



<https://doi.org/10.34883/PI.2025.11.4.009>
УДК 612.398.132:[611.013.85-018.21:611.018.46-018.21]



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

Содержание фактора свертывания крови VIII в мезенхимальных стволовых клетках плаценты и костного мозга человека

Конфликт интересов: не заявлен.

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

Источники финансирования: исследование не имело спонсорской поддержки.

Подана: 10.10.2025

Принята: 17.11.2025

Контакты: dmitrievhaematol@gmail.com

Резюме

Цель. Исследовать содержание фактора VIII в БМКП МСК плаценты (П МСК) и костного мозга (КМ МСК) *in vitro*, оценить динамику накопления в зависимости от срока культивирования клеток.

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; среду после культивирования МСК (1 мл) (n=40); изотонический раствор хлорида натрия после последней отмывки клеток (1 мл) (n=40). Пробирки, содержащие исследуемые образцы, подвергались замораживанию (-20°C 30 мин) и последующему размораживанию (37°C 10 мин) для разрушения клеток и высвобождения в среду пассажа внутриклеточного фактора свертывания крови VIII. После размораживания пробирки с исследуемым материалом центрифугировали 10 мин (2000g), после чего выполняли определение активности фактора VIII одностадийным клоттинговым методом с использованием набора реагентов фирмы Instrumentation Laboratory (IL) на анализаторе ACL-9000 (IL).

Результаты. Содержание фактора VIII в лизате БМКП МСК костного мозга 3-го пассажа 0,049 (0,015–0,372) МЕ/мл было таким же ($p=0,44$), как в лизате МСК костного мозга 6-го пассажа 0,029 (0,003–0,109) МЕ/мл. Среда после культивирования клеток в течение 7 дней и отмывочный раствор 3-го и 6-го пассажа содержали фактор VIII в следовых количествах, сопоставимых с минимальным порогом детекции анализатора.

Лизат БМКП на основе МСК плаценты 6-го пассажа содержал фактор VIII в количестве 7,31 (1,79–34,18) МЕ/мл, что незначительно ($p=0,41$) отличалось от 14,98 (2,11–27,79) МЕ/мл в МСК 3-го пассажа. Содержание фактора VIII в среде после культивирования клеток 6-го пассажа 0,18 (0,081–0,480) МЕ/мл не превышало ($p=0,57$) аналогичный показатель в среде после 3-го пассажа 0,13 (0,101–0,645) МЕ/мл. Отмывочный раствор МСК 6-го пассажа плаценты содержал 2,12 (0,11–13,9) МЕ/мл,

что было меньше ($p=0,017$) количества фактора VIII 6,12 (1,112–16,82) МЕ/мл в отмывочном растворе МСК плаценты 3-го пассажа.

Заключение. Лизат плацентарных МСК имел активность FVIII, в несколько раз большую, чем МСК КМ. МСК не выделяют фактор VIII в среду, а накапливают внутри клеток при культивировании *in vitro*.

Ключевые слова: мезенхимальные стволовые клетки, свертывание крови, фактор свертывания крови VIII

Dmitriev V.✉, Liakh E., Isaikina Y., Borisenok M., Michkova G.
Republican Scientific Centre of Pediatric Oncology, Hematology and Immunology,
Minsk, Belarus

Contain Blood Coagulation Factor VIII in Human Placenta and Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells

Conflict of interest: nothing to declare.

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

Funding: the study had no sponsorship support.

Submitted: 10.10.20205

Accepted: 17.11.2025

Contacts: dmitrievhaematol@gmail.com

Abstract

Purpose. To investigate the content of factor VIII in the BMCP of placental MSCs (P MSCs) and bone marrow MSCs (BM MSCs) *in vitro*, to evaluate the dynamics of accumulation depending on the cell culturing period.

Materials and methods. Four series of 10 studies were conducted each. The following were used for the analysis: bone marrow MSCs of passages 3 ($n=10$) and 6 ($n=10$), and placental MSCs of passages 3 ($n=10$) and 6 ($n=10$), containing MSCs in an amount of $2.0 \cdot 10^6$ /ml in a volume of 1 ml; the medium after MSC cultivation (1 ml) ($n=40$); isotonic sodium chloride solution after the last cell wash (1 ml) ($n=40$). The tubes containing the samples under study were frozen (-20°C for 30 minutes) and then defrosted (37°C for 10 min) to disrupt the cells and release intracellular coagulation factor VIII into the passage medium. After defrosting, the tubes with the material under study were centrifuged for 10 minutes (2000g), after which the factor VIII activity was determined by a one-step clotting method using a reagent kit from Instrumentation Laboratory (IL) on an ACL-9000 analyzer (IL).

Results. The factor VIII content in the lysate of bone marrow MSCs of the 3rd passage 0.049 (0.015–0.372) IU/ml was the same ($p=0.44$) as in the lysate of bone marrow MSCs of the 6th passage 0.029 (0.003–0.109) IU/ml. The medium after culturing the cells for 7 days and the washing solution of the 3rd and 6th passages contained factor VIII in trace amounts comparable to the minimum detection threshold of the analyzer. The BMCP lysate based on placenta MSCs of the 6th passage contained factor VIII in the amount of 7.31 (1.79–34.18) IU/ml, which was slightly ($p=0.41$) different from 14.98 (2.11–27.79)



IU/ml in MSCs of the 3rd passage. The content of factor VIII in the medium after culturing the cells of the 6th passage 0.18 (0.081–0.480) IU/ml did not exceed ($p=0.57$) the similar indicator in the medium after the 3rd passage 0.13 (0.101–0.645) IU/ml. The wash solution of 6th passage placental MSCs contained 2.12 (0.11–13.9) IU/ml, which was less ($p=0.017$) than the amount of factor VIII 6.12 (1.112–16.82) IU/ml in the wash solution of 3rd passage placental MSCs.

Conclusion. The lysate of placental MSCs had FVIII activity several times higher than that of BM MSCs. MSCs do not secrete factor VIII into the medium, but accumulate it inside the cells during in vitro cultivation.

Keywords: mesenchymal stem cells, blood coagulation, blood coagulation factor VIII

■ ВВЕДЕНИЕ

Мезенхимальные стромальные клетки (МСК) обладают противовоспалительной, регенеративной, антиапоптотической и иммуносупрессивной активностью, благодаря чему нашли широкое применение в терапии различных заболеваний [1]. В последнее время в качестве источника для выделения МСК используют некроветворные ткани, такие как жировая ткань, перинатальные ткани, в том числе послеродовую плаценту. В зависимости от источника получения, МСК в некоторой степени сохраняют тканеспецифичность, что отражается в профиле экспрессии как генов внутри клеток, так и активных молекул на их поверхности, влияющих на прокоагуляционную активность МСК [2, 3].

По литературным данным, прокоагулянтные свойства МСК могут быть связаны с несколькими факторами. Было показано, что в перинуклеарной области МСК, выделенных из различных тканей организма, локализуется фактор VIII (FVIII), который обеспечивает включение IX и X факторов по внутреннему и общему пути коагуляционного каскада, в результате чего протромбин превращается в тромбин [4]. С другой стороны, Moll G. с соавт. продемонстрировали экспрессию тканевого фактора (ТФ, или CD142) на поверхности МСК, который играет важную роль в остановке кровотечения и тромбообразовании, являясь первичным клеточным инициатором протеазного каскада свертывания крови [5]. Сравнительный анализ прокоагулянтных свойств МСК КМ и МСК плаценты в публикациях не представлен.

■ ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследовать содержание фактора VIII в культуре МСК плаценты (П МСК) и костного мозга (КМ МСК) in vitro, оценить динамику их накопления в зависимости от срока культивирования клеток.

■ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

МСК костного мозга (КМ-МСК) выделяли после получения информированного согласия из проб костного мозга здоровых волонтеров, являвшихся донорами гемопоэтических стволовых клеток для аллогенной трансплантации ($n=10$). Мононуклеарные клетки (МНК) 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% ABO-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 ч проводили смену питательной среды для удаления неадгезированных клеток.

МСК плаценты (П-МСК) ($n=10$) 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 мин с последующей фильтрацией клеток через $100 \mu\text{m}$ нейлоновый фильтр. Полученные диссоциированные клетки высаживали в культуральные флаконы в среду IMDM с 10% ABO-сывороткой (РНПЦ трансфузиологии и медицинских биотехнологий, Беларусь). Через 24 ч 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% ABO-сывороткой (РНПЦ трансфузиологии и медицинских биотехнологий, Беларусь) с последующим пассированием через 7 сут. Таким образом проводили 6 пассажей. После снятия МСК с флакона для анализа выполняли осаждение клеток центрифугированием 5 мин при 2 тыс. об/мин, после чего дважды отмывали физиологическим раствором (ФР, раствор 0,9% NaCl) и ресуспендировали в 1 мл ФР 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; среду после культивирования МСК (IMDM с 10% ABO-сывороткой после 7 дней культивирования (1 мл) ($n=40$)); изотонический раствор хлорида натрия после последней отмывки клеток (1 мл) ($n=40$).

Пробирки, содержащие исследуемые образцы, подвергались замораживанию (-20°C 30 мин) и последующему размораживанию (37°C 10 мин) для разрушения клеток и высвобождения в среду пассажа внутриклеточного фактора свертывания крови VIII. После размораживания пробирки с исследуемым материалом центрифугируют 10 мин при ускорении $2000g$, после чего выполняли определение активности фактора VIII одностадийным клоттинговым методом с использованием набора реагентов фирмы Instrumentation Laboratory (IL) на анализаторе ACL-9000 (IL). За 1 ME (100%) активности фактора свертывания крови VIII была принята активность фактора свертывания крови VIII, содержавшегося в 1 мл нормальной контрольной плазмы, представленной в диагностическом наборе фирмы IL.

Перед определением фактора VIII супернатант с продуктами клеточного разрушения МСК плаценты разводили факторным дилуентом в соотношении 1:7. Результат измерения умножали на переводной коэффициент 8 и представляли конечный результат в ME/мл. Перед определением содержания фактора VIII супернатант с продуктами клеточного разрушения МСК костного мозга дополнительному разведению не подвергали.

Статистический анализ данных выполнен при помощи компьютерного пакета программ Statistica (версия 6.0). Количественные показатели описательной статистики



представлены как медиана (10–90-й процентиля). Достоверность различия показателей в сравниваемых группах оценивали по критерию Mann – Whitney Test (U), а для попарно связанных вариантов – по парному критерию Вилкоксона (T). Значимыми признаны различия для $P < 0,05$.

■ РЕЗУЛЬТАТЫ

Содержание фактора VIII в лизате БМКП МСК костного мозга 3-го пассажа 0,049 (0,015–0,372) МЕ/мл было таким же ($p=0,44$), как в лизате МСК костного мозга 6-го пассажа 0,029 (0,003–0,109) МЕ/мл. Среда после культивирования клеток в течение 7 дней и отмывочный раствор 3-го и 6-го пассажа содержали фактор VIII в следовых количествах, сопоставимых с минимальным порогом детекции анализатора (см. таблицу).

Лизат БМКП на основе МСК плаценты 6-го пассажа содержал фактор VIII в количестве 7,31 (1,79–34,18) МЕ/мл, что незначительно ($p=0,41$) отличалось от 14,98 (2,11–27,79) МЕ/мл в МСК 3-го пассажа и в несколько раз превышало содержание фактора VIII в нормальной контрольной плазме (1 МЕ/мл). Содержание фактора VIII в среде после культивирования клеток 6-го пассажа 0,18 (0,081–0,480) МЕ/мл не превышало ($p=0,57$) аналогичный показатель в среде после 3-го пассажа 0,13 (0,101–0,645) МЕ/мл. Отмывочный раствор МСК 6-го пассажа плаценты содержал 2,12 (0,11–13,9) МЕ/мл, что было меньше ($p=0,017$) количества фактора VIII 6,12 (1,112–16,82) МЕ/мл в отмывочном растворе МСК плаценты 3-го пассажа. Данное обстоятельство указывает на то, что МСК не выделяют фактор VIII в среду, а накапливают внутри клеток при культивировании *in vitro*. В процессе отмывания, вероятно, происходит частичное разрушение клеток и высвобождение фактора VIII в отмывочный раствор.

Следует отметить, что содержание фактора VIII в анализируемых сериях 3-го и 6-го пассажа МСК плаценты не было однородным: минимальное содержание – 2,1–1,7 МЕ/мл, максимальное содержание достигало 34,6–27,8 МЕ/мл.

■ ОБСУЖДЕНИЕ

Многие типы клеток экспрессируют и высвобождают в окружающую среду тканевой фактор (ТФ), известный как CD142 или тканевой тромбопластин (фактор коагуляции III). Тканевой фактор свободно циркулирует в крови в своей растворимой форме [6], активирует внешнее плечо каскада коагуляции посредством связывания своего внеклеточного домена с фактором VII и фактором VIIa (FVIIa), создавая ковалентный комплекс TF-FVIIa [7]. После образования комплекса TF-FVIIa в присутствии кофактора VIII и кофактора V активируются факторы IX и X внутреннего и общего путей, что приводит к генерации тромбина, активации тромбоцитов и отложению фибрина [7].

Oeller M. и соавт. (2018) продемонстрировали, что МСК, полученные как из пуповины человека (UC-MSC), так и из жировой ткани (AD-MSC), проявляют большую экспрессию TF по сравнению с МСК, полученными из костного мозга (BM-MSC) [8]. При этом доля ТФ-позитивных МСК КМ не претерпевает никаких изменений, связанных с увеличением числа пассажей [9].

Другой механизм активации свертывания включает экспозицию прокоагулянтных липидов, в частности фосфатидилсерина, на поверхности клетки [10]. Было описано, что полученные из МСК внеклеточные везикулы (ВВ) могут экспонировать

Содержание фактора VIII (МЕ/мл) в лизате мезенхимальных стволовых клеток плаценты и костного мозга. Результат представлен как Ме (10–90-й процентиля)
Content of factor VIII (IU/ml) in the lysate of mesenchymal stem cells of the placenta and bone marrow. The result is presented as IU (10–90 percentiles)

Источник МСК	Исследуемая среда		
	Лизат МСК, n=10, активность фактора VIII, МЕ/мл	Среда после культивирования, n=10, активность фактора VIII, МЕ/мл	Отмывочный физраствор, n=10, активность фактора VIII, МЕ/мл
Костный мозг, 3-й пассаж (серия 1)	0,049 (0,015–0,372) p (C ₁₋₂)=0,44	0,006 (0,004–0,02) p (C ₁₋₂)=0,17	0,01 (0,009–0,06) p (C ₁₋₂)=0,95
Костный мозг, 6-й пассаж (серия 2)	0,029 (0,003–0,109)	0,0103 (0,001–0,091)	0,017 (0,005–0,056)
Послеродовая плацента, 3-й пассаж (серия 3)	14,98 (2,113–27,795) P (3–1)=0,0001 p (C ₃₋₄)=0,41	0,13 (0,101–0,645) P (3–1)=0,0001 p (C ₃₋₄)=0,57	6,12 (1,112–16,815) P (3–1)=0,0001 p (C ₃₋₄)=0,017
Послеродовая плацента, 6-й пассаж (серия 4)	7,31 (1,792–34,18) P (4–2)=0,0001	0,18 (0,081–0,480) P (4–2)=0,0001	2,12 (0,11–13,29) P (4–2)=0,0001

Примечания:
1. P – статистическая значимость различий между сериями (1–4) для однотипной среды (U-test).
2. p (C₁₋₂) – статистическая значимость различий между сериями (C) МСК костного мозга (3-й и 6-й пассаж) для соответствующей среды (T-test).
3. p (C₃₋₄) – статистическая значимость различий между сериями (C) МСК плаценты (3-й и 6-й пассаж) для соответствующей среды (T-test).

фосфатидилсерин на своей поверхности, что обеспечивает 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 [11].

Использование полимеразной цепной реакции (ПЦР) позволило С. Sanada и соавт. (2013) [12] в МСК ткани легких, головного мозга, печени, костного мозга, эндотелиальных клетках синусоидов печени человека (NHSEC) и эндотелиальных клетках пупочной вены (HUVEC) плода человека подтвердить присутствие матричной РНК FVIII. Содержание мРНК FVIII в эндотелиальных клетках пупочной вены в 60 раз превышало аналогичный показатель, зарегистрированный в МСК КМ. Различные популяции МСК при одинаковых пассажах показали различную активность FVIII в лизатах при фиксированном (1×10⁵/мл) содержании клеток: МСК легких – 1,1±0,4%; МСК печени – 0,6±0,06%; головного мозга – 0,3±0,03%; МСК КМ – 0,1±0,0%. Практически полное отсутствие FVIII в МСК КМ минимизирует прокоагулянтное действие ТФ, независимо от степени его экспрессии.

Результаты исследований, проведенных нами, показали следовую активность фактора VIII в МСК КМ, близкую к порогу чувствительности средства измерения. Лизат плацентарных МСК имел активность FVIII, в несколько раз большую, чем МСК КМ. Различные образцы плацентарной МСК при фиксированной клеточности суспензии



2×10^6 /мл содержали от 1,8 до 34,2 МЕ/мл FVIII, что в ряде случаев превышало содержание (4 МЕ/мл) FVIII в единице объема криопреципитата. С увеличением количества пассажей МСК-П от 3 до 6 содержание фактора свертывания крови VIII не возрастало, а в отдельных случаях становилось меньше.

Независимо от механизма, присутствие FVIII является обязательным условием активации коагуляционного каскада. Повышенное содержание FVIII в лизате МСК децидуальной оболочки плаценты, наряду с экспрессией ТФ, потенциально определяет более выраженный прокоагулянтный эффект в случае внутривенного введения, по сравнению с МСК КМ. Данное свойство может быть использовано для купирования геморрагического цистита или иных геморрагических осложнений аллогенной ТГСК, а также ряда аутоиммунных заболеваний, связанных с воспалением, для которых пока не найдено окончательного и успешного лечения. Для предотвращения тромботических осложнений при введении плацентарных МСК показано использование НФГ в дозе 5 МЕ/кг в сутки, вводимого методом внутривенного титрования с постоянной скоростью.

■ ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Zhou T., et al. Challenges and advances in clinical applications of mesenchymal stromal cells. *J Hematol Oncol.* 2021;14(1):24.
2. Wegmeyer H., et al. Mesenchymal stromal cell characteristics vary depending on their origin. *Stem Cells Dev.* 2013;22(19):2606–2618.
3. Stephenne X., et al. Bivalirudin in combination with heparin to control mesenchymal cell procoagulant activity. *PLoS One.* 2012;7(8):e42819.
4. Coppin L., Sokal E., St phenne X. Thrombogenic Risk Induced by Intravascular Mesenchymal Stem Cell Therapy: Current Status and Future Perspectives. *Cells.* 2019;27(8):1160.
5. Moll G., Ignatowicz L., Catar R., et al. Different Procoagulant Activity of Therapeutic Mesenchymal Stromal Cells Derived from Bone Marrow and Placental Decidua. *Stem Cells Dev.* 2015;24(19):2269–79.
6. Okorie U., et al. Determination of surface tissue factor thresholds that trigger coagulation at venous and arterial shear rates: Amplification of 100 fM circulating tissue factor requires flow. *Blood.* 2008;111:3507–3513.
7. Mandal S.K., Pendurthi U.R., Rao L.V. Cellular localization and trafficking of tissue factor. *Blood.* 2006;107:4746–4753.
8. 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.
9. Christy B., Herzig M., Montgomery R., et al. Procoagulant activity of human mesenchymal stem cells. *J. Trauma Acute Care Surg.* 2017;83:S164–S169.
10. Zhao L., et al. Phosphatidylserine exposing-platelets and microparticles promote procoagulant activity in colon cancer patients. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 35:54–64.
11. Van der Poll T., Herwald H. The coagulation system and its function in early immune defense. *Thromb. Haemost.* 2014;112:640–648.
12. Sanada C., Kuo C.J., Colletti E.J., et al. Mesenchymal stem cells contribute to endogenous FVIII:c production. *J Cell Physiol.* 2013;228(5):1010–1016.