введения БМКП.

Таким образом, проведенное клиническое исследование доказало безопасность и эффективность применения БМКП МСК плаценты в дозе 2,5 (2–9) × 10⁶ /кг при проведении комбинированной ИСТ для лечения оРТПХ у пациентов детского возраста. Применение БМКП МСК не вызывает побочных реакций и обеспечивает ответ на проводимую терапию у 88,9% (8 из 9) пациентов, тогда как в группе сравнения только у 46,7% (7 из 15) (p=0,0386).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Основные научные результаты диссертации

1. Анализ образцов концентрата гемопозитических стволовых клеток пуповинной крови, депонированных в банке пуповинной крови Центра детской онкологии, гематологии и иммунологии, выявил высокий уровень корреляционной связи между числом ядросодержащих клеток и такими параметрами, как количество CD34⁺ клеток (r = 0,6314, p < 0,05) и КОЕ-ГМ (r = 0,6027, p < 0,05). Объем ПК является фактором, наиболее значимо влияющим на количество ЯСК, CD34⁺ клеток и КОЕ-ГМ в заготавливаемой пуповинной крови и высоко коррелирующим с содержанием ЯСК (r = 0,6745, p < 0,05). Способ проведения процессинга пуповинной крови (автоматический или ручной)

не влияет на выход ЯСК ($p = 0,8234$), а замораживание в 10% ДМСО с 6% гидроксизтилкрахмалом позволяет сохранить функциональную активность гемопоэтических клеток-предшественников (КОЕ-ГМ, БОЕ-Э) [1-А; 4-А; 5-А].

2. Прогностическими факторами, влияющими на получение образца пуповинной крови, соответствующего установленным международным стандартам хранения в публичных банках NetCord-FACT (содержание ЯСК $\geq 5 \times 10^8$ и $CD34^+$ клеток $\geq 1,25 \times 10^6$), являются объем материала 40 мл и более, при котором шанс получения требуемых образцов ПК увеличивается на 49%, а вероятность их получения достигает 70,2% ($p < 0,0001$), вес новорожденного 3500 г и более повышает шанс заготовки требуемой ПК на 19% ($p < 0,0001$), а получение ПК от первых родов – на 7% ($p = 0,0208$) [1-А].

3. Содержание МСК в децидуальной ткани плаценты в 2,6 раз выше, в хорионе – в 1,6 раз выше, чем в амнионе, а пролиферативный потенциал МСК, выделенных из децидуальной ткани и хориона плаценты, сопоставим и остается высоким при длительном культивировании, обеспечивая преумножение клеток к 9 пассажу более чем в 10^{10} раз, что в среднем в 10^3 раза выше, чем у МСК, извлеченных из амниотической оболочки ($p < 0,05$). После замораживания и криохранения при -196°C МСК плаценты сохраняют мощную пролиферативную активность и их кумулятивное популяционное удвоение после размораживания и культивирования на протяжении 8 пассажей составляет $32,8 \pm 3,2$, что статистически не отличается от аналогичного показателя ($33,5 \pm 2,4$) до воздействия криогенной температуры ($p > 0,05$) [2-А; 7-А; 11-А].

4. Мезенхимальные стволовые клетки, выделенные из хориона, амниона и децидуальной ткани плаценты, после криохранения при температуре -196°C одинаково супрессируют активацию $CD3^+$ Т-лимфоцитов, $CD3^+CD4^+$ Т-хелперов и $CD3^+CD8^+$ цитотоксических Т-лимфоцитов ($p < 0,001$) и обладают сопоставимо высоким антипролиферативным действием в отношении этих популяций ($p < 0,05$). Функциональная способность МСК плаценты ингибировать активацию и пролиферацию Т-лимфоцитов, включая Т-хелперы и цитотоксические Т-лимфоциты, после культивирования на протяжении 3 и 6 пассажей не отличается ($p > 0,05$). Иммуносупрессивная активность МСК из всех анатомических слоев плаценты сопоставима с МСК костного мозга ($p > 0,05$), при этом МСК плаценты в сравнении с МСК костного мозга экспрессируют в 1,5 раза более высокий уровень молекулы адгезии CD106, обеспечивающей межклеточное взаимодействие МСК и лимфоцитов ($p < 0,001$) [3-А; 6-А; 12-А].

5. Применение БМКП МСК плаценты в дозе $\geq 2 \times 10^6/\text{кг}$ при проведении комбинированной иммуносупрессивной терапии является эффективным терапевтическим подходом для лечения острой РТПХ II–IV степени у детей, так как позволяет достичь ответа на лечение у 89% пациентов детского возраста по сравнению с 47% пациентов, получавших только медикаментозную терапию

($p=0,0386$). Среди пациентов с тяжелой острой РТПХ III–IV степени при использовании БМКП МСК более чем 70% пациентов достигли полной и частичной ремиссии, тогда как в группе пациентов, получавших только медикаментозное лечение, ответ на терапию отсутствовал ($p=0,0112$) [3-А; 8-А; 9-А; 10-А].

Рекомендации по практическому использованию результатов

1. Для заготовки образцов ПК с содержанием ЯСК $\geq 5 \times 10^8$ и $CD34^+$ клеток $\geq 1,25 \times 10^6$, что соответствует международным стандартам для публичных банков пуповинной крови NetCord-FACT, рекомендуется пользоваться критериями отбора образцов, а именно, объем ПК не менее 40 мл, а масса тела новорожденного – не менее 3500 г [1-А].

2. Применять метод замораживания пуповинной крови с использованием криопротектирующего раствора 10% ДМСО с 6% гидроксизтилкрахмалом, что позволяет сохранить 86,4 \pm 3,9% ЯСК в образце ПК и функциональную активность гемопоэтических клеток-предшественников (КОЕ-ГМ, БОЕ-Э) на высоком уровне [5-А].

3. Рекомендуется при проведении этапа дезагрегации ткани плаценты использовать коллагеназу I для получения БМКП МСК плаценты, что особенно важно для амниотической оболочки, содержащей большое количество эпителиальных стволовых клеток (Лабораторный регламент на производство «Культуры мезенхимальных стволовых клеток из ткани плаценты для клинического применения») [11-А].

4. Рекомендуется использовать для получения БМКП на основе МСК плаценты децидуальную ткань и хорион, исходя из полученных в работе данных о возможности преумножения первоначального числа клеток из этих тканей в 10^{10} раза к 9 пассажу, что в 10^3 раза больше, чем из амниотической оболочки [2-А].

5. Применять в комбинированной иммуносупрессивной терапии и в соответствии с утвержденными инструкциями по применению и протоколами лечения, принятыми в Республике Беларусь, зарегистрированный БМКП «Клетки мезенхимальные стволовые плаценты человека ТУ ВУ 600395123.002-2023» [8-А; 9-А; 10-А; 13-А].

6. Применять БМКП МСК плаценты в дозе не менее $2 \times 10^6/\text{кг}$ для лечения острой РТПХ II–IV степени у детей [8-А; 9-А; 10-А].

7. Проводить депонирование МСК плаценты раннего пассажа при -196°C с последующей экспансией клеток и созданием партии БМКП для клинического применения, так как процедуры замораживания и криохранения не влияют на пролиферативный и иммуносупрессивный потенциал МСК [7-А; 12-А].

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ СОИСКАТЕЛЯ УЧЕНОЙ СТЕПЕНИ

Статьи в научных изданиях, соответствующие части первой пункта 19 Положения о присуждении ученых степеней и присвоении ученых званий

1–А. Влияние характеристик матери и неонатальных параметров плода на количественные показатели образцов пуповинной крови / Е. Г. Лях, Я. И. Исайкина, М. А. Новикова, А. А. Жерносеченко, Ю. В. Савич, Р. Л. Фролова // *Здравоохранение*. – 2021. – № 5. – С. 74–80.

2–А. Пролиферативная активность мезенхимальных стволовых клеток из различных частей плаценты / Я. Исайкина, Е. Лях, М. Новикова, Ю. Савич, Л. Кеда // *Наука и инновации*. – 2021. – № 7. – С. 76–80.

3–А. Иммуносупрессивный потенциал мезенхимальных стволовых клеток плаценты / Е. Г. Лях, Я. И. Исайкина, М. Г. Шитикова, М. А. Новикова, Ю. В. Савич, А. А. Жерносеченко // *Лабораторная диагностика*. Восточная Европа. – 2021. – Т. 10, № 4. – С. 458–466.

Статьи в журналах и сборниках научных трудов

4–А. Исследование влияния различных факторов на параметры качества образцов пуповинной крови / Я. И. Исайкина, Е. Г. Лях, М. А. Новикова, Р. Л. Фролова, А. А. Жерносеченко, А. В. Цивинская // *Гематология. Трансфузиология*. Восточная Европа. – 2017. – Т. 3, № 4. – С. 715–722.

5–А. Содержание и функциональная активность гемопоэтических стволовых клеток пуповинной крови после криохранения / М. А. Новикова, Я. И. Исайкина, Р. Л. Фролова, Ю. В. Савич, Е. Г. Лях // *Гематология. Трансфузиология*. Восточная Европа. – 2022. – Т. 8, № 4. – С. 449–455.

6–А. Экспрессия CD106 и коингибиторных молекул CD273, CD274, CD276 на мезенхимальных стволовых клетках плаценты / Е. Г. Лях, М. Г. Шитикова, Я. И. Исайкина, М. А. Новикова // *БГМУ в авангарде медицинской науки и практики* : рец. ежегод. сб. науч. тр. : в 2 т. / М-во здравоохранения Респ. Беларусь, Белорус. гос. мед. ун-т ; под ред. С. П. Рубниковича, В. А. Филонюка ; редкол.: С. П. Рубникович (гл. ред.) [и др.]. – Минск, 2022. – Вып. 12, т. 2. – С. 170–176.

7–А. Исайкина, Я. И. Функциональные свойства мезенхимальных стволовых клеток плаценты, депонированных для клинического применения после продолжительной экспансии и криозамораживания / Я. И. Исайкина, Е. Г. Лях, Ю. В. Савич // *Гематология. Трансфузиология*. Восточная Европа. – 2022. – Т. 8, № 3. – С. 310–317.

8–А. Применение мезенхимальных стволовых клеток плаценты для лечения острой реакции «трансплантат против хозяина» у детей / Е. Г. Лях, Я. И. Исайкина, М. А. Новикова, Ю. В. Савич, А. А. Жерносеченко, Ю. Е. Марейко, Д.

В. Прудников, Н. В. Минаковская // *Гематология. Трансфузиология*. Восточная Европа. – 2024. – Т. 10, № 3. – С. 306–312.

Материалы съездов, конференций, симпозиумов, тезисы докладов

9–А. Потенциал мезенхимальных стволовых клеток плаценты для применения в иммуносупрессивной клеточной терапии / Е. Г. Лях, Я. И. Исайкина, М. А. Новикова, Ю. В. Савич, А. А. Жерносеченко, М. Г. Шитикова, Ю. Е. Марейко // *Инновации в детской гематологии, онкологии и иммунологии: от науки к практике* : материалы Всерос. конгр. с междунар. участием, [Москва], 1–3 июня 2023 г. – [Опубл. в журн.] *Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии*. – 2023. – Т. 22, № 2, прил. 1. – С. 114.

10–А. Эффективность использования БМКП МСК плаценты для лечения острой реакции «трансплантат против хозяина» у детей / Е. Г. Лях, Я. И. Исайкина, М. А. Новикова, Ю. В. Савич, А. А. Жерносеченко, Ю. Е. Марейко, Д. В. Прудников, Н. П. Кирсанова, Н. В. Минаковская // *Современные проблемы клеточной инженерии, иммунологии и аллергологии* : тез. докл. IV Междунар. науч. конф., Минск, 21–22 нояб. 2024 г. : науч. электрон. изд. / Нац. акад. наук Беларуси, Ин-т биофизики и клеточ. инженерии НАН Беларуси ; редкол.: А. Е. Гончаров (гл. ред.) [и др.]. – Минск, 2024. – С. 20. – 1 CD-ROM.

11–А. Плацента, как источник мезенхимальных стволовых клеток для клеточной терапии / Я. И. Исайкина, Е. Г. Лях, С. В. Мальцева, Е. Ю. Русакович, Д. А. Цеханович, Ю. В. Савич // *Медико-биологические и нутрициологические аспекты здоровьесберегающих технологий* : материалы V Междунар. науч.-практ. конф., Кемерово, 30 мая 2025 г. / Кемер. гос. мед. ун-т, Артлайф, НОЦ мирового уровня «Кузбасс-Донбасс» ; отв. ред. В. М. Позняковский, Е. М. Мальцева ; редкол.: Т. В. Пьянзова [и др.]. – Кемерово, 2025. – С. 246–251.

12–А. Потенциал применения мезенхимальных стволовых клеток плаценты в иммуносупрессивной клеточной терапии / Е. Г. Лях, М. Г. Шитикова, М. А. Новикова, Я. И. Исайкина // *Медико-биологические и нутрициологические аспекты здоровьесберегающих технологий* : материалы V Междунар. науч.-практ. конф., Кемерово, 30 мая 2025 г. / Кемер. гос. мед. ун-т, Артлайф, НОЦ мирового уровня «Кузбасс-Донбасс» ; отв. ред. В. М. Позняковский, Е. М. Мальцева ; редкол.: Т. В. Пьянзова [и др.]. – Кемерово, 2025. – С. 254–259.

Инструкция по применению

13–А. Метод лечения идиопатической тромбоцитопенической пурпуры и приобретенной апластической анемии у детей с использованием биомедицинского клеточного продукта мезенхимальных стволовых клеток плаценты : инструкция по применению № 143-1223 : утв. М-вом здравоохранения Респ. Беларусь 26.03.2024 / ГУ «Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии» ; Я. И.

Исайкина, Т. А. Углова, И. В. Емельянова, Е. Г. Лях, Ю. Е. Марейко, Ю. В. Савич. – Минск, 2023. – 5 с.

Прочее

Рационализаторское предложение «Получение мезенхимальных стволовых клеток из тканей послеродовой плаценты»: рац. предложение № 143 : утв. Респ. науч.-практ. центром дет. онкологии, гематологии и иммунологии 08.12.2022 / сост.: Е. Г. Лях, Я. И. Исайкина, Ю. В. Савич.

Рационализаторское предложение «Создание криобанка для депонирования МСК плаценты в малых объемах»: рац. предложение № 142 : утв. Респ. науч.-практ. центром дет. онкологии, гематологии и иммунологии 08.12.2022 / сост.: Е. Г. Лях, Я. И. Исайкина, М. А. Новикова.

Рационализаторское предложение «Метод применения БМКП «Клетки мезенхимальные стволовые плаценты человека» для лечения острой реакции «трансплантат против хозяина» у детей»: рац. предложение № 158 : утв. Респ. науч.-практ. центром дет. онкологии, гематологии и иммунологии 27.02.2024 / сост.: Е. Г. Лях, Я. И. Исайкина, Ю. Е. Марейко.

РЕЗЮМЕ

Лях Елена Геннадьевна

Факторы прогноза эффективности заготовки концентрата гемопоэтических стволовых клеток пуповинной крови и мезенхимальных стволовых клеток плаценты для клинического применения

Ключевые слова: пуповинная кровь (ПК), криохраниение, мезенхимальные стволовые клетки (МСК), плацента, иммуносупрессивная активность, острая «реакция трансплантат против хозяина» (oРТПХ)

Цель работы: установить прогностические критерии, определяющие качество заготавливаемых образцов концентрата гемопоэтических стволовых клеток пуповинной крови, и исследовать функциональные свойства мезенхимальных стволовых клеток плаценты человека и эффективность их применения для иммуносупрессивной терапии.

Методы исследования: культуральные, проточная цитометрия, статистические.

Полученные результаты и их новизна. Впервые проведен анализ корреляционных связей количественных параметров образцов пуповинной крови доноров Республики Беларусь. Установлено, что прогностическими факторами, влияющими на получение образца ПК, удовлетворяющего международным стандартам хранения в публичных банках NetCord-FACT, являются объем ПК 40 мл и более, вес новорожденного не менее 3500 г и заготовка ПК от первых родов. Разработан протокол получения МСК из плаценты человека и создан криобанк культур МСК для клинического применения. Впервые доказано, что пролиферативный потенциал МСК, выделенных из децидуальной ткани и хориона плаценты, сопоставим и остается высоким, по сравнению с МСК из амниона. Впервые установлено, что МСК из хориона, амниона и децидуальной ткани обладают сопоставимым супрессивным действием на пролиферацию и активацию Т-лимфоцитов и срок культивирования МСК плаценты, и количество пассажей не влияет на иммуносупрессивную активность клеток. Доказана эффективность применения биомедицинского клеточного продукта на основе МСК плаценты в дозе $\geq 2 \times 10^6 / \text{кг}$ для лечения острой РТПХ II–IV степени у детей.

Рекомендации по использованию. Разработанные критерии отбора образцов ПК могут быть использованы для стандартизации заготовки материала в публичных банках пуповинной крови. Протокол получения МСК плаценты и новые данные об иммуномодулирующих свойствах клеток могут быть использованы для производства биомедицинских клеточных продуктов для лечения острой РТПХ и других иммуноопосредованных заболеваний.

Область применения: клиническая и экспериментальная гематология, иммунология, клеточная терапия.

Лях Алена Генадзьеўна

**Фактары прагнозу эфектыўнасці нарыхтоўкі канцэнтрату
гемапаэтычных ствалавых клетак пупавіннай крыві і мезенхімальных
ствалавых клетак плацэнты для клінічнага прымянення**

Ключавыя словы: пупавінная кроў (ПК), крыозахоўванне, мезенхімальныя ствалавыя клеткі (МСК), плацэнта, імунасупрэсіўная актыўнасць, вострая «рэакцыя трансплантат супраць гаспадара» (вРТСГ)

Мэта працы: ўсталяваць прагнастычныя крытэрыі, якія вызначаюць якасць нарыхтоўваных узораў канцэнтрату гемапаэтычных ствалавых клетак пупавіннай крыві, і даследаваць функцыянальныя ўласцівасці мезенхімальных ствалавых клетак плацэнты і эфектыўнасць іх прымянення для імунасупрэсіўнай тэрапіі.

Метады даследавання: культуральныя, праточная цытаметрыя, статыстычныя

Атрыманыя вынікі і іх навізна. Упершыню праведзены аналіз карэляцыйных сувязяў колькасных параметраў узораў пупавіннай крыві донараў Рэспублікі Беларусь. Устаноўлена, што прагнастычнымі фактарамі, якія ўплываюць на атрыманне ўзору ПК, задавальняючымі асноўным міжнародным стандартам захоўвання ў публічных банках NetCord-FACT, з'яўляюцца аб'ём ПК 40 мл і больш, вага нованароджанага не менш 3500 г і нарыхтоўка ПК ад першых родаў. Распрацаваны пратакол атрымання МСК з плацэнты чалавека і створаны крыябанк культур МСК для далейшага клінічнага прымянення. Упершыню даказана, што праліфератыўны патэнцыял МСК, выдзеленых з дзецыдуальнай тканіны і харыона плацэнты, супастаўны і застаецца высокім у параўнанні з МСК з амніятычнай абалонкі. Упершыню ўстаноўлена, што МСК з харыона, амніона і дзецыдуальнай тканіны плацэнты валодаюць супастаўным супрасіўным дзеяннем на праліферацыю і актывацыю Т-лімфацытаў, а тэрмін культывавання МСК плацэнты і колькасць пасажаў не ўплываюць на імунасупрэсіўную актыўнасць клетак. Даказана эфектыўнасць прымянення біямедыцынскага клеткавага прадукту на аснове МСК плацэнты ў дозе $\geq 2 \times 10^6$ /кг для лячэння вРТСГ II–IV ступені ў дзяцей.

Рэкамендацыі па выкарыстанні. Распрацаваныя крытэрыі адбору узораў ПК могуць быць выкарыстаны для стандартызацыі нарыхтоўкі матэрыялу ў публічных банках пупавіннай крыві. Пратакол атрымання МСК плацэнты і новыя дадзеныя аб імунамадулюючых уласцівасцях клетак могуць быць выкарыстаны для вытворчасці біямедыцынскіх клеткавых прадуктаў для лячэння вРТСГ і іншых імунаапасродкаваных захворванняў.

Вобласць ужывання: клінічная і эксперыментальная гематалогія, імуналогія, клеткавая тэрапія.

Liakh Elena Gennadievna

Factors predicting the effectiveness of harvesting cord blood hematopoietic stem cell concentrate and placental mesenchymal stem cells for clinical use

Key words: umbilical cord blood (CB), cryopreservation, mesenchymal stem cells (MSC), placenta, immunosuppressive activity, acute graft-versus-host disease (aGVHD)

Purpose of the study: establish the prognostic criteria determining the quality of cord blood hematopoietic stem cell concentrate samples and to investigate the functional properties of MSC of the placenta and the effectiveness of their use for immunosuppressive therapy.

Methods: culture, flow cytometry, statistical

The results: For the first time, the analysis of correlations of quantitative parameters of umbilical cord blood samples from donors of the Republic of Belarus was carried out and it was found that the prognostic factors influencing the obtaining CB that meets the basic standards of storage in public banks NetCord-FACT the volume of the CB of 40 ml or more, the weight of the newborn of at least 3,500 g and receiving CB from the first birth. A protocol for obtaining MSCs from human placenta has been developed and a cryobank of MSCs cultures has been created for further clinical use. For the first time, it has been proven that the proliferative potential of MSCs isolated from decidual tissue and chorion of the placenta is comparable and remains high compared to MSCs from the amnion. It has been established for the first time that MSCs from chorionic, amnion, and decidual tissues have a comparable suppressive effect on the proliferation and activation of T-lymphocytes, and the duration of cultivation of placental MSCs, and the number of passages does not affect the immunosuppressive activity of cells. The effectiveness of the use biomedical cell products based on MSC of placenta at a dose of $\geq 2 \times 10^6$ /kg for the treatment of stage II–IV aGVHD in children has been proven.

Recommendations for use. The developed CB sampling criteria can be used to standardize the sampling of material in public cord blood banks. The protocol for obtaining placental MSCs and new data on the immunomodulatory properties of cells can be used to produce biomedical cell products for the treatment of aGVHD and other immune-mediated diseases.

Application: clinical and experimental hematology, immunology, cell therapy.



Подписано в печать 17.11.2025.
Формат 60×84/16. Бумага офсетная. Печать цифровая.
Усл. печ. л. 1,34. Тираж 60 экз. Заказ № 365.

ФТИ НАН Беларуси.
Свидетельство о государственной регистрации издателя, изготовителя,
распространителя печатных изданий № 2/12 от 21.11.2013.
220084, ул. Академика Купревича, 10, г. Минск.