



<https://doi.org/10.34883/PI.2024.10.3.004>
УДК: 616.34-002-085:616.419-018.4



Исайкина Я.И.✉, Емельянова И.В., Лях Е.Г., Углова Т.А., Новикова М.А., Савич Ю.В., Жерносеченко А.А.

Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии, Минск, Беларусь

Оценка эффективности применения мезенхимальных стволовых клеток плаценты в лечении приобретенной апластической анемии у детей

Конфликт интересов: не заявлен.

Вклад авторов: концепция и дизайн исследования – Исайкина Я.И.; сбор и обработка материала – Емельянова И.В., Лях Е.Г., Новикова М.А., Савич Ю.В., Жерносеченко А.А.; анализ и интерпретация данных, подготовка текста рукописи – Исайкина Я.И., Углова Т.А.; научное редактирование статьи – Углова Т.А.; окончательное одобрение рукописи – Углова Т.А., Исайкина Я.И.

Подана: 20.07.2024

Принята: 10.09.2024

Контакты: yaninai@mail.ru, lyakhelena@gmail.com, druglova@mail.ru, power_shine@mail.ru, julia90pekhota@tut.by, sapphire.anna@gmail.com

Резюме

Введение. Приобретенная апластическая анемия (ПАА) – это заболевание кроветворной системы с резким угнетением всех ростков гемопоэза, обусловленное ауто-иммунным процессом или дефектом стволовых клеток. Мезенхимальные стволовые клетки (МСК) обладают выраженными иммуносупрессивными свойствами и способностью поддерживать гемопоэз.

Цель исследования. Оценка эффективности применения биомедицинского клеточного продукта (БМКП) МСК плаценты для лечения детей с тяжелой ПАА.

Материалы и методы. Тридцать три пациента в возрасте от 1 года до 16 лет, которым была назначена иммуносупрессивная терапия (ИСТ), были включены в исследование. Девять из них получили дополнительно БМКП МСК плаценты в кумулятивной дозе $9,4 (8,3-13,3) \times 10^6/\text{кг}$, 14 пациентов – БМКП МСК костного мозга в дозе $3,7 (2,2-8,7) \times 10^6/\text{кг}$, и 10 пациентов (группа контроля) получили стандартную ИСТ.

Результаты. Результаты показали, что 78% пациентов, получивших БМКП МСК плаценты, ответили на ИСТ к 180-му дню и 86% сохранили гематологический ответ к 360-му дню, тогда как в группе контроля таких пациентов было 50% и 40% соответственно, при этом только пациенты с дополнительным введением МСК плаценты достигли полного гематологического ответа ($p=0,0177$). Различия в достижении как полного, так и частичного гематологического ответа между группами, получившими МСК плаценты и МСК костного мозга, отсутствовали.

Заключение. Использование БМКП МСК плаценты при ИСТ у детей с тяжелой ПАА позволяет увеличить частоту достижения стойкого гематологического ответа на ИСТ у детей с тяжелой ПАА и по эффективности не уступает БМКП МСК костного мозга.

Ключевые слова: тяжелая приобретенная апластическая анемия, дети, мезенхимальные стволовые клетки

Isaikina Y., Yemialyanova I., Liakh E., Uglova T., Novikova M., Savich Y., Zhernasechenka A.
Republican Scientific and Practical Center of Children's Oncology, Hematology
and Immunology, Minsk, Belarus

Efficacy of Placenta-Derived Mesenchymal Stem Cells in the Treatment of Acquired Aplastic Anemia in Children

Conflict of interest: nothing to declare.

Authors' contribution: the concept and design of the study – Isaikina Y.; collection and processing of material – Yemialyanova I., Liakh E., Novikova M., Savich Y., Zhernasechenka A.; analysis and interpretation of data, preparation of the text of the manuscript – Isaikina Y., Uglova T.; scientific editing of the article – Uglova T.; final approval of the manuscript – Uglova T., Isaikina Y.

Submitted: 20.07.2024

Accepted: 10.09.2024

Contacts: yaninai@mail.ru, lyakhchelena@gmail.com, druglova@mail.ru, power_shine@mail.ru, julia90pekhotatut.by, sapphire.anna@gmail.com

Abstract

Introduction. Acquired aplastic anemia (AA) is hemopoietic system diseases caused by an autoimmune process or hematopoietic stem and progenitor cells failure. Mesenchymal stem cells (MSCs) derived from the placenta tissue (MSCs-PI) have high immunosuppressive potential and the ability to support hematopoiesis.

Purpose. To evaluate the effect of the use of MSCs-PI for the treatment severe AA in children.

Materials and methods. We included 23 patients from 1 to 16 years old with severe AA, who received immunosuppressive therapy (IST). Patients in the study group (n=9) received additional MSCs-PI in total dose $9.4 (8.3-13.3) \times 10^6/\text{kg}$, 14 patients received MSCs from bone marrow in total dose $3.7 (2.2-8.7) \times 10^6/\text{kg}$, while patients in the control group received only standard IST.

Results. The result indicated that 78% of patients in MSCs-PI group achieved hematological response at 180 days and 86% patients saved it at 360 days that is significantly higher than in standard IST group – 50% and 40% of cases respectively. Important that only patients with MSCs-PI (22%) achieved hematological complete response ($p=0.0177$). The response rate to therapy didn't different between patients received MSCs-PI or MSCs from bone marrow.

Conclusion. We conclude that the use of placental MSCs in IST allows children with severe AA to achieve a sustained hematological response with a higher complete response rate, and therapeutic efficacy of placental MSCs is comparable to bone marrow MSCs.

Keywords: acquired severe aplastic anemia, children, mesenchymal stem cells

■ ВВЕДЕНИЕ

Приобретенная апластическая анемия (ПАА) – это группа заболеваний кроветворной системы с резким угнетением эритроидного, миелоидного и мегакариоцитарного ростков гемопоэза. Прогрессирующий геморрагический синдром, глубокая анемия и тяжелые инфекционные осложнения, обусловленные угнетением костномозгового кроветворения, остаются причинами смерти пациентов с АА, особенно



с ее тяжелой формой. По современным представлениям, в основе патогенетического механизма развития заболевания лежит аутоиммунный процесс, обусловленный цитотоксическими Т-лимфоцитами (ЦТЛ), действующими против собственных гемопоэтических стволовых клеток (ГСК). Основным методом лечения, позволяющим достичь стойкого восстановления гемопоэза, является применение аллогенной трансплантации от родственного донора, а при его отсутствии проводится курс комбинированной иммуносупрессивной терапии (ИСТ), включающий антиtimoцитарный глобулин (АТГ) и «поддерживающую терапию» циклоспорином А [1]. ИСТ направлена главным образом на коррекцию иммунной системы пациентов и супрессию Т-лимфоцитов, участвующих в аутоиммунных реакциях. Но 35% пациентов остаются резистентными к ИСТ и являются кандидатами для проведения неродственной аллогенной трансплантации ГСК.

Клеточная терапия с применением мезенхимальных стволовых клеток (МСК) доказала свою эффективность при лечении реакции «трансплантат против хозяина», ряда аутоиммунных заболеваний, таких как системная красная волчанка, синдром Шегрена, болезнь Крона и др. Это напрямую связано со способностью МСК модулировать иммунный ответ *in vivo* путем взаимодействия с широким спектром иммунных клеток, включая Т-лимфоциты, В-лимфоциты, естественные киллерные (ЕК) клетки и дендритные клетки [2]. МСК действуют как ингибиторы пролиферации Т-лимфоцитов, блокируя G0–G1 фазы клеточного цикла, а также супрессируют их функциональную активность, а именно опосредованный ЦТЛ лизис. В то же время МСК являются индукторами пролиферации и активации Т-регуляторных лимфоцитов (T-reg), которые поддерживают толерантность к собственным антигенам и предотвращают развитие аутоиммунных реакций. Иммуносупрессивный эффект МСК после введения клеток реализуется путем секреции растворимых факторов индоламин-2,3-диоксигеназы, простагландина E₂, молекулы HLA-G5, которые ингибируют функциональную активность Т-лимфоцитов [3].

Ранее нами было установлено нарушение функционального состояния МСК, выделенных из костного мозга детей с ПАА. Так, МСК пациентов обладали низкой способностью к пролиферации, более слабой поддержкой гемопоэза и повышенной способностью к дифференцировке в адипогенном направлении по сравнению с МСК здоровых доноров [4]. Работы других авторов свидетельствовали о редукции в костном мозге пациентов с АА МСК, экспрессирующих молекулу адгезии CD106 (VCAM-1), что снижало участие этих клеток в ангиогенезе [5]. Более того, установлено, что ингибирование *in vitro* медиатора VCAM-1 ведет к редукции пролиферации и повышению апоптоза МСК [6].

Рандомизированное исследование с применением аллогенных МСК костного мозга для лечения ПАА у детей доказало безопасность и эффективность этого метода терапии, позволив повысить ответ на лечение до 70%, тогда как при стандартной ИСТ ответ наблюдали у 50% детей. Восстановление гемопоэза у 30% детей не было достигнуто, и возможной причиной могла быть недостаточность дозы или кратности введения МСК [7].

Высокая пролиферативная активность МСК плаценты по сравнению с МСК костного мозга дает возможность не только получить эффективную терапевтическую дозу клеток, но и увеличить кратность их введения. Кроме того, обнаружено, что CD106 (VCAM-1) максимально экспрессируется МСК плаценты и обеспечивает этим

клеткам высокую иммуносупрессивную активность посредством повышенной способности секретировать такие молекулы, как IDO1, PGE2 [8].

■ ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Оценка эффективности применения БМКП МСК плаценты для лечения детей с тяжелой и сверхтяжелой ПАА.

■ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследование были включены пациенты в возрасте до 16 лет с диагностированной тяжелой и сверхтяжелой ПАА, у которых отсутствовал донор для родственной трансплантации ГСК и которым была назначена медикаментозная ИСТ.

Пациенты получили клеточную терапию с использованием одного из зарегистрированных в Республике Беларусь биомедицинских клеточных продуктов (БМКП): «Клетки мезенхимальные стволовые плаценты человека ТУ ВУ 600395123.002-2023» (БМКП МСК плаценты) или «Клетки мезенхимальные стволовые костного мозга человека ТУ ВУ 600395123.001-2014» (БМКП МСК костного мозга). Оба БМКП отвечали следующим параметрам: жизнеспособных клеток более 90%, клеток с иммунофенотипом CD 90, CD 105, CD73 более 90%, клеток с иммунофенотипом CD 34, CD 45, CD14 менее 2%.

Суспензию МСК в 20 мл NaCl вводили пациенту внутривенно в течение 10–20 минут. Инфузия БМКП МСК плаценты проводилась в дозе не менее 2×10^6 /кг четырехкратно еженедельно, на 8-й, 15-й, 22-й и 29-й дни после начала медикаментозной ИСТ. БМКП МСК костного мозга вводили в дозе не менее 1×10^6 /кг дважды: на 8-й и 31-й дни после начала ИСТ.

Мониторинг содержания эритроцитов, лейкоцитов, нейтрофилов, тромбоцитов и уровня гемоглобина в периферической крови проводили до и после введения БМКП МСК. Оценка эффективности применения БМКП МСК для лечения ПАА осуществлялась на 180-е и 360-е сутки после введения клеток согласно следующим критериям:

- гематологический ответ, то есть независимость от трансфузий эритроцитарной массы и тромбовзвеси;
- полный гематологический ответ (ПГО) – достижение всех трех показателей: уровень гемоглобина (Hb) >110 г/л, гранулоциты >1500 /мкл и тромбоциты $>150\,000$ /мкл;
- частичный гематологический ответ (ЧГО): Hb – 90–110 г/л, гранулоциты – на 500/мкл выше, чем на момент диагностики, и тромбоциты $>30\,000$ /мкл;
- отсутствие ответа (ОО).

Пациенты считались ответившими, если они имели ПГО или ЧГО.

Для статистической обработки данных применяли программу STATISTICA для Windows 6.0. Для сравнения индивидуальных параметров в группах использовали критерий χ^2 , для оценки различий между группами – метод анализа для непараметрического распределения U-критерий Манна – Уитни.

■ РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Тридцать три пациента с ПАА в возрасте от 1 года до 16 лет, 18 мальчиков и 15 девочек, были включены в исследование. После верификации диагноза и при отсутствии родственного донора ГСК всем им был назначен курс ИСТ: АТГ лошадиный



40 мг/кг в течение 5 дней (курсовая доза 200 мг/кг) или, в случае его отсутствия, кроличий АТГ в дозе 3,5 мг/кг/сут в течение 5 дней в/в; циклоспорин А (ЦсА) в начальной дозе 2 мг/кг в день до 5 мг/кг в день после окончания курса АТГ; метилпреднизолон 1 мг/кг/сут в/в или внутрь с 1-го до 14-го дня от начала введения АТГ; гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (Г-КСФ) в дозе 5 мкг/кг подкожно ежедневно до достижения уровня гранулоцитов выше $5 \times 10^9/\text{л}$.

Девяти пациентам проводилась дополнительно иммуносупрессивная клеточная терапия с применением БМКП МСК плаценты, 14 пациентам – с применением БМКП МСК костного мозга. Десять пациентов получали стандартную ИСТ без БМКП МСК (группа контроля). Все 3 группы были сопоставимы по возрасту, полу, тяжести заболевания и применению АТГ, который может быть лошадиным (h-АТГ) или кроличьим (r-АТГ) и обладает различным воздействием на лимфоциты и нейтрофилы (при применении h-АТГ ответ составляет 68%, тогда как при r-АТГ – только 37% [9]). Пациенты, которым проводили клеточную терапию с БМКП МСК плаценты, получили значительно более высокую кумулятивную дозу клеток – 9,4 (8,3–13,3), чем пациенты с БМКП костного мозга – 3,7 (2,2–8,7) ($p=0,0001$) (табл. 1).

Анализ клинико-лабораторных показателей на 180-й день после введения БМКП МСК плаценты показал, что 78% (7/9) пациентов с ПАА ответили на ИСТ: 2 пациента показали ПГО, 5 пациентов – ЧГО, 2 пациентам, у которых отсутствовал ответ, была проведена аллогенная трансплантация ГСК от неродственного донора. Из 7 пациентов, которые достигли 360-го дня иммуносупрессивной терапии, 86% (6/7) сохранили гематологический ответ: у 4 пациентов наблюдали ПГО, у 2 пациентов – ЧГО. В группе контроля на 180-е сутки ЧГО на ИСТ достигли 50% пациентов, на 360-е сутки ответ сохранили 40% пациентов (табл. 2).

Таблица 1
Характеристики групп пациентов с ПАА, включенных в исследование
Table 1
Characteristics of groups of patients with AA included in the study

Параметры	Группы пациентов с ПАА			Достоверность различий (p)
	¹ МСК плаценты	² МСК костного мозга	³ МСК–	
Количество пациентов (n)	9	14	10	
Возраст (лет)	8 (1–14)	6 (2–16)	9 (4–16)	0,2667 ^{1,2} 0,6970 ^{1,3} 0,1136 ^{2,3}
Пол: – муж. – жен.	4 5	8 6	6 4	0,4285 ^{1,2} 0,4977 ^{1,3} 0,8887 ^{2,3}
Степень: – тяжелая – сверхтяжелая	– 9	1 13	1 9	0,4123 ^{1,2} 0,3297 ^{1,3} 0,8028 ^{2,3}
АТГ: – r-АТГ – h-АТГ	5 5	7 7	5 5	1,0 ^{1,2} 1,0 ^{1,3} 1,0 ^{2,3}
Кумулятивная доза БМКП МСК ($\times 10^6/\text{кг}$)	9,4 (8,3–13,3)	3,7 (2,2–8,7)	–	0,0001

Таблица 2
Эффективность применения БМКП МСК плаценты в комплексной ИСТ детей с ПАА
Table 2
Efficacy of placenta-derived MSCs in the treatment of AA in children

Ответ на ИСТ	180-й день ИСТ		p	360-й день ИСТ		p
	МСК+ (n=9)	МСК- (n=10)		МСК+ (n=9)	МСК- (n=10)	
ПГО	2 (22%)	0	0,1150	4 (45%)	0	0,0177
ЧГО	5 (56%)	5 (50%)	0,2101	2 (22%)	4 (40%)	0,4052
ОО	2 (22%)	5 (50%)	0,2101	3 (33%)	6 (60%)	0,2451

Примечания: ПГО – полный гематологический ответ; ЧГО – частичный гематологический ответ; ОО – отсутствие ответа; p – достоверность различий.

Полученные данные демонстрируют, что только у пациентов, получивших БМКП МСК, наблюдался полный гематологический ответ в 22% случаев на 180-й день и в 45% случаев после 360 дней, тогда как в группе стандартной ИСТ ни один пациент полного ответа не достиг (p=0,0177). У пациентов с дополнительной терапией БМКП МСК отсутствие ответа после 360 дней наблюдения отмечалось в 2 раза реже, чем при получении только стандартной терапии.

Сравнительный анализ эффективности применения БМКП МСК плаценты и БМКП МСК костного мозга показал отсутствие различий в достижении как полного, так и частичного гематологического ответа в группах пациентов на 180-й и 360-й дни после проведения клеточной терапии, несмотря на разницу в полученной дозе МСК (табл. 3).

Полученные нами данные свидетельствовали о том, что МСК плаценты, получаемые пациентами в высокой кумулятивной дозе, оказывали иммуносупрессивное воздействие, сравнимое с МСК костного мозга. Это согласуется и с результатами исследований других авторов, которые сравнивали иммуномодуляторную активность МСК плаценты, костного мозга и жировой ткани [10].

Острые побочные эффекты (динамика АД и ЧСС, температура, аллергическая реакция, изменения в общем анализе крови в течение первых суток после проведения процедуры по сравнению с результатами анализа, выполненного накануне введения

Таблица 3
Эффективность применения БМКП МСК плаценты и БМКП МСК костного мозга в комплексной ИСТ пациентов с ПАА
Table 3
Efficacy of placenta-derived MSCs and bone marrow-derived MSCs in the treatment of AA in children

Ответ на ИСТ	180-й день ИСТ		p	360-й день ИСТ		p
	МСК плац. + (n=9)	МСК к. м. + (n=14)		МСК плац. + (n=9)	МСК к. м. + (n=14)	
ПГО	2 (22%)	2 (14%)	0,6241	4 (44%)	5 (36%)	0,6755
ЧГО	5 (56%)	8 (57%)	0,9403	2 (22%)	5 (36%)	0,4925
ОО	2 (22%)	4 (29%)	0,7350	3 (34%)	4 (28%)	0,8086

Примечания: ПГО – полный гематологический ответ; ЧГО – частичный гематологический ответ; ОО – отсутствие ответа; p – достоверность различий.



МСК) при инфузии БМКП МСК у пациентов отмечены не были. Внутривенное введение МСК плаценты 4 пациентам с ПАА в количестве $3,9\text{--}4,46 \times 10^6/\text{кг}$ не вызывало каких-либо серьезных осложнений, поэтому дозу МСК плаценты $4 \times 10^6/\text{кг}$ мы можем считать безопасной.

■ ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты нашего исследования показали, что применение БМКП МСК плаценты при проведении иммуносупрессивной терапии у детей с тяжелой 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.

■ ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Goronkova O., Kalinina I., Salimova T., Suncova E., Petrova U., Bajdil'dina D., Maschan M., Novichkova G., Maschan A. Autoimmune diseases in children with acquired aplastic anemia. *Issues of hematology/oncology and immunopathology in pediatrics*. 2018;17(1):23–28. Available at: <https://doi.org/10.24287/1726-1708-2018-17-1-23-28>. (in Russian)
2. Najar M., Raicevic G., Fayyad-Kazan H., Bron D., Tounouz M., Lagneaux L. Mesenchymal stromal cells and immunomodulation: A gathering of regulatory immune cells. *Cytotherapy*. 2016;18:160–171. doi: 10.1016/j.jcyt.2015.10.011
3. Hajjami H.M., Amé-Thomas P., Pangault C. Functional Alteration of the Lymphoma Stromal Cell Niche by the Cytokine Context: Role of Indoleamine-2,3 Dioxygenase. *Cancer Res*. 2009;69:3228–3237.
4. Isajkina Ya.I., Lyah E.G., Emel'yanova I.V., Savich Yu.V. Investigation of the functional properties of bone marrow mesenchymal stem cells in children with aplastic anemia. *Hematology. Transfusiology. Eastern Europe*. 2019;5(2):141–149. (in Russian)
5. Lu S.H., Ge M.L., Zheng Y.Z., Yang S.G., Chen F., You Y.H., Han Z.C. Effect of CD106 + Mesenchymal Stem Cell on Bone Marrow Vascular Failure in Patients With Aplastic Anemia. *Zhongguo Yi Xue Ke Xue Yuan Xue Bao*. 2018;40:178–186.
6. Deng S., Xiang J.J., Shen Y.Y., Lin S.Y., Zeng Y.Q., Shen J.P. Effects of VEGF-Notch Signaling Pathway on Proliferation and Apoptosis of Bone Marrow MSC in Patients with Aplastic Anemia. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi*. 2019;27:1925–1932.
7. Emel'yanova I.V., Uglova T.A., Isajkina Ya.I. Mesenchymal stem cells in the treatment of acquired aplastic anemia. *Hematology. Transfusiology. Eastern Europe*. 2017;3(3):428–433. (in Russian)
8. Yang Z.X., Han Z.B., Ji Y.R., Wang Y.W., Liang L., Chi Y. CD106 identifies a subpopulation of mesenchymal stem cells with unique immunomodulatory properties. *PLoS One*. 2013;8(3):e59354. doi: 10.1371/journal.pone.0059354
9. Scheinberg Ph., Nunez O., Weinstein B., Scheinberg P., Biancotto A., Wu C., Young N. Horse versus rabbit antithymocyte globulin in acquired aplastic anemia. *N Engl J Med*. 2011;365(5):430–8.
10. Lee J.M., Jung J., Lee H.J. Comparison of immunomodulatory effects of placenta mesenchymal stem cells with bone marrow and adipose mesenchymal stem cells. *Int Immunopharmacol*. 2012;13(2):219–24.