



Дмитриев В.В.✉, Лях Е.Г., Исайкина Я.И., Борисенко М.Б., Мычкова Г.Н.
Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии
и иммунологии, Минск, Беларусь

Сравнительный анализ влияния мезенхимальных стволовых клеток плаценты и костного мозга человека на свертывание крови *in vitro*

Конфликт интересов: не заявлен.

Вклад авторов: концепция и дизайн – Дмитриев В.В.; подготовка клеточного продукта – Лях Е.Г., Исайкина Я.И.; исследование свертывания крови – Борисенко М.Б., Мычкова Г.Н.; анализ и интерпретация результатов – Дмитриев В.В., Лях Е.Г., Исайкина Я.И.

Финансирование: исследование не имело спонсорской поддержки.

Подана: 10.10.2025

Принята: 17.11.2025

Контакты: dmitrievhaematol@gmail.com

Резюме

Цель. Исследовать влияние БМКП МСК (костный мозг или плацента) различного срока культивирования клеток и их концентрации на процесс свертывания донорской крови *in vitro* методом тромбоэластографии.

Материалы и методы. Проведено 4 серии по 10 исследований в каждой. Для анализа использовали: МСК костного мозга 3-го ($n=10$) и 6-го ($n=10$) пассажей и МСК плаценты 3-го ($n=10$) и 6-го ($n=10$) пассажей, содержащих МСК в количестве $2,0 \times 10^6$ /мл в объеме 1 мл.

Результаты. В присутствии МСК КМ 3-го пассажа в концентрации 2×10^4 /мл величины СТ в режиме INTEM (191,0 (81,0–248,0) с) была меньше ($p=0,058$; U-test), чем в присутствии МСК КМ 6-го пассажа (223,0 (150,0–242,0) с). Костномозговые МСК в концентрации 2×10^5 /мл оказывали более выраженное влияние на процесс свертывания крови. МСК КМ 6-го пассажа способствовали сокращению СТ до 192,5 (151,0–233,0) с по сравнению ($p=0,86$) с величиной показателя 204,0 (162,0–250,0) с, зарегистрированной в контроле. МСК КМ 3-го пассажа способствовали гиперкоагуляционным изменениям, регистрируемым по сокращению СТ до 184,0 (43,0–240,0) с. Плацентарные МСК 3-го пассажа в концентрации 2×10^4 /мл способствовали сокращению СТ до 117,0 (47,0–148,0) с по сравнению ($p=0,02$) с величиной показателя 194,0 (169,0–278,0) с в контроле. Плацентарные МСК 3-го пассажа в концентрации 2×10^5 /мл способствовали сокращению СТ до 66,0 (43,0–85,0) с по сравнению ($p=0,001$; U-test) с костномозговыми МСК 3-го пассажа (184,0 (43,0–240,0) с). Влияние плацентарных МСК 6-го пассажа в концентрации 2×10^5 , регистрируемое по сокращению СТ до 73,0 (49,0–85,0) с, было сопоставимо ($p=0,13$; U-test) с влиянием плацентарных МСК 3-го пассажа (66,0 (43,0–85,0) с). Оценка изменения показателей свертывания, инициированного в режиме EXTEM реагентами, необходимыми для определения протромбинового времени, в целом не выявила различий между источником МСК и количеством пассажей.



Заключение. Наибольшее влияние на процесс свертывания донорской крови оказал БМКП МСК плаценты 3-го пассажа с содержанием клеток 2×10^5 /мл. Величина показателя СТ сократилась до 66,0 (43,0–85,0) с, что почти в 3 раза было меньше, чем в контрольном образце – 194,0 (169,0–278,0) с, содержащем донорскую кровь и физраствор без дотации клеток. Дополнительное присутствие в крови БМКП МСК плаценты в концентрации 2×10^4 /мл, близкой к концентрации клеток, создаваемой после трансфузии МСК в организме пациента, способствовало сокращению СТ до 117,0 (47,0–148,0) с, что было почти в 2 раза меньше (194,0 (169,0–278,0) с) в образце, содержащем донорскую кровь и физраствор без клеток. В присутствии БМКП плаценты 6-го пассажа время свертывания крови СТ (73,0 (49,0–156,0) с) было незначительно больше ($p=0,13$; U-test), чем в присутствии клеток 3-го пассажа (66,0 (43,0–85,0) с).

Ключевые слова: мезенхимальные стволовые клетки, свертывание крови

Dmitriev V.✉, Liakh E., Isaikina Y., Borisenok M., Michkova G.

Republican Scientific and Practical Centre of Pediatric Oncology, Hematology and Immunology, Minsk, Belarus

Comparative Analysis of the Effect of Mesenchymal Stem Cells of Human Placenta and Bone Marrow on Blood Coagulation in Vitro

Conflict of interest: nothing to declare.

Authors' contribution: concept and design – Dmitriev V.; preparation of the cellular product – Liakh E., Isaikina Y.; blood coagulation study – Borisenok M., Michkova G.; analysis and interpretation of the results – Dmitriev V., Liakh E., Isaikina Y.

Funding: the study had no sponsorship support.

Submitted: 10.10.2025

Accepted: 17.11.2025

Contacts: dmitrievhaematol@gmail.com

Abstract

Purpose. To study the effect of BMCP MSC (bone marrow or placenta) of different cell culture periods and their concentrations on the process of donor blood coagulation in vitro using thromboelastography.

Materials and methods. Four series of 10 studies were conducted each. The following were used for the analysis: bone marrow MSC of 3 ($n=10$) and 6 ($n=10$) passages, and placenta MSC of 3 ($n=10$) and 6 ($n=10$) passages, containing MSC in the amount of 2.0×10^6 /ml in a volume of 1 ml.

Results. In the presence of 3rd passage BM-MSCs at a concentration of 2×10^4 /ml, the CT value in the INTEM mode of 191.0 (81.0–248.0) sec was lower ($p=0.058$; U-test) than in the presence of 6th passage BM-MSCs 223.0 (150.0–242.0) sec. Bone marrow-MSCs at a concentration of 2×10^5 /ml had a more pronounced effect on the blood clotting process. 6th passage BM-MSCs contributed to a reduction in CT to 192.5 (151.0–233.0) sec compared ($p=0.86$) with the value of 204.0 (162.0–250.0) sec recorded in the control. 3rd passage BM-MSCs contributed to hypercoagulation changes recorded by a shortening of the CT to 184.0 (43.0–240.0) sec. Placental MSCs of the 3rd passage at a concentration

of 2×10^4 /ml contributed to the reduction of CT to 117.0 (47.0–148.0) sec compared ($p=0.02$) with the value of 194.0 (169.0–278.0) sec in the control. Placental MSCs of the 3rd passage at a concentration of 2×10^5 /ml contributed to the shortening of CT to 66.0 (43.0–85.0) sec compared ($p=0.001$; U-test) with bone marrow MSCs of the 3rd passage 184.0 (43.0–240.0) sec. The effect of placental MSCs of the 6th passage at a concentration of 2×10^5 , registered by the shortening of the CT to 73.0 (49.0–85.0) sec was comparable ($p=0.13$; U-test) with the effect of placental MSCs of the 3rd passage 66.0 (43.0–85.0) sec. Evaluation of the change in coagulation parameters initiated in the EXTEM mode with reagents necessary for determining the prothrombin time, in general, did not reveal differences between the source of MSCs and the number of passages.

Conclusion. The greatest effect on the coagulation process of donor blood was exerted by BMCP MSCs of the 3rd passage placenta with a cell content of 2×10^5 /ml. The value of the CT indicator decreased to 66.0 (43.0–85.0) sec, which was almost 3 times less than 194.0 (169.0–278.0) sec in the control sample containing donor blood and saline without cell donation. The additional presence of placenta MSC BMCP in the blood at a concentration of 2×10^4 /ml, close to the cell concentration created after MSC transfusion in the patient's body, contributed to the reduction of CT to 117.0 (47.0–148.0) sec, which was almost 2 times less than 194.0 (169.0–278.0) sec in the sample containing donor blood and saline without cells. In the presence of passage 6 placenta BMCP, the blood clotting time CT 73.0 (49.0–156.0) sec was slightly longer ($p=0.13$; U-test) than in the presence of passage 3 cells 66.0 (43.0–85.0) sec.

Keywords: mesenchymal stem cells, blood coagulation

■ ВВЕДЕНИЕ

Обзор литературы и результаты метаанализов показали, что терапевтические средства на основе мезенхимальных стромальных клеток (МСК) из различных источников, используемые в строго контролируемых клинических испытаниях, демонстрируют превосходный профиль безопасности [1, 2].

Потенциальные побочные эффекты внутрисосудистого введения включают нарушения параметров свертывания крови. Последние могут вызвать микро-/макро-тромбоз и (легочную) тромбоэмболию, окклюзию сосудов и ишемию тканей, что способно привести к инвалидности и даже летальному исходу при ненадлежащем наблюдении за пациентом [3, 4].

Каждый из применяемых в клинической практике образцов биомедицинского клеточного продукта (БМКП) обладает своими уникальными свойствами, зависящими от технологии и условий изготовления. Ключевая задача исследования состоит в определении влияния на свертывание крови реципиента каждого отдельного продукта МСК, предназначенного для внутрисосудистого применения.

Сравнительный анализ влияния МСК децидуальной ткани плаценты и костного мозга (КМ) в публикациях не представлен.

■ ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследовать влияние БМКП МСК (костный мозг или плацента) различного срока культивирования клеток и их концентрации на процесс свертывания донорской крови in vitro методом тромбоэластографии.



■ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

МСК костного мозга выделяли из проб костного мозга после получения информированного согласия здоровых волонтеров, являвшихся донорами гемопоэтических стволовых клеток для аллогенной трансплантации ($n=10$). Мононуклеарные клетки выделяли на градиенте фиколла плотностью 1,077 (Life technologies, США), дважды отмывали в среде RPMI с 10% ЭТС, ресуспендировали в ростовой среде IMDM (Life technologies, США) с 10% АВО-сывороткой (РНПЦ трансфузиологии и медицинских биотехнологий, Беларусь) и переносили в культуральный флакон (Sarstedt, Германия) в концентрации 1×10^6 клеток на 1 см^2 поверхности флакона. Через 24 часа проводили смену питательной среды для удаления неадгезированных клеток.

МСК плаценты ($n=10$) выделяли ферментативным методом из фрагментов плаценты, полученной после оперативных родов путем кесарева сечения. Все данные родильниц были деперсонифицированы. Ткани плаценты подвергали механической обработке и переносили в раствор коллагеназы I на 30 минут с последующей фильтрацией клеток через $100 \mu\text{m}$ нейлоновый фильтр. Полученные диссоциированные клетки высаживали в культуральные флаконы в среду IMDM с 10% АВО-сывороткой (РНПЦ трансфузиологии и медицинских биотехнологий, Беларусь). Через 24 часа проводили смену питательной среды для удаления неадгезированных клеток.

Клетки культивировали при 37°C в CO_2 инкубаторе до достижения 80–90% конфлюэнтного слоя, снимали с поверхности флакона 0,25% раствором трипсин – ЭДТА (Life technologies, США), получая первичную культуру. МСК первичной культуры костного мозга и плаценты рассаживали по новым флаконам в концентрации 1×10^6 в среду IMDM с 10% АВО-сывороткой (РНПЦ трансфузиологии и медицинских биотехнологий, Беларусь) с последующим пассированием через 7 суток. Таким образом проводили 6 пассажей. После снятия МСК с флакона для анализа выполняли осаждение клеток центрифугированием 5 минут при 2000 об/мин, после чего дважды отмывали физиологическим раствором (раствор 0,9% NaCl) и ресуспендировали в 1 мл физиологического раствора в концентрации $2,0 \times 10^6$ клеток/мл.

Для анализа использовали: МСК костного мозга 3-го ($n=10$) и 6-го ($n=10$) пассажей, содержащих $2,0 \times 10^6$ /мл в объеме 1 мл; МСК плаценты 3-го ($n=10$) и 6-го ($n=10$) пассажей с содержанием клеток $2,0 \times 10^6$ /мл в объеме 1 мл.

Схема стендового опыта по исследованию влияния БМКП МСК (костный мозг или плацента), срока культивирования клеток и их концентрации на процесс свертывания донорской крови *in vitro* методом тромбозластографии: количество клеток, вводимых на единицу массы тела, в среднем составляет $2,0 \times 10^6$ /кг. Расчетная величина объема циркулирующей крови у детей старше 1 года на единицу массы тела – 70 мл/кг (В.В. Курек, А.Е. Кулагин, 2009). Тогда введенные клетки в количестве $2,0 \times 10^6$ будут распределены в объеме 70 мл, а содержание клеток в единице объема составит $2,0 \times 10^6 \text{ клеток} / 70 \text{ мл} = 0,02857 \times 10^6 \text{ клеток/мл} = 2,8 \times 10^4$ /мл. Поэтому для оценки влияния МСК на свертывание крови была выбрана концентрация клеток в крови, создаваемая после завершения инфузии МСК $(2,0\text{--}2,8) \times 10^4$ /мл. Для сравнения было решено использовать дополнительно концентрацию клеток в модельной системе, в 10 раз превышающую содержание клеток в крови после завершения процедуры инфузии МСК пациенту, а именно $(2,0\text{--}2,8) \times 10^5$ /мл. Имея стандартное содержание МСК в единице объема среды для инфузии $2,0 \times 10^6$ /мл, готовили исследуемые образцы донорской крови с известным содержанием МСК в следующих разведениях:

- 1) 100 мкл среды, содержащей $2,0 \times 10^6$ клеток/мл в изотоническом растворе хлорида натрия, смешивали с 900 мкл донорской стабилизированной (3,2% раствор натрия цитрата и цельная кровь в соотношении 1:9) крови, выбранной без учета групповой принадлежности, для получения исследуемого образца донорской крови № 1 с содержанием МСК $2,0 \times 10^5$ клеток/мл;
- 2) 100 мкл среды, содержащей $2,0 \times 10^6$ клеток/мл в изотоническом растворе хлорида натрия, смешивали с 900 мкл 0,9% хлорида натрия для получения суспензии с содержанием $2,0 \times 10^5$ клеток/мл. Из приготовленной суспензии отбирали 100 мкл среды, содержащей $2,0 \times 10^5$ клеток/мл в изотоническом растворе хлорида натрия, смешивали с 900 мкл крови того же донора для получения исследуемого образца донорской крови № 2 с содержанием МСК $2,0 \times 10^4$ клеток/мл;
- 3) для нивелирования эффекта разведения (1:9) донорской крови путем добавления 100 мкл среды, содержащей $2,0 \times 10^6$ клеток/мл в изотоническом растворе хлорида натрия, к 900 мкл донорской крови готовили в качестве контроля образец крови донора № 3 путем добавления 100 мкл изотонического раствора хлорида натрия к 900 мкл стабилизированной крови того же донора;
- 4) для определения исходных показателей свертывания крови служил образец № 4 стабилизированной крови того же донора.

Исследования проведены для БМКП, подготовленного из 3-го и 6-го клеточных пассажей.

После оформления в истории болезни информированного согласия на обследование донора венозную кровь, полученную путем пункции системой «Вакутайер» периферической вены, стабилизировали 3,2% раствором натрия цитрата в соотношении 9:1 соответственно. Все данные доноров деперсонифицированы. Стабилизированную цельную венозную кровь доноров использовали для проведения тромбоэластографических исследований методом ротационной тромбоэластометрии тромбоэластографом ROTEM производства фирмы Pentapharm GmbH (Германия) реагентами фирмы Tem Innovations GmbH (Германия) для оценки внешнего (EXTEM) и внутреннего (INTEM) путей свертывания крови.

Проведено 4 серии исследований (10 исследований в серии) по изучению влияния БМКП на основе МСК костного мозга и плаценты после 3-го и 6-го пассажей на свертывание цельной стабилизированной крови доноров методом ротационной тромбоэластометрии.

Статистический анализ данных выполнен при помощи компьютерного пакета программ Statistica (версия 6.0). Количественные показатели описательной статистики представлены как медиана (10-й – 90-й процентиля). Достоверность различия показателей в сравниваемых группах оценивали по критерию Манна – Уитни (U), а попарно связанные варианты – по парному критерию Вилкоксона (T). Значимыми признаны различия для $P < 0,05$.

■ РЕЗУЛЬТАТЫ

Наиболее значимые различия величин показателей времени свертывания (clotting time, CT) под влиянием БМКП МСК различного происхождения и сроков созревания выявлены в режиме INTEM (табл. 1). Независимо от серии стендового эксперимента добавление к цельной крови в соотношении 9:1 изотонического раствора хлорида натрия практически не влияло на время свертывания. Дополнительное



присутствие в цельной крови МСК в объемном соотношении 9:1 в концентрации 2×10^4 /мл сопровождалось сокращением времени свертывания крови.

Наименьшее влияние на величину показателя СТ оказало присутствие МСК КМ 6-го пассажа в концентрации 2×10^4 /мл, на что указывало незначительное увеличение показателя до 223,0 (150,0–242,0) с по сравнению ($p=0,25$; T-test) с аналогичным показателем 204,0 (162,0–250,0) с, зарегистрированным в присутствии физраствора (контроль). В присутствии МСК КМ 3-го пассажа величина СТ (191,0 (81,0–248,0) с) была меньше ($p=0,058$; U-test), чем в присутствии МСК КМ 6-го пассажа (223,0 (150,0–242,0) с). Костномозговые МСК в объемном соотношении 9:1 в концентрации 2×10^5 /мл оказывали более выраженное влияние на процесс свертывания крови в режиме INTEM, инициированный реагентами, аналогичными для определения АПТВ. МСК КМ 6-го пассажа способствовали сокращению СТ до 192,5 (151,0–233,0) с по сравнению ($p=0,86$) с величиной показателя 204,0 (162,0–250,0) с, зарегистрированной в контроле. МСК КМ 3-го пассажа способствовали гиперкоагуляционным изменениям, регистрируемым по сокращению (по сравнению с контролем $p=0,021$; T-test) СТ до 184,0 (43,0–240,0) с.

Выраженное гиперкоагуляционное воздействие на цельную кровь оказало присутствие МСК плаценты. Плацентарные МСК 3-го пассажа в объемном соотношении 9:1 в концентрации 2×10^4 /мл способствовали сокращению СТ до 117,0 (47,0–148,0) с по сравнению ($p=0,02$) с величиной показателя 194,0 (169,0–278,0) с в контроле. Плацентарные МСК 3-го пассажа в концентрации 2×10^5 /мл способствовали сокращению СТ до 66,0 (43,0–85,0) с по сравнению ($p=0,001$; U-test) с костномозговыми МСК 3-го пассажа – 184,0 (43,0–240,0) с. Влияние плацентарных МСК 6-го пассажа в концентрации 2×10^5 , регистрируемое по сокращению СТ до 73,0 (49,0–85,0) с, было сопоставимо ($p=0,13$; U-test) с влиянием плацентарных МСК 3-го пассажа – 66,0 (43,0–85,0) с.

Оценка изменения показателей свертывания, инициированного в режиме EXTEM реагентами, необходимыми для определения протромбинового времени, в целом не выявила влияния МСК различного происхождения и сроков созревания на коагуляционные свойства донорской крови (табл. 2).

БМКП МСК плаценты в условиях *in vitro* оказал на цельную стабилизированную кровь гиперкоагуляционное воздействие, регистрируемое в режиме INTEM методом тромбоэластометрии, в виде уменьшения показателя свертывания крови (СТ) в большей мере, чем МСК КМ. Степень выраженности воздействия зависела от содержания МСК и не зависела от числа пассажей. При концентрации 2×10^5 в присутствии МСК плаценты 6-го пассажа СТ (73,0 (49,0–85,0) с) было сопоставимо ($p=0,13$; U-test) с СТ 3-го пассажа (66,0 (43,0–85,0) с). При концентрации 2×10^4 /мл СТ в присутствии МСК плаценты 6-го пассажа (120,0 (83,0–156,0) с) мало отличалось ($p=0,35$) от величины показателя, зарегистрированного в присутствии клеток 3-го пассажа (117,0 (47,0–148,0) с) и было, соответственно, больше ($p<0,01$) аналогичных показателей, зарегистрированных в присутствии МСК 3-го пассажа (66,0 (43,0–85,0) с) и 6-го пассажа (73,0 (49,0–156,0) с) при концентрации клеток 2×10^5 /мл.

■ ОБСУЖДЕНИЕ

МСК проявляют прокоагулянтную активность, связанную с экспрессией тканевого фактора (ТФ), который при контакте с кровью инициирует коагуляцию. Oeller M. и соавт. (2018) продемонстрировали, что МСК, полученные как из пуповины человека,

так и из жировой ткани, проявляют большую экспрессию ТФ по сравнению с МСК, полученными из костного мозга [5]. Christy и соавт. [6] подтвердили, что прокоагулянтная активность МСК коррелирует с процентом клеток, экспрессирующих поверхностный ТФ. По мнению авторов, популяция МСК, содержащая только 25% клеток, экспрессирующих ТФ, представляла значительный прокоагулянтный стимул, о чем свидетельствовало 70% сокращение времени коагуляции при тромбоэластографии и увеличение степени генерации тромбина. Клетки, полученные из жировой ткани, по-видимому, являются более прокоагулянтными, с более высокой экспрессией ТФ по сравнению с клетками, полученными из костного мозга. Анализ результатов неактивированной ротационной тромбоэластометрии стабилизированной донорской крови в режиме НАТЭМ (активация хлоридом кальция без дотации ТФ) показал, что присутствие МСК пуповины в количестве 5×10^4 клеток/мл резко повышало индуцированную хлоридом кальция свертываемость крови. Показатель СТ снижался в 2,3 раза, с 696 ± 51 с до 304 ± 58 с, а CFT снижался в 1,8 раза, с 350 ± 66 с до 194 ± 47 с ($p < 0,05$). Кроме того, α -угол, который измеряет скорость накопления и сшивания фибрина, следовательно, оценивает скорость образования сгустка, т. е. выброса тромбина, увеличился с $38 \pm 10^\circ$ до $60 \pm 13^\circ$ по сравнению с контрольными образцами ($p < 0,05$) [7].

Таблица 1
Влияние МСК различного происхождения и сроков созревания на показатель времени свертывания (Clotting Time) методом ротационной тромбоэластометрии (ROTEM) цельной крови в режиме INTEM, Me (10–90)%
Table 1
Effect of MSCs of various origins and maturation periods on the clotting time (CT) using the method of rotational thromboelastometry (ROTEM) of whole blood in INTEM mode, Me (10–90)%

Происхождение и пассаж МСК	Анализируемый показатель времени свертывания (Clotting Time)			
	Донорская цельная кровь (серия 1), n=10	Донорская кровь + физраствор 9:1 (серия 2), n=10	Донорская кровь + МСК в физрастворе 9:1 (2×10^5 /мл) (серия 3), n=10	Донорская кровь + МСК в физрастворе 9:1 (2×10^4 /мл) (серия 4), n=10
Группа МСК костного мозга, 3-й пассаж	199,5 (150,0–236,0) P(1–2)=0,14	204,0 (124,0–258,0) P(2–4)=0,017	184,0 (43,0–240,0) P(3–2)=0,021 P(3–1)=0,183	191,0 (81,0–248,0) P(3–4)=0,025
Группа МСК костного мозга, 6-й пассаж	212,5 (187,0–235,0) P(1–2)= 0,22	204,0 (162,0–250,0) P(2–4)=0,25	192,5* (151,0–233,0) P(3–2)=0,86	223,0 (150,0–242,0) P(3–4)=0,32
Группа МСК плаценты, 3-й пассаж	205,5 (168,0–233,0) P(1–2)=0,08	194,0 (169,0–78,0) P(2–4)=0,02	66,0* [#] (43,0–85,0) P(3–2)=0,01 P(3–1)=0,01	117,0* [#] (47,0–148,0) P(3–4)=0,49
Группа МСК плаценты, 6-й пассаж	203,0 (165,0–210,0) P(1–2)=0,1	202,0 (150,0–218,0) P(2–4)=0,007	73,0* [#] (49,0–156,0) P(3–2)=0,007 P(3–1)=0,007	120,0* [#] (83,0–156,0) P(3–4)=0,21

Примечания: P(1–4) – достоверность различия между сериями (парный критерий Вилкоксона, Wilkoxon T-test); * P<0,05 – достоверность различия между группами костного мозга и плаценты в пределах серии, U-test; [#] P<0,05 – достоверность различия между 3-м и 6-м пассажами костного мозга и плаценты в пределах серии, U-test.



Таблица 2

Влияние МСК различного происхождения и сроков созревания на показатель времени свертывания (Clotting Time) методом ротационной тромбоэластометрии (ROTEM) цельной крови в режиме EXTEM, Me (10–90)%

Table 2

Effect of MSCs of various origins and maturation periods on the clotting time (CT) using the method of rotational thromboelastometry (ROTEM) of whole blood in EXTEM mode, Me (10–90)%

Происхождение и пассаж МСК	Анализируемый показатель времени свертывания (Clotting Time)			
	Донорская цельная кровь (серия 1), n=10	Донорская кровь + физраствор 9:1 (серия 2), n=10	Донорская кровь + МСК в физрастворе 9:1 (2×10^5 /мл) (серия 3), n=10	Донорская кровь + МСК в физрастворе 9:1 (2×10^4 /мл) (серия 4), n=10
Группа МСК костного мозга, 3-й пассаж	60,0 (48,0–101,0) P(1–2)=0,39	60,5 (54,0–102,0) P(2–4)=0,207	55,5 (49,0–120,0) P(3–2)=0,062	54,0 (50,0–101,0) P(3–4)=0,932
Группа МСК костного мозга, 6-й пассаж	58,5 (52,0–71,0) P(1–2)=0,47	60,5 (49,5–68,5) P(2–4)=0,06	72,5 (51,0–80,0) P(3–2)=0,21	68,0 (45,0–71,0) P(3–4)=0,05
Группа МСК плаценты, 3-й пассаж	61,0 (47,0–70,0) P(1–2)=0,2	58,0 (50,0–75,0) P(2–4)=0,31	53,0 (36,0–63,0) P(3–2)=0,33 P(3–1)=0,051	62,0 (47,0–80,0) P(3–4)=0,57
Группа МСК плаценты, 6-й пассаж	57,0 (44,0–62,0) P(1–2)=0,051	63,0 (44,0–80,0) P(2–4)=0,06	57,0 (44,0–69,0) P(3–2)=0,77 P(3–1)=0,18	64,0 (50,0–73,0) P(3–4)=0,03

Примечания: P(1–4) – достоверность различия между сериями (парный критерий Вилкоксона, Wilcoxon T-test).

Поскольку МСК костного мозга экспрессируют ТФ в меньшем количестве, чем МСК пуповины или плаценты [6], логично ожидать отсутствия значимых изменений временных показателей донорской крови в присутствии МСК КМ, регистрируемых с помощью тромбоэластометрии в режиме EXTEM с использованием реагентов, содержащих тканевый фактор и кальция хлорид. Результаты проведенных нами исследований показали, что присутствие МСК КМ как в количестве 2×10^4 /мл, так и в концентрации 2×10^5 /мл не оказало влияния на сокращение времени свертывания крови в режиме EXTEM по сравнению с контрольным образцом, содержащим донорскую кровь и физраствор в соотношении 9:1 без дотации клеток. Присутствие БМКП МСК плаценты в количестве 2×10^5 /мл способствовало сокращению СТ до 57,0 (44,0–69,0) с по сравнению ($p=0,03$) с величиной показателя 64,0 (50,0–73,0) с, зарегистрированного в присутствии МСК плаценты в количестве 2×10^4 /мл, что не отличалось ($p<0,1$) от аналогичного показателя 63,0 (44,0–80,0) с, зарегистрированного в режиме EXTEM, с контрольным образцом, содержащим донорскую кровь и физраствор в соотношении 9:1.

Иной, чем участие ТФ в коагуляционном каскаде по внешнему пути, механизм активации свертывания включает экспозицию прокоагулянтных липидов, в частности фосфатидилсерина, на наружной поверхности клетки [8].

Исследователи показали экспонирование фосфатидилсерина на поверхности внеклеточных везикул, полученных из МСК. Присутствие внеклеточных везикул

с экспонированным фосфатидилсерином обеспечивало каталитическую поверхность для образования комплексов теназы (факторы VIIIa, IXa и X) и протромбиназы (факторы Va, Xa и II) каскада коагуляции. Фосфатидилсерин может дополнительно способствовать трансформации ТФ из его неактивной, «зашифрованной», формы в биологически активное состояние [9].

Дополнительное присутствие в цельной крови МСК КМ 3-го пассажа в объемном соотношении 9:1 в концентрации 2×10^4 /мл сопровождалось сокращением времени свертывания крови СТ до 191,0 (81,0–248,0) с в режиме INTEM с использованием реагентов, аналогичных определению активированного частичного тромбопластинового времени, по сравнению ($p=0,017$) с величиной показателя 204,0 (124,0–258,0) с, зарегистрированного с образцом, содержащим донорскую кровь и физраствор в соотношении 9:1 без дотации клеток. БМКП МСК КМ 6-го пассажа оказал на свертывание крови менее выраженное прокоагуляционное влияние.

Наибольшее влияние на процесс свертывания донорской крови оказал БМКП МСК плаценты 3-го пассажа с содержанием клеток 2×10^5 /мл. Величина показателя СТ сократилась до 66,0 (43,0–85,0) с, что почти в 3 раза было меньше, чем в контрольном образце (194,0 (169,0–278,0) с), содержащем донорскую кровь и физраствор без дотации клеток. Дополнительное присутствие в крови БМКП МСК плаценты в концентрации 2×10^4 /мл, близкой к концентрации клеток, создаваемой после трансфузии МСК в организме пациента, способствовало сокращению СТ до 117,0 (47,0–148,0) с, что было почти в 2 раза меньше (194,0 (169,0–278,0) с) в образце, содержащем донорскую кровь и физраствор без клеток. В присутствии БМКП плаценты 6-го пассажа время свертывания крови СТ (73,0 (49,0–156,0) с) было незначительно больше ($p=0,13$; U-test), чем в присутствии клеток 3-го пассажа (66,0 (43,0–85,0) с).

■ ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Мы подтвердили, что использование ротационной тромбоэластометрии позволяет зарегистрировать влияние БМКП МСК на свертывание крови. Регистрация времени свертывания крови в режиме INTEM позволила выявить более выраженные гиперкоагуляционные изменения, чем в режиме EXTEM. Данное обстоятельство указывает на инициацию свертывания крови иным механизмом, чем первичная активация тканевого фактора по внешнему пути коагуляционных превращений. Присутствие БМКП МСК плаценты оказало более выраженное прокоагуляционное влияние на свертывание крови, чем МСК КМ. Увеличение числа пассажей МСК, добавляемых к донорской крови, существенно не повлияло на время свертывания крови.

■ ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Moll G, Ankrum JA, Kamhiel-Milz J, et al. Intravascular mesenchymal stromal/stem cell therapy product diversification: time for new clinical guidelines. *Trends Mol Med.* 2019;25(2):149–163.
2. Thompson M, Mei SHJ, Wolfe D, et al. Cell therapy with intravascular administration of mesenchymal stromal cells continues to appear safe: an updated systematic review and meta-analysis. *E Clinical Medicine.* 2020;17(19):1–14.
3. Wu Z, Zhang S, Zhou L, et al. Thromboembolism induced by umbilical cord mesenchymal stem cell infusion: a report of two cases and literature review. *Transplant Proc.* 2017;49(7):1656–1658.
4. Jung JW, Kwon M, Choi JC, et al. Familial occurrence of pulmonary embolism after intravenous, adipose tissue-derived stem cell therapy. *Yonsei Med J.* 2013;54(5):1293–1296.
5. Oeller M, Laner-Plamberger S, Hochmann S, et al. Selection of tissue factor-deficient cell transplants as a novel strategy for improving hemocompatibility of human bone marrow stromal cells. *Theranostics.* 2018;8(5):1421–34.
6. Christy B, Herzig M, Montgomery R, et al. Procoagulant activity of human mesenchymal stem cells. *J. Trauma Acute Care Surg.* 2017;83:5164–5169.
7. Silachev D, Goryunov K, Shpiluyuk M, et al. Effect of MSCs and MSC-Derived Extracellular Vesicles on Human Blood Coagulation. *Cells.* 2019;8:258–282.
8. Zhao L, et al. Phosphatidylserine exposing-platelets and microparticles promote procoagulant activity in colon cancer patients. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 2016;25(35):54–64.
9. van der Poll T, Herwald H. The coagulation system and its function in early immune defense. *Thromb. Haemost.* 2014;112:640–648.