

ГОСУДАРСТВЕННОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«МИНСКИЙ НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ ЦЕНТР ХИРУРГИИ,
ТРАНСПЛАНТОЛОГИИ И ГЕМАТОЛОГИИ»

Объект авторского права
УДК 611.018.1:602.9:57.083.324(043.3)

ПРИМАКОВА
Евгения Алексеевна

**ОБОСНОВАНИЕ ВЫБОРА МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ
КЛЕТОК ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ ПРИ ОСТРОЙ РЕАКЦИИ
«ТРАНСПЛАНТАТ ПРОТИВ ХОЗЯИНА» НА ОСНОВЕ ОЦЕНКИ ИХ
ИММУНОБИОЛОГИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК**

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук
по специальности 14.01.24 – трансплантология и искусственные органы

Минск 2026

Научная работа выполнена в государственном учреждении «Минский научно-практический центр хирургии, трансплантологии и гематологии»

**Научный
руководитель**

Кривенко Светлана Ивановна,
доктор медицинских наук, профессор, заместитель
директора по научной работе государственного
учреждения «Минский научно-практический центр
хирургии, трансплантологии и гематологии»

**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»

Белевцев Михаил Владимирович,
кандидат биологических наук, доцент, заместитель
директора по науке государственного учреждения
«Республиканский научно-практический центр
детской онкологии, гематологии и иммунологии»

**Оппонирующая
организация**

ГУ «Республиканский научно-практический центр
трансфузиологии и медицинских биотехнологий»

Защита состоится 27 мая 2026 года в 14.00 на заседании совета по защите диссертаций Д 03.03.01 при государственном учреждении «Минский научно-практический центр хирургии, трансплантологии и гематологии» по адресу: 220087, г. Минск, ул. Семашко, 8, телефон: 8(017)277-20-18, e-mail: gemotol@mail.ru.

С диссертацией можно ознакомиться в ГУ «Республиканская научная медицинская библиотека».

Автореферат разослан 25 апреля 2026 г.

Ученый секретарь
совета по защите диссертаций,
кандидат медицинских наук, доцент



И.А. Исков

ВВЕДЕНИЕ

Реакция «трансплантат против хозяина» (РТПХ), особенно ее резистентная форма, остается основной причиной смерти реципиентов после аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток [Lopez-Corral L. et al., 2025; Singh R. et al., 2025]. Около 50% пациентов с резистентными к лечению формами оРТПХ погибают, как правило, вследствие ассоциированных с этим процессом инфекций [Malard F. et al., 2020; Ravindranath A., 2025; Ulu B.U. et al., 2025]. В связи с этим, в последнее время активно проводится поиск новых стратегий лечения РТПХ, включающих клеточную терапию, ведущую роль в которой занимают мезенхимальные стволовые клетки (МСК) [Fisher S.A. et al., 2019; Dotoli G.M. et al., 2017; Xiao M., 2025; Daenen, L.G.M. et al., 2025; Bukauskas A. et al., 2025; Yao H. et al., 2025].

Благодаря своим иммунорегуляторным свойствам МСК довольно широко применяются в терапии РТПХ [Huang R. et al., 2024; Olivieri A. et al., 2024; Debes M. et al., 2025; Murata M. et al., 2021; Shen M.Z. et al., 2022; Döring M. et al., 2021]. Однако на сегодняшний день механизмы их иммуномодулирующего действия до конца не изучены, а сведения о взаимодействии МСК с компонентами иммунной системы, представленные в многочисленных литературных источниках, зачастую противоречивы.

Противоречивые данные об эффективности клеточной терапии РТПХ заставляют исследователей проводить глубокий анализ результативности клинического применения МСК [Fisher S.A. et al., 2019; Daenen, L.G.M. et al., 2025; Munneke, J.M. et al., 2016; Galderisi U. et al., 2022; Galipeau J. et al., 2018; Macías-Sánchez M.D.M., 2022]. Однако не только различия в тканевом источнике получения, выборе донора биоматериала, методах культивирования, иммуногенности и пролиферативном потенциале МСК, но также в количестве клеток, кратности их введения и в показаниях для терапии в исследованиях разных авторов не позволяют эффективно сравнить их между собой.

МСК секретируют многочисленные растворимые факторы, обладающие иммуномодулирующим действием [Petinati N.A. et al., 2022]. Поиск биомаркеров, отражающих иммунорегуляторный потенциал МСК, а также изучение взаимодействия этих молекул с иммунокомпетентными клетками в провоспалительном микроокружении при РТПХ во многом определяет результативность клеточной терапии и может быть использовано при выборе тактики лечения пациентов с тяжелыми формами РТПХ.

Совокупность имеющихся данных сегодня не позволяет сформулировать принципы и подходы эффективного использования клеточной терапии. Поэтому необходима разработка критериев подбора МСК с наибольшим

иммуномодулирующим потенциалом, а также выбора пациентов, которые наиболее вероятно ответят на инфузию МСК, что в конечном итоге позволит оптимизировать и повысить эффективность клеточной терапии при РТПХ.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Связь работы с научными программами, темами

Тема диссертации соответствует приоритетным направлениям научно-технической деятельности в Республике Беларусь, утвержденными Указами Президента Республики Беларусь от 22 июля 2010 г. № 378 «Об утверждении приоритетных направлений научно-технической деятельности в Республике Беларусь на 2011-2015 гг.» (п. 33. Медицинские биотехнологии), от 22 апреля 2015 г. № 166 «О приоритетных направлениях научно-технической деятельности на 2016-2020 гг.» (п. 4. Медицина, фармацевтика, медицинская техника: технологии профилактики, диагностики и лечения заболеваний) и от 7 мая 2020 г. № 156 «О приоритетных направлениях научной, научно-технической и инновационной деятельности на 2021-2025 гг.» (п. 2. Биологические, медицинские, фармацевтические и химические технологии и производство: биотехнологии (геномные и постгеномные, клеточные, микробные, медицинские, промышленные).

Диссертационная работа выполнялась на базе государственного учреждения «Минский научно-практический центр хирургии, трансплантологии и гематологии» (далее – ГУ «МНПЦ ХТиГ») в рамках следующих заданий государственных научно-технических программ, государственных программ научных исследований и инновационных проектов:

– «Разработать технологию получения стандартизированного аллогенного трансплантата мезенхимальных стволовых клеток от доноров при проведении мультиорганного забора для создания банка клеточной терапии в Республике Беларусь» (№ госрегистрации 20113498 от 22.09.2011 г., срок выполнения 4 кв. 2011 – 4 кв. 2014 гг.);

– «Разработать и внедрить методы медицинской профилактики и терапии реакции «трансплантат против хозяина» после аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток» (№ госрегистрации 20201094 от 25.06.2020, срок выполнения 1 кв. 2020 – 4 кв. 2022 гг.);

– «Изучить условия индукции и разработать методы повышения иммуномодулирующей активности мезенхимальных стромальных клеток человека» (№ госрегистрации 20240505 от 10.04.2024 г., срок выполнения 1 кв. 2024 – 4 кв. 2026 гг.).

Цель и задачи исследования

Цель исследования: определить прогностические критерии и биомаркеры острой РТПХ (ОРТПХ), обосновать выбор биомедицинского клеточного продукта (БМКП) для клинического применения при ОРТПХ на основе оценки иммунобиологических характеристик МСК и лимфоцитов пациентов после аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (аллоТГСК).

Задачи исследования:

1. разработать критерии прогноза риска развития ОРТПХ на основании оценки функциональных свойств лимфоцитов пар донор-реципиент в смешанной культуре;
2. выявить потенциальные биомаркеры ОРТПХ в посттрансплантационном периоде на основании оценки содержания цитокинов в плазме крови реципиентов аллоТГСК;
3. провести сравнительный анализ продукции цитокинов и иммунорегуляторных молекул интактными МСК и при их совместном культивировании с лимфоцитами пациентов после аллоТГСК;
4. оценить влияние аллогенных МСК на субпопуляционный состав лимфоцитов пациентов после аллоТГСК без проявлений и с проявлениями ОРТПХ при их совместном культивировании *in vitro*;
5. разработать метод предварительной *in vitro* оценки влияния МСК на субпопуляционный состав лимфоцитов пациентов с ОРТПХ для обоснования выбора наиболее оптимального БМКП для клинического применения при ОРТПХ.

Объект и предмет исследования

Объект исследования: культуры мезенхимальных стволовых клеток здоровых доноров, лимфоцитов пациентов после аллоТГСК и их ко-культуры, лимфоциты периферической крови реципиентов аллоТГСК и их доноров в день аллоТГСК, плазма крови здоровых доноров и реципиентов аллоТГСК, кондиционированные среды (супернатанты) клеточных культур и ко-культур, пациенты с ОРТПХ после аллоТГСК.

Предмет исследования: функциональные характеристики лимфоцитов реципиентов аллоТГСК и их доноров, цитокиновый профиль плазмы крови пациентов после аллоТГСК и здоровых доноров, продукция иммунорегуляторных молекул и цитокинов культурами МСК и их ко-культурами с лимфоцитами пациентов после аллоТГСК, иммунофенотипические характеристики лимфоцитов пациентов после аллоТГСК, эффективность применения БМКП на основе МСК при ОРТПХ.

Научная новизна

Определена диагностическая значимость количественной оценки пролиферативной активности лимфоцитов донора и реципиента аллоГСК в смешанной культуре *in vitro* и установлены пороговые значения индекса стимуляции как прогностического фактора риска оРТПХ в посттрансплантационном периоде. Доказано, что концентрация ИЛ-8 более 5,56 пг/мл и ИЛ-21 более 0,218 пг/мл в плазме крови пациентов после аллоТГСК является дополнительным критерием диагностики оРТПХ.

Впервые показано, что для реализации иммуномодулирующих свойств МСК посредством действия растворимой формы sHLA-G необходимо взаимодействие между МСК и лимфоцитами периферической крови.

Предложена *in vitro* модель культивирования лимфоцитов пациентов с оРТПХ одновременно на подложках из нескольких культур МСК с последующей оценкой динамики субпопуляционного состава лимфоцитов.

Научно обоснован подход к выбору БМКП на основе МСК, учитывающий их иммуномодулирующие свойства и функциональные особенности лимфоцитов пациентов и позволяющий персонифицировать клеточную терапию оРТПХ.

Положения, выносимые на защиту

1. Показатели индекса стимуляции лимфоцитов донора выше 9,20, а также лимфоцитов донора и реципиента в смешанной культуре выше 11,55 в день трансплантации ГСК являются критериями прогноза риска развития оРТПХ. Концентрация ИЛ-8 более 5,56 пг/мл и ИЛ-21 более 0,218 пг/мл в плазме крови пациентов после аллоТГСК в посттрансплантационном периоде является дополнительным критерием диагностики оРТПХ.

2. Взаимодействие между МСК и лимфоцитами периферической крови при их совместном культивировании обеспечивает достоверное увеличение продукции sHLA-G и не оказывает влияния на содержание иммунорегуляторной молекулы Gal-1 *in vitro* по сравнению с интактными лимфоцитами.

3. Индивидуальные иммунобиологические особенности лимфоцитов пациентов с оРТПХ и донорских МСК определяют направленность иммуномодулирующего действия последних, проявляющуюся перераспределением субпопуляций иммунокомпетентных клеток пациентов (Т- лимфоцитов, НК-клеток, Т-регуляторных клеток в популяции CD4+- клеток) при их совместном культивировании *in vitro*.

4. Применение разработанного метода подбора БМКП на основе МСК, учитывающего их иммуномодулирующие свойства и функциональные особенности лимфоцитов пациентов с оРТПХ, позволяет персонифицировать клеточную терапию оРТПХ и получить клинический ответ более чем в 80 % случаев.

Личный вклад соискателя ученой степени

Соискателем совместно с научным руководителем сформулированы цель и задачи исследования, а также определены методы и объем исследования. Автором лично выполнен анализ литературы по теме диссертационного исследования, проведен патентный поиск, созданы электронные базы данных, проведена статистическая обработка полученных данных, написаны все разделы диссертации. Соискателем получены основные научные результаты диссертации, сформулированы положения, выносимые на защиту, выводы и практические рекомендации (личный вклад – 90 %).

Соискатель ученой степени принимал непосредственное участие в получении МСК из жировой ткани, постановке культур МСК, лимфоцитов пациентов после аллоТГСК и их совместных культур, смешанных культур доноров и реципиентов аллоГСК, а также в проведении иммуноферментного анализа для оценки продукции растворимых факторов в супернатантах клеточных культур, пролиферативного теста для определения функциональных свойств лимфоцитов периферической крови, подготовке БМКП на основе МСК для клинического применения (личный вклад – 90 %).

Имунофенотипирование МСК и лимфоцитов периферической крови выполнялось совместно с ведущим научным сотрудником научного отдела к.б.н., доцентом Смольниковой В.В., мультиплексный анализ цитокинов – совместно с сотрудниками лаборатории HLA-типирования Старцевой А.Ю., Янушевской Е.А., Гомон А.А., оценка эффективности применения БМКП на основе МСК при оРТПХ проводилась совместно с заведующим гематологическим отделением трансплантации костного мозга №3 к.м.н., доцентом Миланович Н.Ф. (личный вклад – 70 %).

Апробация диссертации и информация об использовании ее результатов

Результаты исследований и основные положения диссертации доложены и представлены на: III Российском национальном конгрессе «Трансплантация и донорство органов» (г. Москва, Российская Федерация, 2-4 октября 2017 г.); VIII Съезде гематологов и трансфузиологов Республики Беларусь (г. Минск, Республика Беларусь, 26-27 октября 2017 г.); Республиканском семинаре «Современные клеточные технологии в медицине» (г. Минск, Республика Беларусь, 15 июня 2018 г.); Международной научно-практической конференции «Трансплантация костного мозга. Проблемы и решения», приуроченной к 25-летию службы трансплантации костного мозга в Республике Беларусь (г. Минск, Республика Беларусь, 18 октября 2018 г.); Республиканском научно-практическом семинаре «Современные клеточные технологии в медицине» (г. Минск, Республика

Беларусь, 5 декабря 2019 г.); IV Национальном конгрессе по регенеративной медицине (г. Москва, Российская Федерация, 19-24 ноября 2019 г.); IX Республиканском съезде трансфузиологов и гематологов с международным участием (г. Минск, Республика Беларусь, 11-12 мая 2023 г.); XXVIII Международном медицинском форуме «Здравоохранение Беларуси» в рамках семинара «Клеточные и генные технологии в лечении онкогематологических заболеваний» (г. Минск, Республика Беларусь, 24 мая 2023 г.).

Результаты диссертации внедрены в образовательный процесс и практическую работу ГУ «МНПЦ ХТиГ» (2 акта внедрения). Утверждена инструкция 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.

Опубликованность результатов диссертации

По теме диссертации опубликовано 14 научных работ, в том числе 5 статей в рецензируемых научных журналах, соответствующих пункту 19 Положения о присуждении ученых степеней и присвоении ученых званий в Республике Беларусь, 1 статья в иных рецензируемых научных журналах, 7 тезисов докладов в сборниках научных работ, материалов конференций, съездов, конгрессов, из них 5 – в зарубежной печати, 1 инструкция по применению. Общий объем опубликованных материалов – 4,62 авторских листа.

Структура и объем диссертации

Диссертация изложена на 110 страницах машинописного текста, содержит 27 рисунков и 10 таблиц, состоит из введения, общей характеристики работы, аналитического обзора литературы, материалов и методов исследования, 3 глав собственных исследований, заключения, библиографического списка, включающего 159 источников (8 – на русском языке, 151 – на английском) и 14 собственных публикаций автора, 5 приложений.

ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

Материал и методы исследования

Объектом исследования являлись: культуры МСК здоровых доноров (n=39), лимфоцитов пациентов после аллоТГСК (n = 42) и их ко-культуры (n=71), лимфоцитов периферической крови здоровых доноров (n = 10) и пациентов в день аллоТГСК (n = 10), плазма крови здоровых доноров (n = 9) и пациентов до аллоТГСК (n = 11), в день (n = 12) и после аллоТГСК (n = 40), супернатанты клеточных культур и ко-культур (n = 78), пациенты с оРТПХ

после аллоТГСК (n = 12).

Выделение лимфоцитов периферической крови и МСК из костного мозга проводили по общепринятой методике на градиенте плотности Ficoll-Paque (Merk, Германия) ($\rho = 1,077$) в соотношении 3:1 из 4-6 мл периферической крови (в случае лимфоцитов) или из 50 мл костного мозга (для выделения МСК).

Выделение МСК из жировой ткани проводили по разработанному ранее протоколу [Кривенко С.И. и соавт., 2013]. Оценка жизнеспособности клеток проводили по исключению красителя трипанового синего.

Морфологический анализ культур проводили на универсальном инвертированном микроскопе («Micros», Австрия и «Nikon», Япония) с применением методов фазового контраста.

Определение фенотипа мезенхимальных стволовых клеток и субпопуляционного состава лимфоцитов выполняли методом лазерной проточной цитофлуориметрии на цитофлуориметре FACS Canto II (Becton Dickinson, США) с использованием программы FACS Diva (Becton Dickinson, США). Для идентификации МСК использовали следующие моноклональные антитела (МКА): CD 45 Per CP, CD 34 FITC, CD 105 PE, CD 90 FITC, CD 13 APC, HLA-DR PC7, CD 73 PC7, CD 29 APC, CD 31 Pacific Blue (Ex Bio, Чехия и Beckman Coulter, США). Для определения субпопуляционного состава лимфоцитов использовалась панель МКА, которая позволяла идентифицировать субпопуляции: CD3+, CD19+, CD16+CD56+, CD3+CD4+, CD3+CD8+, CD4+DR+, CD8+DR+, CD3+CD16+CD56+, CD4+CD25+CD127-.

Для постановки совместных культур МСК и лимфоцитов периферической крови МСК высевали в 24-луночные планшеты по 5000 клеток/см². На 4-5 сутки в те же ячейки вносили лимфоциты, выделенные из крови пациентов после аллоТГСК. Со-культивирование проводили в течение 4 суток. Контролем служили интактные лимфоциты пациентов.

Клеточную пролиферацию в смешанной культуре лимфоцитов оценивали с помощью пролиферативного теста, основанного на включении 5-бромо-2-дезоксинуридина (BrdU) в ДНК пролиферирующих клеток. Лимфоциты реципиента и донора ($100-200 \times 10^3$ на лунку) культивировали в отсутствие и в присутствии митогена (ФГА) в течение 5 суток. К клеткам добавляли реагент BrdU на 12-24 часа. Детектировали образование окрашенного продукта. Результат теста выражали в виде индекса стимуляции.

Количественное определение растворимых молекул sHLA-G и Gal-1 в супернатантах клеточных культур проводили методом иммуноферментного анализа с использованием коммерческих наборов (Cloud – Clone Corp., Китай и Elabscience, Китай соответственно).

Определение уровня цитокинов в плазме крови и супернатантах клеточных культур проводили методом мультиплексного анализа на приборе Luminex 200TM (Luminex Corporation, США).

Статистическую обработку данных проводили с помощью пакета прикладных программ STATISTICA (Version 6.0, StatSoft Inc., США), Microsoft Excel и «MedCalc v. 20.218» (MedCalc Software Ltd, Бельгия). Параметры распределения количественных переменных представляли в виде медианы [минимум; максимум]. Для сравнительного анализа применяли непараметрические методы статистики: для сравнения двух независимых групп по одной количественной переменной использовали тест Манна-Уитни (Mann – Whitney U-test), зависимых групп – критерий Вилкоксона (Wilcoxon signed-rank test). При оценке взаимосвязи двух количественных признаков вычисляли корреляцию по Спирмену (R). Диагностическую значимость биомаркеров оценивали с помощью Receive operative characteristic (ROC) анализа. Различия считали достоверными при значении $p < 0,05$.

Результаты собственных исследований

Оценка функциональных свойств лимфоцитов пар донор-реципиент в смешанной культуре лимфоцитов. Данные, полученные при проведении пролиферативного теста в культурах лимфоцитов доноров, лимфоцитов реципиентов и их смешанных культурах в день трансплантации выражали в виде индекса стимуляции (ИС):

$$ИС = \frac{OD(ФГА) - OD_{фон}(ФГА)}{OD(безФГА) - OD_{фон}(безФГА)} \quad (1)$$

Примечание (1): OD(ФГА) – оптическая плотность в культуре с добавлением ФГА; OD(безФГА) – оптическая плотность в культуре без добавления ФГА; OD_{фон}(ФГА) – оптическая плотность культуральной среды с добавлением ФГА; OD_{фон}(безФГА) – оптическая плотность культуральной среды без добавления ФГА.

Было установлено, что у 7 из 10 реципиентов ИС был равен 1,00, что свидетельствовало об отсутствии у этих пациентов функционально активных Т-лимфоцитов и, следовательно, об эффективности проведенного режима кондиционирования. У 3 реципиентов аллоГСК показатели ИС равнялись или превышали 1,50 (таблица 1). Именно у этих реципиентов впоследствии развилась более тяжелая оРТПХ (II- III стадия) с преимущественным поражением кожи и кишечника.

Таблица 1 - ИС лимфоцитов донора и реципиента в смешанной культуре лимфоцитов *in vitro*

№	Реципиент	Донор	Донор+Реципиент	ОРТПХ	Стадия ОРТПХ (сутки после аллоТГСК)
1	1,00	64,00	171,00	да	I (+92)
2	1,65	33,94	51,37	да	II (+30)
3	1,50	25,60	30,23	да	II-III (+60)
4	1,61	22,48	151,69	да	II (+90)
5	1,00	19,67	8,26	да	I-II (+82)
6	1,00	13,50	13,94	да	I (+17)
7	1,00	10,02	40,39	да	I (+25)
8	1,00	9,20	11,55	нет	–
9	1,00	7,38	4,70	нет	–
10	1,00	3,11	6,48	нет	–

У доноров, чьи реципиенты на момент выписки не имели клинических признаков ОРТПХ, ИС варьировал от 3,11 до 9,20 ($n = 3$) при медиане в данной группе 16,59 [3,11; 64,00], $n = 10$. В смешанных культурах лимфоцитов донора и реципиента ($n = 10$) ИС составил 22,10 [4,70; 171,00].

Проведенный ROC-анализ показал, что оптимальным порогом отсеечения для ИС донора является значение 9,20 с чувствительностью 100 % (95 % ДИ 59,00 %-100,00 %) и специфичностью 100 % (95 % ДИ 29,20 % - 100,00%). Площадь под кривой для данного показателя составила 1,00 (95% ДИ 0,692 - 1,000) при уровне статистической значимости $p < 0,001$ (рисунок 1А).

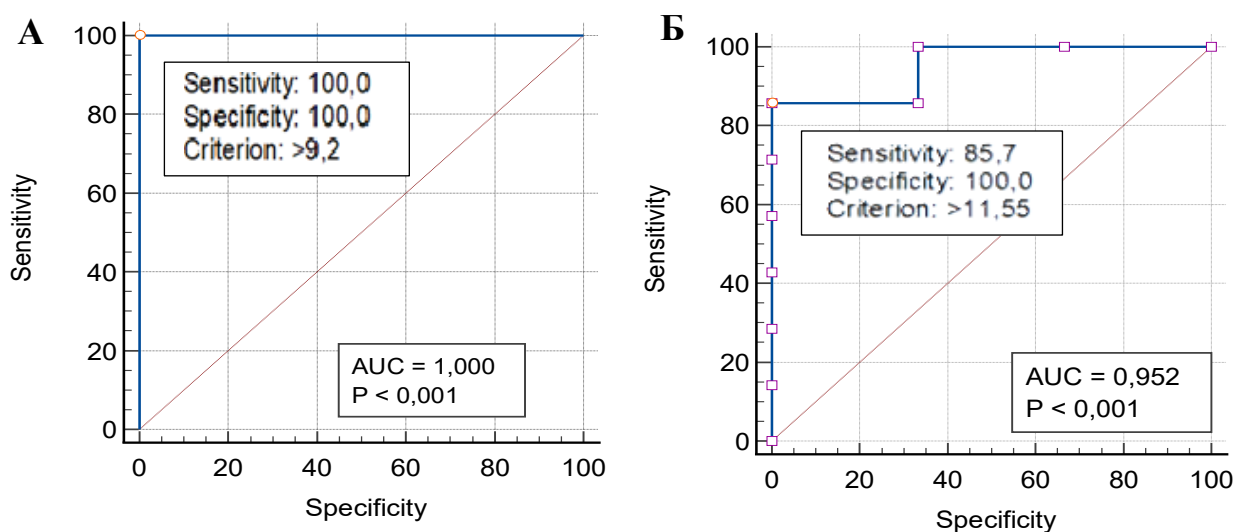


Рисунок 1 – ROC-кривые диагностической модели использования ИС донора (А) и донор/реципиент (Б) для прогноза развития ОРТПХ

Для ИС донор/реципиент оптимальным порогом отсечения было значение 11,55. Чувствительность и специфичность для cut-off составили 85,70 % (95 % ДИ 42,10 % - 99,60 %) и 100% (95 % ДИ 29,20 % - 100,00 %) соответственно. Площадь под кривой для данного показателя составила 0,952 (95 % ДИ 0,622 - 1,000), стандартная ошибка оценки 0,067 при уровне статистической значимости $p < 0,001$ (рисунок 1Б).

Таким образом, количественная оценка пролиферативной активности в смешанной культуре лимфоцитов донора и реципиента *in vitro* отражает их иммунологическую реактивность в организме пациента в посттрансплантационном периоде и может быть использована в качестве критерия прогноза риска развития ОРТПХ. Показатели индекса стимуляции лимфоцитов донора выше 9,20, а также лимфоцитов донора и реципиента в смешанной культуре выше 11,55 позволяют отнести данных пациентов в группу риска развития иммунологических осложнений после аллоТГСК.

Определение биомаркеров ОРТПХ на основании исследования цитокинов плазмы крови. Уровень цитокинов ФНО- α , ИФН- γ , ИЛ-8, ИЛ-10, ИЛ-17А, ИЛ-21, TGF- β анализировали в образцах плазмы крови ($n = 72$), полученных от 9 здоровых доноров и 29 реципиентов аллоТГСК, находившихся на лечении в ОТКМ ГУ «МНПЦ ХТиГ» в «-7» день до трансплантации, день трансплантации, 13-45-е сутки после трансплантации (отстройка кроветворения), а также в сроки появления клинических симптомов ОРТПХ.

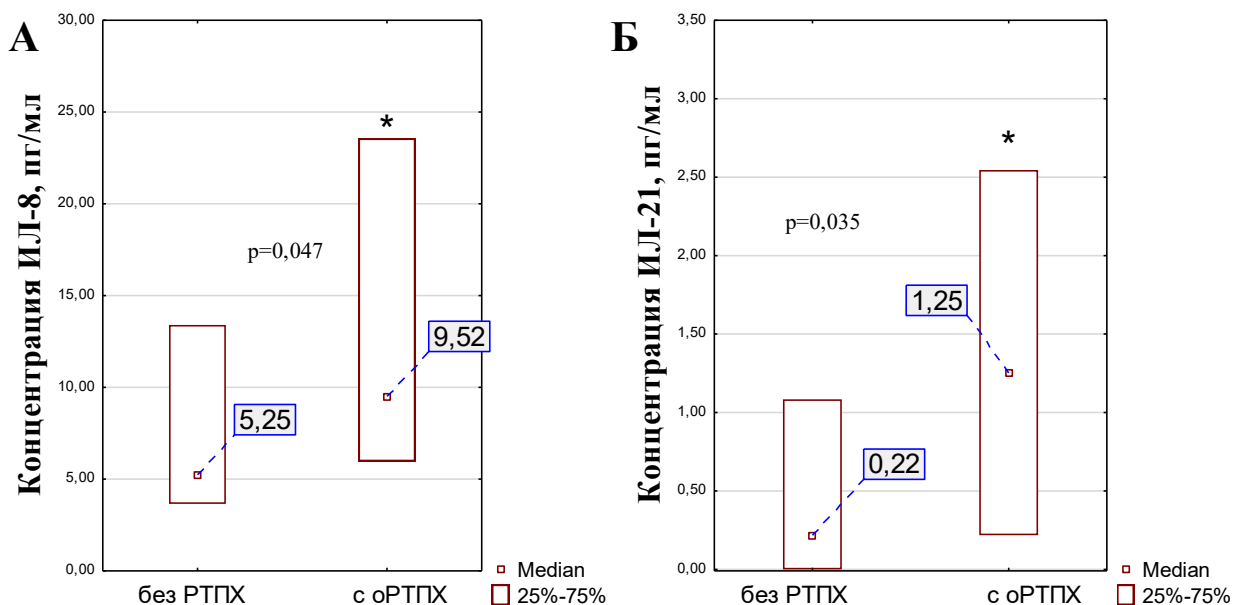
Для оценки влияния предшествующей терапии, а также кондиционирования реципиентов аллоТГСК на уровень цитокинов в плазме крови проводили сравнительное исследование содержания данных цитокинов в группах реципиентов до начала кондиционирования ($n = 11$) и здоровых доноров ($n = 9$), а также реципиентов до начала кондиционирования ($n = 11$) и реципиентов в день трансплантации ($n = 12$). Полученные результаты о статистически значимо более низких уровнях ИФН- γ , ИЛ-8 и ИЛ-17А в группе реципиентов аллоТГСК до начала кондиционирования (11,38 [1,55; 27,56] пг/мл для ИФН- γ ; 1,38 [1,08; 3,64] пг/мл для ИЛ-8; 5,51 [0,00; 27,23] пг/мл для ИЛ-17А, $n = 11$) по сравнению со здоровыми донорами (29,88 [14,65; 80,54] пг/мл для ИФН- γ ; 3,12 [1,39; 6,51] пг/мл для ИЛ-8; 21,22 [11,32; 38,53] пг/мл для ИЛ-17А, $n = 9$) свидетельствуют об уменьшении пула иммунокомпетентных клеток в процессе предшествующей терапии и отражают ее влияние на функциональную активность данных клеток.

Проводимое в процессе подготовки реципиента к трансплантации аллоТГСК кондиционирование оказывало влияние на цитокиновый профиль плазмы крови. При этом, снижение концентрации TGF- β (с 17387,22 [1297,44; 28963,85] пг/мл до 2595,09 [219,29; 17030,50] пг/мл, $p = 0,041$) в процессе

кондиционирования может быть обусловлено гибелью иммунокомпетентных клеток его секретирующих. В то же время достоверное увеличение концентрации ИЛ-8 (с 1,38 [1,08; 3,64] пг/мл до 4,09 [1,80; 16,75] пг/мл, $p = 0,0001$) отражает провоспалительный статус реципиента в день трансплантации, связанный с повреждением тканей и клеток в процессе кондиционирования.

У пациентов с оРТПХ ($n = 19$) по сравнению со здоровыми донорами ($n = 9$) детектировались достоверно более высокие уровни ФНО- α (13,53 [3,38; 106,15] пг/мл и 7,27 [2,89; 11,12] пг/мл, $p = 0,019$), ИЛ-8 (9,52 [1,49; 228,56] пг/мл и 3,12 [1,39; 6,51] пг/мл, $p=0,0005$) и низкие уровни ИЛ-17А (12,25 [0,00; 55,16] пг/мл и 21,22 [11,32; 38,53] пг/мл, $p=0,02$), ИФН- γ (11,19 [0,00; 85,76] пг/мл и 29,88 [14,65; 80,54] пг/мл, $p=0,035$) и TGF- β (3635,00 [538,61; 29247,25] пг/мл и 9307,72 [4076,28; 26765,79] пг/мл, $p=0,0099$), что свидетельствует о наличии аллореактивного микроокружения, которое может оказывать влияние на реализацию иммуномодулирующих эффектов МСК при клеточной терапии данного осложнения аллотГСК.

У пациентов с клиническими признаками оРТПХ ($n = 19$) концентрация ИЛ-8 (9,52 [1,49; 228,6] пг/мл) и ИЛ-21 (1,25 [0,00; 15,63] пг/мл) в плазме крови была статистически значимо выше ($p = 0,047$ и $p = 0,035$ соответственно), чем у пациентов без признаков РТПХ (5,25 [1,74; 112,12] пг/мл для ИЛ-8 и 0,22 [0,00; 11,07] пг/мл для ИЛ-21, $n = 21$), что обосновало выбор данных показателей в качестве потенциальных биомаркеров оРТПХ (рисунок 2).



* - статистически значимые различия ($p < 0,05$) по сравнению с группой пациентов без РТПХ
 Рисунок 2 – Концентрация ИЛ-8 (А) и ИЛ-21 (Б) в плазме крови пациентов с оРТПХ ($n = 19$) и без РТПХ ($n = 21$)

Оценку диагностической значимости концентрации ИЛ-8 и ИЛ-21 в плазме крови в качестве маркеров развития оРТПХ проводили с использованием ROC - анализа. Для ИЛ-8 оптимальным порогом отсечения была концентрация 5,56 пг/мл. Чувствительность и специфичность для cut-off составили 88,90 % (95 % ДИ 65,30 % – 98,60 %) и 57,14 % (95 % ДИ 34,00 % – 78,20 %) соответственно, что можно охарактеризовать как удовлетворительные значения. Площадь под кривой для биомаркера равнялась 0,688 (95 % ДИ 0,520 – 0,826), стандартная ошибка оценки 0,088 и уровень статистической значимости $p = 0,034$ (рисунок 3А).

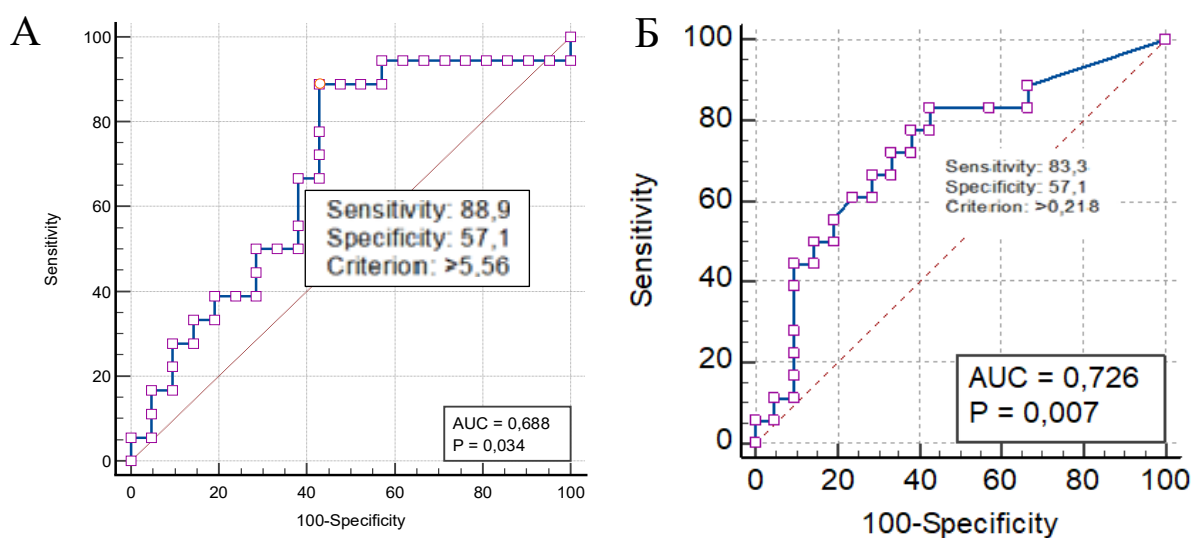


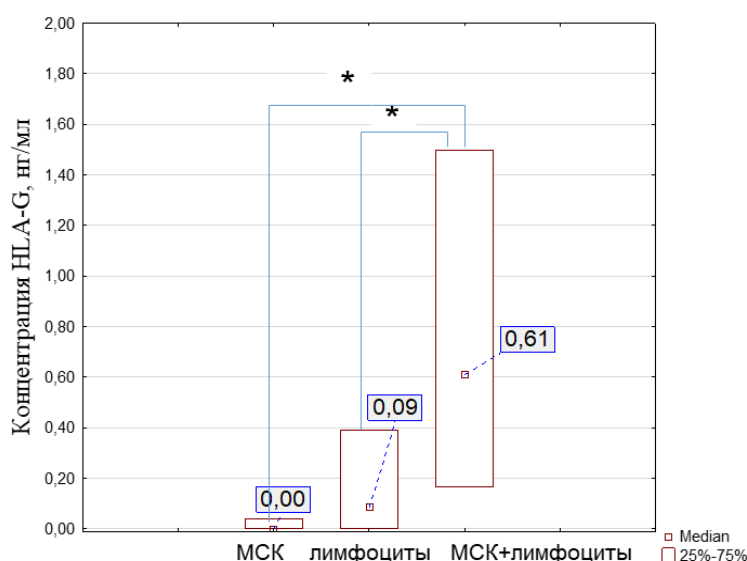
Рисунок 3 – ROC-кривые диагностической модели использования концентрации ИЛ-8 (А) и ИЛ-21 (Б) в плазме крови пациентов после аллотГСК как биомаркеров оРТПХ

Для ИЛ-21 оптимальным порогом отсечения была определена концентрация 0,218 пг/мл. Чувствительность и специфичность для cut-off составили 83,33 % (95 % ДИ 58,6 % - 96,4 %) и 57,14 % (95 % ДИ 34,0 % - 78,2 %) соответственно. Площадь под ROC- кривой для концентрации ИЛ-21 в качестве маркера оРТПХ составила 0,726 (95 % ДИ 0,560 – 0,856) при стандартной ошибке 0,084 и уровне значимости $p = 0,007$ (рисунок 3Б).

Таким образом, были установлены пороговые значения цитокинов ИЛ-8 и ИЛ-21 как биомаркеров развития оРТПХ. Концентрация ИЛ-8 более 5,6 пг/мл и ИЛ-21 более 0,218 пг/мл в посттрансплантационном периоде являются дополнительными критериями диагностики оРТПХ.

Сравнительный анализ продукции растворимой молекулы HLA-G в супернатантах клеточных культур. Уровень продукции молекулы HLA-G оценивался в супернатантах клеточных культур после 72 часов культивирования ($n = 64$): 1) супернатанты культур лимфоцитов пациентов после аллотГСК

(n = 11, из которых 7 образцов были получены от пациентов с признаками ОРТПХ, 4 – от пациентов без признаков РТПХ); 2) супернатанты культур МСК ЖТ и МСК КМ (n = 29); 3) супернатанты культур лимфоцитов пациентов после аллоТГСК на подложке из МСК (n = 24). В ходе исследования было установлено, что интактные лимфоциты пациентов после аллоТГСК, как и интактные МСК характеризовались низким уровнем продукции sHLA-G – (0,09 [0,00; 1,61] нг/мл и 0,00 [0,00; 0,28] нг/мл, соответственно). Совместное культивирование МСК и лимфоцитов пациентов обеспечивало статистически значимое повышение уровня sHLA-G (0,61 [0,00; 13,11] нг/мл) по сравнению с интактными лимфоцитами (p = 0,0095) и МСК (p < 0,0001, рисунок 4).



* - статистически значимые различия (p < 0,05, Mann-Whitney U-test)

Рисунок 4 – Концентрация sHLA-G в супернатантах культур МСК, лимфоцитов пациентов после аллоТГСК и их совместных культур с МСК

Таким образом, для высвобождения растворимой формы HLA-G необходимо взаимодействие между МСК и лимфоцитами периферической крови.

Была выявлена положительная корреляционная связь между уровнями sHLA-G и ИЛ-10 в клеточных культурах (R = 0,55; p = 0,0016 при n = 30), а также достоверная умеренная положительная корреляционная связь (R = 0,57; p < 0,0001, n = 78) между продукцией ИЛ-10 и ИФН-γ в супернатантах клеточных культур.

Оценка продукции растворимой молекулы галектин-1 МСК здоровых доноров и лимфоцитами пациентов после аллоТГСК. Лимфоциты пациентов после аллоТГСК характеризовались более низкой продукцией иммунорегуляторной молекулы галектин-1 (Gal-1) (9,60 [1,65; 45,99] нг/мл) по сравнению с МСК здоровых доноров (44,74 [33,96; 49,04] нг/мл, p = 0,002).

Совместное культивирование лимфоцитов с МСК не оказывало влияния на продукцию данной молекулы, содержание которой регистрировалось на уровне продукции в культуре интактных МСК – 43,51 [35,78; 48,75] нг/мл. Не было выявлено зависимости продукции Gal-1 от концентрации sHLA-G в супернатантах клеточных культур ($R = -0,11$; $p = 0,52$, $n = 35$). Таким образом, взаимодействие МСК и лимфоцитов не способствовало усилению продукции Gal-1 в отличие от sHLA-G.

Изменение субпопуляционного состава лимфоцитов пациентов после аллоТГСК при культивировании с мезенхимальными стволовыми клетками

Оценку влияния МСК на субпопуляционный состав лимфоцитов пациентов после аллоТГСК проводили на модели совместных культур с последующим иммунофенотипированием лимфоцитов. Было исследовано 22 культуры лимфоцитов (из них – 14 от пациентов с ОРТПХ и 8 – без РТПХ) и 33 совместные культуры на подложке из МСК (из них 20 – с лимфоцитами пациентов с ОРТПХ и 13 – с лимфоцитами пациентов без РТПХ).

Несмотря на отсутствие статистически значимых различий между культурами лимфоцитов пациентов с ОРТПХ на подложке из МСК ($n = 20$) по сравнению с лимфоцитами, культивированными без подложки ($n = 14$), по относительному содержанию Т-лимфоцитов (84,95 [45,00; 97,40] % и 95,20 [59,90; 98,60] % соответственно, $p = 0,17$), НК-клеток (13,05 [2,20; 46,80] % и 6,00 [1,20; 32,50] % соответственно, $p = 0,22$), а также Т-регуляторных клеток в популяции CD4⁺-клеток (3,03 [0,00; 9,00] % и 2,03 [0,00; 8,35] % соответственно, $p = 0,16$), наблюдалась тенденция к увеличению Т-регуляторных и НК-клеток в совместных культурах лимфоцитов и МСК. Аналогичная тенденция была характерна и для лимфоцитов пациентов без признаков РТПХ, однако данные изменения были менее выражены, чем в группе с признаками ОРТПХ.

Установлено, что культуры МСК, полученные от разных доноров, обладают различным иммунорегуляторным потенциалом. Относительное содержание CD3⁺CD4⁺HLA-DR⁺, CD3⁺CD8⁺HLA-DR⁺ и CD3⁺CD16⁺CD56⁺ клеток при культивировании лимфоцитов одного и того же пациента с признаками ОРТПХ на подложках из различных культур МСК отличалось практически в 2 раза. Аллореактивность микроокружения (наличие или отсутствие ОРТПХ) также влияет на способность МСК модулировать иммунный ответ и изменять соотношение CD4⁺ и CD8⁺ субпопуляций Т-лимфоцитов *in vitro*. При культивировании лимфоцитов от двух пациентов с признаками ОРТПХ и без таковых на одной и той же культуре МСК наблюдалась тенденция к снижению доли CD8⁺-клеток в общей популяции Т-лимфоцитов периферической крови, однако у пациентов с признаками ОРТПХ данные изменения носили более выраженный характер (27,30 % – для интактных лимфоцитов пациента без РТПХ

и 24,40 % – для лимфоцитов на подложке из МСК; 35,60 % – для интактных лимфоцитов пациента с оРТПХ и 29,00 % – для лимфоцитов на подложке из МСК). Таким образом, не только биологические характеристики МСК, но и аллореактивное микроокружение влияет на способность МСК модулировать иммунный ответ и перераспределять CD4⁺ и CD8⁺ субпопуляции Т-лимфоцитов. Поэтому для повышения эффективности клеточной терапии оРТПХ необходим персонализированный подход к подбору БМКП на основе МСК.

Подбор оптимального БМКП на основе МСК для клинического применения у пациентов с оРТПХ. Для повышения эффективности клеточной терапии оРТПХ был предложен метод предварительной *in vitro* оценки влияния МСК на субпопуляционный состав лимфоцитов пациентов с оРТПХ, учитывающий изменение относительного содержания CD3⁺-, CD3⁺CD8⁺-, CD8⁺HLA-DR⁺-, CD4⁺CD25⁺CD127⁻-лимфоцитов на подложке из МСК по сравнению с интактными лимфоцитами.

В исследование было включено 26 пациентов с оРТПХ, проходивших лечение в ОТКМ ГУ «МНПЦ ХТиГ». Образцы МСК (2-4 шт.) отбирались из фонда Банка МСК ГУ «МНПЦ ХТиГ» для постановки совместных культур с лимфоцитами пациента. Оценка эффективности подбора на основании анализа динамики субпопуляций лимфоцитов выполнена 12 пациентам (14 пациентов после получения клеточной терапии были переведены на амбулаторное наблюдение). По результатам иммунофенотипирования предпочтительным считалось использование МСК со следующими характеристиками: снижение процентного соотношения CD3⁺-, CD3⁺CD8⁺-, CD8⁺HLA-DR⁺-лимфоцитов и увеличение процентного соотношения CD4⁺CD25⁺CD127⁻-лимфоцитов на подложке из МСК по сравнению с интактными лимфоцитами. Подобранным считали БМКП при соответствии его всем 4 критериям, частично подобранным – при соответствии не менее, чем 2 из 4 критериев.

Всего из 12 пациентов кожная форма оРТПХ была у 5 пациентов, кишечная – у 4, кожная и кишечная – у 3 пациентов. По результатам подбора МСК 7 пациентов получили БМКП, полностью соответствующий установленным критериям, 3 пациента – частично соответствующий и 2-м пациентам не удалось подобрать БМКП с оптимальными параметрами. В нашем исследовании 5 из 12 пациентов (42 %) соответствовали иммунологическим критериям группы высокого риска по развитию оРТПХ [14–А]. Двое из этих 5 пациентов умерли вследствие нарастания тяжести оРТПХ (кишечная форма), несмотря на продолжительную клеточную терапию (кратность введения МСК 5 и 9 раз). Из 7 пациентов, получивших подобранный БМКП, у 5 купирование симптомов оРТПХ произошло за 1–4 дня (кожная форма оРТПХ – 3 пациента, кишечная – 2 пациента), у 1 пациента стабилизация состояния была достигнута

в течение 1 месяца (кожная и кишечная форма оРТПХ), у 1 пациента частичный ответ был достигнут через 4 дня (кожная и кишечная форма оРТПХ, таблица 2 - 3). У 3 пациентов, получивших частично соответствующий БМКП, частичный ответ наблюдался через 4 дня (кожная оРТПХ, 1 введение), через 11 дней (кишечная форма, 2 введения) и 30 дней (кожная форма, 2 введения).

Таблица 2 – Результаты терапии пациентов группы высокого риска развития оРТПХ с применением метода подбора БМКП

Пациент	Форма и стадия оРТПХ		Кратность введения БМКП			Ответ, сутки	
	кожная	кишечная	всего	подобранный	частично подобранный	частичный	полный
1	+ (I-II)	–	1	–	1	4	6
2	+ (II-III)	–	1	–	–	–	–
3	–	+ (II)	2	–	2	11	–
4	–	+ (II)	5	–	–	–	–
5	+ (II-III)	+ (IV)	9	1	–	4	–

Таблица 3 – Результаты терапии пациентов группы стандартного риска развития оРТПХ с применением метода подбора БМКП

Пациент	Форма и стадия РТПХ		Кратность введения БМКП			Ответ, сутки	
	кожная	кишечная	всего	подобранный	частично подобранный	частичный	полный
1	+ (III)	+ (I)	1	1	–	2	3
2	+ (I)	–	1	1	–	1	
3	+ (I)	–	2	1	–	1	1
4	–	+ (II)	2	2	–	3	4
5	–	+ (I-II)	4	4	–	4	7
6	+ (I)	+ (III)	3	1	–	30	–
7	+ (I-II)	–	4	–	2	1	30

Полный ответ в группе пациентов высокого риска был достигнут у 1 пациента (20 %), частичный – у 2 (40 %), не было ответа – у 2 (40 %). Пациентам, не ответившим на клеточную терапию, не удалось подобрать БМКП. У всех пациентов группы стандартного риска был достигнут либо полный (5 из 7, 71 %), либо частичный ответ (2 из 7, 29 %). Таким образом, использование предложенного метода подбора МСК позволило достичь полного либо частичного ответа на клеточную терапию в 10 из 12 случаев (83 %).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Основные научные результаты диссертации

1. Количественная оценка пролиферативной активности в смешанной культуре лимфоцитов донора и реципиента *in vitro* отражает их иммунологическую реактивность в организме пациента в посттрансплантационном периоде и является дополнительным критерием прогнозирования риска развития оРТПХ. Значение индекса стимуляции лимфоцитов донора выше 9,20, а также лимфоцитов донора и реципиента в смешанной культуре выше 11,55 позволяют отнести данных пациентов в группу риска развития иммунологических осложнений после трансплантации аллоГСК [3–А].

2. оРТПХ сопровождается увеличением концентрации ИЛ-8 и ИЛ-21 в плазме крови. У пациентов с клиническими признаками оРТПХ ($n = 19$) уровень ИЛ-8 (9,52 [1,49; 228,56] пг/мл) и ИЛ-21 (1,25 [0,00; 15,63] пг/мл) в плазме крови был статистически значимо выше, чем у пациентов без признаков РТПХ ($n = 21$): 5,25 [1,74; 112,12] пг/мл для ИЛ-8 ($p = 0,047$) и 0,22 [0,00; 11,07] пг/мл для ИЛ-21 ($p = 0,035$). Пороговые значения ИЛ-8 $>5,56$ пг/мл и ИЛ-21 $>0,218$ пг/мл служат дополнительными диагностическими признаками оРТПХ. [2–А; 3–А; 10–А].

Цитокиновый профиль плазмы крови пациентов с оРТПХ отличается от такового у здоровых доноров (достоверно более высокие уровни ФНО- α ($p = 0,019$), ИЛ-8 ($p = 0,0005$) и низкие уровни ИЛ-17А ($p = 0,02$), ИФН- γ ($p = 0,035$) и TGF- β ($p = 0,0099$) по сравнению со здоровыми донорами), что оказывает влияние на реализацию и направленность иммуномодулирующего действия МСК при их применении для коррекции данного осложнения аллоТГСК [2–А].

3. Для реализации иммуномодулирующих свойств МСК посредством высвобождения растворимой молекулы HLA-G необходимо взаимодействие между МСК и лимфоцитами периферической крови, что подтверждается статистически значимым увеличением продукции sHLA-G (0,61 [0,00; 13,11] нг/мл) при совместном культивировании МСК и лимфоцитов по сравнению с интактными лимфоцитами (0,09 [0,00; 1,61] нг/мл, $p = 0,0095$) и МСК (0,00 [0,00; 0,28] нг/мл, $p < 0,0001$). Совместное культивирование МСК и лимфоцитов периферической крови не оказывает влияния на продукцию иммунорегуляторной молекулы Gal-1, содержание которой в совместных культурах регистрировалось на уровне продукции в культуре интактных МСК – 43,50 [35,80; 48,75] нг/мл [5–А; 6–А; 8–А; 11–А; 12–А].

Выявленная положительная корреляционная связь между уровнями растворимой молекулы sHLA-G и ИЛ-10 ($R = 0,55$; $p = 0,0016$ при $n = 30$), а также зависимость продукции ИЛ-10 от содержания ИФН- γ в супернатантах клеточных культур ($R = 0,57$; $p < 0,0001$, $n = 78$) экспериментально обосновывает возможность применения экзогенного ИФН- γ для стимуляции МСК с целью усиления их иммуномодулирующих свойств [5–А; 6–А; 8–А; 11–А].

4. Разнонаправленное изменение субпопуляционного состава лимфоцитов пациентов с оРТПХ в ответ на присутствие МСК ($n = 20$) по сравнению с лимфоцитами, культивированными без МСК ($n = 14$), обусловлено индивидуальными иммунобиологическими особенностями донорских МСК и характеристикой аллореактивного микроокружения лимфоцитов пациента [1–А; 4–А; 9–А; 13–А].

5. Разработан метод выбора МСК, основанный на предварительной *in vitro* оценке влияния МСК на субпопуляционный состав лимфоцитов пациентов с оРТПХ с последующей оценкой изменений относительного содержания $CD3^+$ -лимфоцитов, $CD3^+CD8^+$ -лимфоцитов, $CD8^+HLA-DR^+$ -лимфоцитов, $CD4^+CD25^+CD127^-$ -лимфоцитов на подложке из МСК по сравнению с интактными лимфоцитами. Применение данного метода персонифицированного подбора БМКП с целью иммунокоррекции при оРТПХ позволило достигнуть полного или частичного клинического ответа на клеточную терапию более чем в 80% случаев [4–А].

Рекомендации по практическому использованию результатов

1. В качестве критерия прогноза риска развития оРТПХ целесообразно использовать в день трансплантации ГСК количественную оценку пролиферативной активности лимфоцитов реципиента и донора в смешанной культуре, что позволяет определить степень их реактивности в посттрансплантационном периоде. Показатели индекса стимуляции лимфоцитов донора выше 9,20, а также лимфоцитов донора и реципиента в смешанной культуре выше 11,55 являются дополнительными факторами риска развития оРТПХ [3–А].

2. Концентрации ИЛ-8 более 5,56 пг/мл и ИЛ-21 более 0,218 пг/мл в плазме крови пациентов после аллотГСК в посттрансплантационном периоде являются дополнительными критериями диагностики оРТПХ, оценка которых позволяет персонифицировать тактику ведения пациентов после аллотГСК [3–А].

3. При получении биомедицинских клеточных продуктов на основе МСК для иммунокоррекции ОРТПХ, целесообразно оценивать уровни секреции sHLA-G и ИЛ-10 в смешанных культурах и отдавать предпочтение культурам с максимально высокими показателями данных иммуномодулирующих факторов [5–А; 6–А; 8–А; 11–А].

4. Для повышения эффективности иммунокоррекции при ОРТПХ необходим персонафицированный подход к подбору БМКП на основе МСК с использованием предложенного метода предварительной *in vitro* оценки влияния МСК на субпопуляционный состав лимфоцитов пациентов в совместных культурах [1–А; 4–А; 9–А; 13–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. Оценка изменения популяционного состава лимфоцитов реципиентов с реакцией «трансплантат против хозяина» в ко-культуре с МСК / Е. А. Примакова, В. В. Смольникова, В. Ю. Гриневич, Е. Г. Петровская, Е. А. Назарова, А. А. Сыманович, Н. И. Дедюля, Н. Ф. Миланович, С. И. Кривенко // Новости медико-биологических наук. – 2020. – Т. 20, № 4. – С. 12–18.

2–А. Цитокины плазмы крови как потенциальные биомаркеры реакции «трансплантат против хозяина» в раннем посттрансплантационном периоде / Е. А. Примакова, С. И. Кривенко, А. А. Сыманович, Е. Г. Петровская, Е. А. Назарова, И. А. Романова, Е. А. Янушевская, А. Ю. Старцева, Н. И. Дедюля, Н. Ф. Миланович, А. Л. Усс // Новости медико-биологических наук. – 2023. – Т. 23, № 2. – С. 55–61.

3–А. Функциональные свойства лимфоцитов и цитокиновый профиль плазмы реципиентов аллогенных гемопоэтических стволовых клеток как факторы риска развития острой реакции «трансплантат против хозяина» / Е. А. Примакова, С. И. Кривенко, А. А. Сыманович, Е. Г. Юркина, Е. А. Назарова, Е. А. Янушевская, Н. И. Дедюля, И. А. Романова, А. Ю. Старцева, Н. Ф. Миланович, А. Л. Усс, О. О. Руммо // Доклады Национальной академии наук Беларуси. – 2025. – Т. 69, № 1. – С. 48–56.

4–А. Современные подходы к применению мезенхимальных стволовых клеток в онкогематологии / Е. А. Примакова, С. И. Кривенко, В. В. Смольникова, Е. А. Назарова, А. А. Сыманович, Е. Г. Юркина, Н. И. Дедюля, И. А. Романова, Н. Ф. Миланович // Журнал Белорусского государственного университета. Экология. – 2025. – № 2. – С. 68–77.

5–А. Роль растворимых факторов в МСК-опосредованной иммунорегуляции / Е. А. Примакова, С. И. Кривенко, Е. А. Назарова, А. А. Сыманович, Е. Г. Юркина, А. А. Гомон, Н. И. Дедюля, Н. Ф. Миланович, С. В. Коротков // Медико-биологические проблемы жизнедеятельности. – 2025. – № 2. – С. 21–26.

Статьи в журналах и сборниках научных трудов

6–А. Роль молекулы sHLA-IG в реализации иммуномодулирующего эффекта мезенхимальных стволовых клеток *in vitro* / Е. А. Примакова, В. В. Смольникова, А. А. Коритко, Н. И. Дедюля, А. А. Гомон,

Е. Г. Петровская, Е. С. Бузук, В. Ю. Гриневич, Н. Ф. Миланович, С. И. Кривенко // Гематология. Трансфузиология. Восточная Европа. – 2017. – Т. 3, № 4. – С. 785–791.

Материалы съездов, конференций, симпозиумов, тезисы докладов

7–А. Трансплантат мезенхимальных стволовых клеток из жировой ткани: получение, стандартизация и использование / С. И. Кривенко, Е. А. Назарова, Е. А. Селезнева (Е. А. Примакова), А. А. Коритко, Н. И. Дедюля, А. Л. Усс, В. В. Смольникова, Е. С. Бузук // Актуальные вопросы гематологии : материалы науч.-практ. конф. с междунар. участием, Гомель, 15–16 сент. 2011 г. – [Опубл. в журн.] Проблемы здоровья и экологии. – 2011. – Прил. № 2 к № 2. – С. 55–57.

8–А. Роль HLA G в МСК-опосредованной иммуносупрессии / Е. А. Примакова, В. В. Смольникова, А. А. Коритко, Н. И. Дедюля, А. А. Гомон, Е. Г. Петровская, Е. С. Бузук, Н. Ф. Миланович, С. В. Коротков, С. И. Кривенко // Трансплантация и донорство органов : материалы Третьего Рос. нац. конгр. с междунар. участием : тез. докл., Москва, 2–4 окт. 2017 г. / М-во здравоохранения Рос. Федерации [и др.] ; под ред. С. В. Готье. – [Опубл. в журн.] Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2017. – Т. 19, прил. – С. 199.

9–А. Влияние микроокружения на иммуномодулирующий эффект МСК *in vitro* / Е. А. Примакова, А. А. Коритко, Н. И. Дедюля, В. В. Смольникова, В. Ю. Гриневич, Е. Г. Петровская, Е. С. Бузук, А. А. Гомон, Н. Ф. Миланович, С. И. Кривенко // IX Всероссийский съезд трансплантологов : материалы съезда : тез. докл., Москва, 17–19 сент. 2018 г. / М-во здравоохранения Рос. Федерации [и др.] ; под ред. С. В. Готье. – [Опубл. в журн.] Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2018. – Т. 20, прил. – С. 142.

10–А. Возможности использования плазменных цитокинов в качестве потенциальных биомаркеров в ранней диагностике РТПХ после аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток / Е. А. Примакова, А. А. Сыманович, А. А. Гомон, Е. Г. Петровская, Е. А. Бузук, Е. А. Назарова, Е. А. Янушевская, А. Ю. Старцева, Н. И. Дедюля, Н. Ф. Миланович, А. Л. Усс, С. И. Кривенко // Трансплантация костного мозга. Проблемы и решения : тез. докл. Междунар. науч.-практ. конф., [Минск, 18 окт. 2018 г.]. – [Опубл. в журн.] Гематология. Трансфузиология. Восточная Европа. – 2018. – Т. 4, № 3. – С. 444–445.

11–А. Растворимые факторы в реализации иммунорегуляторного потенциала мезенхимальных стволовых клеток в терапии РТПХ / Е. А. Примакова, А. А. Сыманович, Е. Г. Петровская, Н. И. Дедюля, Е. С. Бузук, Е. А. Назарова, А. А. Гомон, А. Ю. Старцева, В. В. Смольникова, В. Ю. Гриневич, Н. Ф. Миланович, С. И. Кривенко // Материалы Балтийского симпозиума по

иммунологии, молекулярной и регенеративной медицине с международным участием : науч. электрон. изд., Калининград, 22–23 нояб. 2018 г. / М-во здравоохранения Калинингр. обл. ; под. ред. Л. С. Литвиновой. – Калининград, 2018. – С. 53–56.

12–А. Галектин-1 и его роль в реализации иммунорегуляторных функций мезенхимальных стволовых клеток / Е. А. Примакова, А. А. Сыманович, Е. Г. Петровская, Е. А. Назарова, Е. С. Бузук, Н. И. Дедюля, С. В. Коротков, С. И. Кривенко // Трансплантация и донорство органов : материалы Четвертого Рос. нац. конгр. : тез. докл., Москва, 7–9 окт. 2019 г. / М-во здравоохранения Рос. Федерации [и др.] ; под ред. С. В. Готье. – [Опубл. в журн.] Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2019. – Т. 21, прил. – С. 159.

13–А. Анализ влияния аллогенных мезенхимальных стволовых клеток на субпопуляционный состав лимфоцитов реципиентов аллогенных гемопоэтических стволовых клеток при их совместном культивировании *in vitro* / Е. А. Примакова, А. А. Сыманович, Е. Г. Петровская, Е. А. Назарова, Н. И. Дедюля, Е. С. Бузук, В. В. Смольникова, В. Ю. Гриневич, Н. Ф. Миланович, С. И. Кривенко // Материалы IV Национального конгресса по регенеративной медицине, Москва, 20–23 нояб. 2019 г. – [Опубл. в журн.] Гены и клетки. – 2019. – Т. 14, прил. – С. 191–192.

Инструкция по применению

14–А. Методы медицинской профилактики и терапии реакции «трансплантат против хозяина» после аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток: инструкция по применению № 142-1222 : утв. М-вом здравоохранения Респ. Беларусь 23.12.2022 / ГУ «Минский научно-практический центр хирургии, трансплантологии и гематологии» ; А.Л. Усс, Н. Ф. Миланович, В. В. Смольникова, О. В. Нечай, Е. А. Примакова, М. А. Усс. – Мн., 2022. – 10 с.

РЭЗІЮМЭ

Прымакова Яўгенія Аляксееўна

Абгрунтаванне выбару мезенхімальных ствалавых клетак для прымянення пры вострай рэакцыі «трансплантат супраць гаспадара» на аснове ацэнкі іх імунабіялагічных характарыстык

Ключавыя словы: мезенхімальныя ствалавыя клеткі (МСК), рэакцыя «трансплантат супраць гаспадара» (РТСГ), індэкс стымуляцыі, біямаркеры вострай РТСГ, імунарэгуляторныя малекулы

Мэта даследавання: вызначыць прагнастычныя крытэрыі і біямаркеры развіцця вострай РТСГ (вРТПХ), абгрунтаваць выбар біямедыцынскага клеткавага прадукту (БМКП) для клінічнага прымянення пры вРТПХ на аснове ацэнкі імунабіялагічных характарыстык МСК і лімфацытаў пацыентаў пасля алагеннай трансплантацыі гемапаэтычных ствалавых клетак (алаТГСК).

Метады даследавання: культуральныя, праточная цытаметрыя, імунаферментны і мультыплексны аналіз, статыстычныя.

Атрыманыя вынікі і іх навізна. Упершыню вызначана дыягнастычная значнасць і ўстаноўлены парогавыя значэнні індэкса стымуляцыі лімфацытаў донара і рэцыпіента гемапаэтычных ствалавых клетак ў змяшанай культуры *in vitro* як прагнастычнага фактару рызыкі развіцця вРТСГ. Даказана, што канцэнтрацыя ІЛ-8 больш за 5,6 пг/мл і ІЛ-21 больш за 0,218 пг/мл у плазме крыві пацыентаў пасля алаТГСК з'яўляецца дадатковым крытэрам дыягностыкі вРТСГ у посттрансплантацыйным перыядзе. Упершыню паказана, што для рэалізацыі імунамадулюючых уласцівасцяў МСК праз прадукцыю растваральнай формы sHLA-G неабходна ўзаемадзеянне паміж МСК і лімфацытамі перыферычнай крыві. Навукова абгрунтаваны падыход да выбару БМКП на аснове МСК, які ўлічвае іх імунамадулюючыя ўласцівасці і функцыянальныя асаблівасці лімфацытаў пацыентаў з вРТСГ, што дазваляе персаніфікаваць клеткавую тэрапію вРТСГ і атрымаць клінічны адказ больш чым у 80% выпадкаў.

Рэкамендацыі па выкарыстанні. Вынікі даследавання могуць выкарыстоўвацца для прагнозу рызыкі развіцця і дыягностыкі вРТСГ, а таксама для аптымізацыі выбару БМКП на аснове МСК і персаніфікацыі клеткавай тэрапіі вРТСГ.

Вобласць ужывання: клеткавыя тэхналогіі, рэгенератыўная медыцына, клеткавая тэрапія, гематалогія.

РЕЗЮМЕ

Примакова Евгения Алексеевна

Обоснование выбора мезенхимальных стволовых клеток для применения при острой реакции «трансплантат против хозяина» на основе оценки их иммунобиологических характеристик

Ключевые слова: мезенхимальные стволовые клетки (МСК), реакция «трансплантат против хозяина» (РТПХ), индекс стимуляции, биомаркеры острой РТПХ, иммунорегуляторные молекулы

Цель исследования: определить прогностические критерии и биомаркеры острой РТПХ (ОРТПХ), обосновать выбор биомедицинского клеточного продукта (БМКП) для клинического применения при ОРТПХ на основе оценки иммунобиологических характеристик МСК и лимфоцитов пациентов после аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (аллоТГСК).

Методы исследования: культуральные, проточная цитометрия, иммуноферментный и мультиплексный анализ, статистические.

Полученные результаты и их новизна. Впервые определена диагностическая значимость и установлены пороговые значения индекса стимуляции лимфоцитов донора и реципиента гемопоэтических стволовых клеток в смешанной культуре *in vitro* как прогностического фактора риска развития ОРТПХ. Доказано, что концентрация ИЛ-8 более 5,6 пг/мл и ИЛ-21 более 0,218 пг/мл в плазме крови пациентов после аллоТГСК является дополнительным критерием диагностики ОРТПХ в посттрансплантационном периоде. Впервые показано, что для реализации иммуномодулирующих свойств МСК посредством действия растворимой формы sHLA-G необходимо взаимодействие между МСК и лимфоцитами периферической крови. Научно обоснован подход к выбору БМКП на основе МСК, учитывающий их иммуномодулирующие свойства и функциональные особенности лимфоцитов пациентов с ОРТПХ, позволяющий персонифицировать клеточную терапию ОРТПХ и получить клинический ответ более чем в 80% случаев.

Рекомендации по использованию. Результаты исследования могут использоваться для прогноза риска развития и диагностики ОРТПХ, а также для оптимизации выбора БМКП на основе МСК и персонификации клеточной терапии ОРТПХ.

Область применения: клеточные технологии, регенеративная медицина, клеточная терапия, гематология.

SUMMARY

Prymakova Evgeniya Alekseevna

Rationale for selection of mesenchymal stem cells for use in acute graft-versus-host disease based on assessment of their immunobiological characteristics

Keywords: mesenchymal stem cells (MSCs), graft-versus-host disease (GVHD), stimulation index, acute GVHD biomarkers, immunoregulatory molecules

The aim of the study: to determine prognostic criteria and biomarkers for the development of acute GVHD (aGVHD), to justify the choice of a biomedical cell product (BMCP) for clinical use in aGVHD based on an assessment of the immunobiological characteristics of MSCs and lymphocytes of patients after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (alloHSCT).

Research methods: culture, flow cytometry, enzyme immunoassay and multiplex analysis, statistical.

Obtained results and their novelty. For the first time, the diagnostic significance was determined and the threshold values of the lymphocyte stimulation index of the donor and recipient of hematopoietic stem cells in a mixed culture *in vitro* were established as a prognostic risk factor for the development of aGVHD. It has been proven that the concentration of IL-8 more than 5,6 pg/ml and IL-21 more than 0,218 pg/ml in the blood plasma of patients after alloHSCT is an additional criterion for the diagnosis of aGVHD in the post-transplant period. It has been shown for the first time that in order to realize the immunomodulatory properties of MSCs through the action of the soluble form of sHLA-G, interaction between MSCs and peripheral blood lymphocytes is necessary. A scientifically proven approach to the selection of BMCP based on MSC, taking into account their immunomodulatory properties and functional features of the lymphocytes of patients with aGVHD, what allows to personalize aGVHD cell therapy and obtain a clinical response in more than 80% of cases.

Recommendations for use. The results of the study can be used to predict the risk of developing and diagnosing aGVHD, as well as to optimize the choice of BMCP based on MSCs and to personalize aGVHD cell therapy.

Application: cellular technologies, regenerative medicine, cell therapy, hematology.