

*А.Е.Скрягин<sup>1</sup>, Я.И.Исайкина<sup>3</sup>, В.В.Солодовникова<sup>2</sup>, Е.М.Скрягина, к.м.н.<sup>2</sup>,  
О.Т.Прасмыцкий<sup>1</sup>, З.И.Рогова<sup>2,2</sup>, П.А.Липницкая<sup>2</sup>, Е.Г.Лях<sup>3</sup>, О.В.Клименкова<sup>3</sup>,  
В.П.Савицкий<sup>3,3</sup>, М.Э.Хмыз<sup>2</sup>, Д.А.Ветушко<sup>2</sup>*

## **Применение мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток в терапии туберкулеза с множественной лекарственной устойчивостью**

*УО «БГМУ»<sup>1</sup>,  
ГУ «РНПЦ пульмонологии и фтизиатрии»<sup>2</sup>,  
ГУ «РНПЦДОГ»<sup>3</sup>*

Возможности усиления химиотерапии МЛУ-ТБ использованием аутологичных мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (МСК), обладающих иммунорегуляторными свойствами и способностью к тканевой пластике легких, определили направление данного исследования. Аутологичная трансплантация МСК была выполнена 13 пациентам с туберкулезом с множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ-ТБ). Полученные в работе данные доказывают клиническую эффективность применения аутологичных МСК при МЛУ-ТБ.

Ключевые слова: туберкулез, множественная лекарственная устойчивость, мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки.

Туберкулез с множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ-ТБ) характеризуется устойчивостью к двум основным противотуберкулезным препаратам (ППП), изониазиду и рифампицину. В последнее время появилась и распространяется еще более тяжелая форма МЛУ-туберкулеза с широкой лекарственной устойчивостью (ШЛУ-ТБ), характеризующийся дополнительной устойчивостью к любому из аминогликозидов и фторхинолонов [1]. Схемы лечения МЛУ-ТБ, основанные на принципах доказательной медицины, до сих пор не разработаны. Успех лечения варьирует от 22% до 68%, смертность – от 4% до 37% [2]. Кроме того, количество рецидивов заболевания после излечения достаточно высоко [2]. Одним из современных терапевтических подходов является цитотерапия мезенхимальными стромальными стволовыми клетками (МСК). В литературе описаны немногочисленные случаи использования МСК при МЛУ-ТБ, указывающие, по крайней мере, на безопасность метода [3, 4].

### **МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.**

**Пациенты.** В исследование вошло 13 пациентов с МЛУ-ТБ, модель устойчивости микобактерий туберкулеза (МБТ) у которых была подтверждена тестированием лекарственной чувствительности (ТЛЧ) к основным и резервным ППП. Все пациенты получали индивидуализированную химиотерапию (ИХТ) с учетом результатов ТЛЧ. 12-ти пациентам на фоне основного курса ИХТ было проведено дополнительное лечение МСК (таблица 1).

Таблица 1. Характеристика пациентов МЛУ-ТБ.

Группа п	Пол м/ж	Возраст Ме (min-max)	Длительность ТБ (мес)	Кол-во предшествующих курсов ХТ Ме (min-max)	Модель ЛУ М/Ш	ЛУ к (кол-во ППП)
ИХТ+МСК 13	9/4	29(25-50)	21(2-58)	2(0-4)	8/5	7(4-9)
ИХТ 21	16/5	32(22-52)	18(2-46)	2(0-4)	15/6	6(4-9)

ХТ – химиотерапия; ИХТ – индивидуализированная ХТ, М/Ш – множественная/широкая; ЛУ – лекарственная устойчивость.

Забор костного мозга (КМ) проводили в асептических условиях, под местной анестезией, аспирацией из одного или нескольких проколов подвздошной кости с последующим помещением КМ в вакутайнеры с сухим гепарином. Получение аутотрансплантата МСК. Мононуклеарные клетки (МНК) выделяли из КМ методом разделения по градиенту плотности на Гистопаке 1,077 (Sigma, США) с последующей двукратной отмывкой в 0,9% растворе хлорида натрия (НЗМП, РБ). Полученные МНК ресуспендировали в среде «IMDM», содержащей 10% эмбриональную телячью сыворотку (Sigma, США), 2 мМ/л L-глутамина и 10<sup>-4</sup> М/л 2-меркаптоэтанола, и переносили в концентрации 2–3x10<sup>6</sup>/мл во флакон объемом 175 см<sup>2</sup> (Sarstedt, Германия). Клетки инкубировали при 37° в 5% CO<sub>2</sub>. Через 48 часов производили смену среды, удаляя клетки, находящиеся в суспензии. При 80–90% покрытии поверхности флакона прикрепленными клетками, среду удаляли и клетки дезадгезировали с пластика добавлением 5 мл 0,25% трипсин-ЭДТА (Sigma, США). При переходе всех клеток во взвешенное состояние действие трипсина ингибировали с помощью ЭТС. Клетки отмывали в 0,9% растворе хлорида натрия и в количестве 1x10<sup>6</sup> пересаживали во флаконы 175 см<sup>2</sup> (1-ый пассаж). Таким образом, было проведено 3 пассажа, при которых МСК наращивали *in vitro* до необходимого количества. Клетки, снятые с поверхности флаконов последнего пассажа, дважды отмывали в физиологическом растворе, переносили в шприц в объеме 20 мл для реинфузии пациенту. Перед реинфузией клетки, наращенные *in vitro*, были идентифицированы по наличию/отсутствию поверхностных маркеров CD105, CD90, CD44, CD34, CD45, CD14. Обязательным требованием являлось исследование МСК из каждого пассажа на стерильность по всему спектру возможной бактериальной и вирусной контаминации

Иммунофенотипический анализ МСК. Окраску клеток моноклональными антителами (МКА) CD105, CD90, CD44, CD34, CD14 меченными ФЭ и CD45, меченными ФИТЦ (Beckman Coulter), проводили по стандартной методике. Оценку неспецифического связывания МКА проводили с использованием изотипического контроля. К образцу (100-200 тыс. клеток) добавляли 20 мкл специфических моноклональных антител (МКА) и изотипического контроля и инкубировали в темноте при комнатной температуре 25-30 мин. После

инкубации с антителами клетки дважды отмывали в фосфатном буфере, центрифугируя 5 мин. при 300g. Анализ проводили на проточном цитофлуориметре FACSCan Becton Dickinson в программе CellQuestPro. Для каждого образца анализировали не менее 10 тыс. клеток. Дополнительно к исследованию связывания МКА регистрировали параметры прямого и бокового светорассеяния клеток.

Оценка жизнеспособности МСК. В 0,5 мл пробирку вносили 20 мкл суспензии клеток и 20 мкл 0,4 % раствора трипанового синего. При помощи светового микроскопа в камере Горяева подсчитывали окрашенные и неокрашенные клетки в количестве не менее 100 клеток.

Данное исследование было одобрено локальным этическим комитетом.

Информированное согласие было получено от всех пациентов, получивших МСК в качестве адъювантной терапии МЛУ-ТБ.

#### РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.

Характеристики аутотрансплантата МСК. Трансплантат МСК создавался для каждого пациента индивидуально. Все полученные *in vitro* МСК были морфологически однородны, имели фибробластоподобную форму и морфологически не проявляли признаков “старения”, Для инфузии пациенту использовалась только свежеприготовленная культура МСК, срок приготовления трансплантата МСК составлял 2-4 часа до введения. Ни в одной клеточной культуре при контроле на бактериальную и вирусную контаминацию патогенов не было выявлено. При получении аутотрансплантата МСК использовали ( $M \pm m$ )  $55,3 \pm 1,88$  мл КМ, из которого было выделено  $273,17 \pm 41,77 \times 10^6$  МНК. Для получения достаточного количества МСК продолжительность культивирования составляла от 27 до 44 дней. Количество МСК на выходе составляло  $Me$  (min.-max.)  $68,5$  ( $13, 2 - 135$ )  $\times 10^6$ , что соответствовало ( $M \pm m$ )  $1,08 \pm 0,11$  МСК/кг массы пациента. CD90 антиген экспрессировали 98,7% (75,7% – 99,9%) клеток, CD105 антиген - 93,9% (75,1% – 99,5%) клеток и CD44 антиген - 99,7% (71,9% – 99,9%) клеток. Экспрессия CD45 и CD34 составляла в каждом из полученных образцов МСК менее 1%, наличие CD14 антигена было выявлено менее чем у 2 % клеток перед реинфузией. Жизнеспособность МСК составляла 98% (95% - 99%).

Анализ результатов лечения. Используемыми в работе критериями эффективности лечения были наличие или отсутствие в течение 10 месяцев ИХТ: конверсии мокроты (получение 3-х подряд с промежутком в 1 месяц отрицательных результатов, как микроскопии, так и культуры) и рентгенологических признаков улучшения (уменьшение инфильтрации, уменьшение или закрытие полостей).

Таблица 2 • Результаты 10-месячной ИХТ пациентов с МЛУ-ТБ.

Группа	(n)	Конверсия мокроты		R-логическое улучшение	
		Абс.	% (95% ДИ)	Абс.	% (95% ДИ)
ИХТ+МСК	13	12/13	92,3(77,8-106,7)	12/12	100
ИХТ	21	13/21	61,9 (41,1- 82,7)	15/21	71,4 (52,2-90,8)
ОР (95% ДИ)	95% ДИ	1,49 (1,03-2,16)		1,62 (1,15-2,26)	

ДИ – доверительный интервал, ОР – относительный риск.

ИХТ с адьювантной терапией аутологичными МСК имела достоверное преимущество перед одной ИХТ (Таблица 3).

#### ВЫВОДЫ.

Результаты проведенного исследования показывают, что:

- 1) аутотрансплантат МСК может быть получен в достаточном количестве путем экспансии в культуре из КМ пациентов, получавших терапию ПТП
- 2) Применение аутологичных МСК при МЛУ-ТБ на фоне ИХТ улучшает результаты лечения.

#### Литература

1. World Health Organization, the HWO/IUATLD Anti-tuberculosis drug resistance in the world: The WHO/IUATLD Global Project on Anti-Tuberculosis Drug Resistance Surveillance. Anti-tuberculosis Drug Resistance in the World: Forth Global Report. WHO/HTM/TB/2008.394. Geneva : WHO, 2008. 64 p.
2. Frequency of recurrence among MDR-TB cases “successfully” treated with standardised short-course chemotherapy / G. B. Migliori [et al.] // International J. of Tuberculosis a. Lung Disease. 2002. Vol. 6. P. 858–864.
3. Системная трансплантация аутологичных мезенхимальных стволовых клеток костного мозга в лечении больных множественным лекарственно – устойчивым туберкулезом легких / В. В. Ерохин [и др.] // Проблемы туберкулеза и болезней легких. 2008. № 10. С. 3–6.
4. Skrahin, S. Krivenko, A. Skrahina, A. Rozhkov. Autologus mesenchymal stem cell transplantation in extensively drug – resistant pulmonary tuberculosis: A case study. Abstracts Seventh International Conference on the Pathogenesis of Mycobacterial Infections, Stockholm, Sweden, June 26–29 2008 / Skrahin, S. Krivenko, A. Skrahina, A. Rozhkov.. Stockholm, Sweden, 2008. P 150.