



<https://doi.org/10.34883/PI.2022.25.5.013>
УДК 616-002.5:579.873.21:615.281873.21]-07



Солодовникова В.В.¹, Скрыгин А.Е.², Исайкина Я.И.³, Гуревич Г.Л.¹, Ветушко Д.А.¹,
Климук Д.А.¹, Дюсьмикеева М.И.¹, Печинский Д.Г.¹, Новикова М.А.³, Метелица Л.И.¹,
Скрягина Е.М.¹, Рогова З.И.¹

¹ Республиканский научно-практический центр пульмонологии и фтизиатрии,
Минск, Беларусь

² Белорусский государственный медицинский университет, Минск, Беларусь

³ Центр исследований и испытаний в здравоохранении, Минск, Беларусь

Применение аутологичных мезенхимальных стромальных клеток для лечения пациентов с лекарственно-устойчивым туберкулезом легких

Конфликт интересов: не заявлен.

Вклад авторов: концепция и дизайн исследования, сбор и обработка материала, анализ данных, написание текста, редактирование – Солодовникова В.В.; концепция и дизайн исследования, анализ данных, написание текста, редактирование – Дюсьмикеева М.И., Климук Д.А.; концепция и дизайн исследования – Гуревич Г.Л., Скрягина Е.М.; концепция и дизайн исследования, обработка материала – Исайкина Я.И., Новикова М.А.; сбор материала – Ветушко Д.А., Печинский Д.Г., Метелица Л.И.

Подана: 03.10.2022
Принята: 20.10.2022
Контакты: trimige@inbox.ru

Резюме

Постоянно продолжают поиски новых эффективных методов лечения пациентов с туберкулезом с множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ-ТБ). Одним из перспективных путей в этом направлении является применение клеточной терапии мезенхимальными стромальными клетками (МСК), в результате которой восстанавливается популяция стромальных клеток в различных органах, в том числе и в легких. Провести оценку эффективности применения аутологичных МСК у пациентов с МЛУ-ТБ. В исследование было включено 60 пациентов от 18 до 65 лет с МЛУ-ТБ при отсутствии тяжелых острых и хронических сопутствующих заболеваний, аутоиммунных и аллергических заболеваний в фазе обострения, находившихся на лечении в Республиканском научно-практическом центре пульмонологии и фтизиатрии с 2009 по 2018 г. На фоне противотуберкулезного лечения пациентам с МЛУ-ТБ проводился забор костного мозга, а затем внутривенное введение аутологичных МСК. Некоторым пациентам с туберкулезом с широкой лекарственной устойчивостью (ШЛУ-ТБ) введение аутологичных МСК проводили дважды (10 пациентов). У всех пациентов была выявлена устойчивость к R, при этом 23,5% составляли пациенты с устойчивостью только к препаратам 1-го ряда (изониазиду, рифампицину, этамбутолу и пирразинамиду) и 63,5% составляли пациенты с дополнительной устойчивостью к фторхинолонам (офлоксацин, левофлоксацин, моксифлоксацин). У 30% пациентов определялась положительная микроскопия мазка. Двустороннее поражение легких отмечалось у 33% пациентов, и у 73% определялись полости распада. На фоне противотуберкулезного лечения пациентам с МЛУ-ТБ проводилось забор костного

мозга, а затем внутривенное введение аутологических МСК. Среднее значение мононуклеарных клеток, выделенное из костного мозга пациентов с МЛУ-ТБ, составило 323×10^6 , при этом среднее значение аутологических МСК, полученных для введения пациентам, было 68×10^6 . В среднем клеточная доза составила 1×10^6 /кг веса пациента. Длительность культивации МСК в среднем было 35 дней. Эффективность лечения в когорте была очень высокой и составила 90%, кроме этого, у всех пациентов, успешно излечившихся от ТБ с применением аутологических МСК, рецидивов туберкулеза зарегистрировано не было. Наши результаты показывают высокую эффективность применения аутологических МСК у пациентов с МЛУ-ТБ. В настоящее время продолжаются исследования в этой области у пациентов, находящихся на коротких режимах лечения МЛУ-ТБ, с применением бедаквилина и претоманида и введением аутологических МСК.

Ключевые слова: туберкулез с множественной лекарственной устойчивостью, мезенхимальные стромальные клетки, эффективность лечения

Solodovnikova V.¹, Skrahin A.², Isaikina Y.³, Hurevich H.¹, Vetushko D.¹, Klimuk D.¹,
Dziusmikeyeva M.¹, Pechinski D.¹, Novikova M.³, Metelitsa L.¹, Skrahina A.¹, Rohava Z.¹

¹ Republican Scientific and Practical Center of Pulmonology and Phthisiology, Minsk, Belarus

² Belarusian State Medical University, Minsk, Belarus

³ Center for Examinations and Tests in Health Service, Minsk, Belarus

Application of Autologous Mesenchymal Stromal Cells for the Treatment of Patients with Drug-Resistant Pulmonary Tuberculosis

Conflict of interest: nothing to declare.

Authors' contribution: research concept and design, collection and processing of material, data analysis, text writing, editing – Solodovnikova V.; research concept and design, data analysis, text writing, editing – Dziusmikeyeva M., Klimuk D.; research concept and design – Hurevich H., Skrahin A.; research concept and design, processing of the material – Isaikina Y., Novikova M.; collection of the material – Vetushko D., Pechinski D., Metelitsa L.

Submitted: 03.10.2022

Accepted: 20.10.2022

Contacts: trimige@inbox.ru

Abstract

The search for new effective treatments for patients with multidrug-resistant tuberculosis (MDR-TB) is ongoing. One of the most promising ways in this direction is the use of cell therapy with mesenchymal stromal cells (MSCs), which restores the population of stromal cells in various organs, including the lungs. To evaluate the effectiveness of autologous MSCs in MDR-TB patients. The study included 60 patients aged 18 to 65 years with MDR-TB in the absence of severe acute and chronic comorbidities, autoimmune and allergic diseases in the acute phase, who were treated at the Republican Scientific and Practical Center of Pulmonology and Phthisiology (RSPC PIF) since 2009 year to 2018. On the background of anti-tuberculosis treatment, patients with MDR-TB underwent bone



marrow sampling and then intravenous injection of autologous MSCs. Some patients with extensively drug-resistant tuberculosis (XDR-TB) received autologous MSCs twice (10 patients). All patients were resistant to R, with 23.5% of patients with resistance to only 1st line drugs (isoniazid, rifampicin, ethambutol and pyrazinamide) and 63.5% of patients with additional resistance to fluoroquinolones (ofloxacin, levofloxacin, moxifloxacin). Positive smear microscopy was determined in 30% of patients. Bilateral lung involvement was noted in 33% of patients, and 73% had disintegration cavities. Against the background of anti-tuberculosis treatment, patients with MDR-TB underwent bone marrow sampling, and then intravenous administration of autologous MSCs. The average value of mononuclear cells isolated from bone marrow of MDR-TB patients was 323×10^6 , while the average value of autologous MSCs obtained for administration to patients was 68×10^6 . The average cell dose was 1×10^6 /kg patient weight. The cultivation duration of MSCs, on average, was 35 days. Treatment efficiency in the cohort was very high and amounted to 90%, in addition, all patients who were successfully cured of TB with autologous MSCs had no recurrence of tuberculosis. Our results show high efficacy of autologous MSCs in patients with MDR-TB. At present, studies in this area are continuing in patients on short MDR-TB treatment regimens with bedaquiline and pretomanid and administration of autologous MSCs.

Keywords: multidrug-resistant tuberculosis, mesenchymal stromal cells, treatment efficacy

■ ВВЕДЕНИЕ

Туберкулез с множественной лекарственной устойчивостью, вызываемый микобактериями туберкулеза, устойчивыми одновременно к изониазиду и рифампицину, является в настоящее время серьезной проблемой. Возможности применения химиотерапии при МЛУ-ТБ ограничены, а результаты лечения крайне неудовлетворительны [1]. Актуальность проблемы МЛУ-ТБ обусловлена высокой заболеваемостью, смертностью, неудовлетворительными результатами лечения этой формы заболевания и отрицательным влиянием на общую эпидемиологическую ситуацию по туберкулезу (ТБ) в мире и в Республике Беларусь [2].

Кроме использования новых противотуберкулезных лекарственных средств (ПТЛС), у пациентов с МЛУ-ТБ продолжают поиски иных эффективных методов воздействия на иммунологические и регенеративные процессы организма. Одним из перспективных путей в этом направлении является применение клеточной терапии мезенхимальными стромальными клетками (МСК), в результате которой восстанавливается популяция стромальных клеток в различных органах, в том числе и в легких [3]. МСК являются источником цитокинов и ростовых факторов, которые участвуют в регуляции иммунного ответа, а также в регенерации поврежденной ткани легкого [4].

Установлено, что МСК обладают следующими свойствами:

1. Противомикробная активность. МСК костного мозга человека обладают прямой антимикробной активностью, которая проявляется через секрецию человеческого антимикробного пептида кателицидина hCAP-18/LL-37 [5]. Кроме этого,

противомикробная активность происходит за счет фермента, катаболизирующего триптофан-индоламин-2,3-диоксигеназу (IDO) [6]. МСК генерируют многочисленные прямые и непрямые иммунологически опосредованные антимикробные факторы, которые в совокупности помогают устранить хронические бактериальные инфекции при терапевтическом введении клеток [7].

2. Репаративный эффект. МСК секретируют антифибротические и антиапоптотические факторы, которые потенциально могут восстанавливать поврежденные ткани [8]. Кроме того, МСК секретируют множество цитокинов и факторов роста, обладающих как паракринной, так и аутокринной активностью. Эти секретируемые биоактивные факторы подавляют локальную иммунную систему, ингибируют фиброз (образование рубцов) и апоптоз, усиливают ангиогенез и стимулируют митоз и дифференцировку внутренних репаративных или стволовых клеток [9].

Применение аутологичных МСК для различных клинических целей показало клиническую безопасность продукта для пациентов. Имеются данные об успешном использовании МСК при туберкулезе с множественной лекарственной устойчивостью МЛУ-ТБ [10].

■ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В когортное ретроспективное исследование было включено 60 пациентов с МЛУ-ТБ, находившихся на лечении МЛУ-ТБ в Республиканском научно-практическом центре пульмонологии и фтизиатрии (РНПЦ Пиф) с 2009 по 2018 г. Критерием включения

Исходные демографические и клинические характеристики пациентов с МЛУ-ТБ, которым были введены аутологичные МСК на фоне противотуберкулезного лечения, 2009–2018 гг., Беларусь (n=60)
Baseline demographic and clinical characteristics of MDR-TB patients who were injected with autologous MSCs against the background of antituberculosis treatment, 2009–2018, Belarus (n=60)

А. Демографические характеристики			
Характеристики		n	%
Возраст в годах, средний (СО)		31	(8,7)
Пол	Мужской	29	48
	Женский	31	52
Тип проживания	Городской	35	58
	Сельский	25	42
Образование	Высшее образование	12	20
	Среднее специальное	27	45
	Среднее образование	21	35
Работа	Да	30	50
	Нет	30	50
Неработающие	Декретный отпуск	7	12
	Инвалидность	8	13
	Студенты	5	8
	Не работают	10	17
Курение	Да	15	25
	Нет	45	35



Окончание таблицы

В. Клинические характеристики			
Характеристики		n	%
Сопутствующие заболевания	Да	23	38
	Нет	37	62
История лечения ТБ	Впервые выявленный	24	40
	Ранее леченый	36	60
Бактериологическое подтверждение	Да	60	100
	Нет	0	0
Результат исходной микроскопии мазка	Положительный	18	30
	Отрицательный	43	70
Результат исходной культуры	Положительный	60	100
	Отрицательный	0	0
Тип лекарственной устойчивости	МЛУ	14	23,5
	МЛУ + фторхинолоны	5	8,5
	МЛУ + инъекционные	8	13
	ШЛУ	33	55
Локализация ТБ	Легочный	60	100
	Внелегочный	0	0
Объем поражения легких	Двусторонний	20	33
	Односторонний	40	67
Наличие полостей распада	Да	44	73
	Нет	16	27
ПТЛС, включенные в режим лечения	Бедаквилин (Bdq)	12	20
	Деламанид (Dlm)	4	7
	Бедаквилин (Bdq) + деламанид (Dlm)	3	7
	Офлоксацин (Ofx)	6	10
	Левифлоксацин (Lfx)	26	43
	Моксифлоксацин (Mfx)	19	32
	Линезолид (Lzd)	17	28
	Клофазимин (Cfz)	13	22
	Циклосерин (Cs)	48	80
	Амикацин (Am)	3	5
	Канамицин (Km)	6	10
	Капреомицин (Cm)	39	65
	Протионамид/этионамид (Pto/Eto)	50	83
	Имипенем/циластатин (Imp)+ Амоксициллин / клавулановая кислота (Amx/Clv)	12	20
	Клавулановая кислота (Amx/Clv)	13	22
	Кларитромицин (Clr)	5	8
	Пимразинамид (Z)	20	33

Примечания: МЛУ – множественная лекарственная устойчивость; ПТЛС – противотуберкулезные лекарственные средства; ТБ – туберкулез; ШЛУ – широкая лекарственная устойчивость; СО – стандартное отклонение; R – устойчивость к рифампицину.

было наличие у пациента лекарственно-устойчивого туберкулеза легких. Критериями исключения были наличие тяжелых острых и хронических сопутствующих заболеваний; наличие аутоиммунных и аллергических заболеваний в фазе обострения; беременность и лактация; алкоголизм или наркомания у пациента. Лечение началось республиканским консилиумом по лечению МЛУ-ТБ на основе модели лекарственной чувствительности. Противотуберкулезное лечение пациенты получали с учетом руководства по лечению туберкулеза Министерства здравоохранения Республики Беларусь и рекомендаций ВОЗ. Перед участием в исследовании пациенты подписывали информированное согласие.

Из образцов мокроты проводились следующие исследования: микроскопия мокроты, молекулярно-генетические исследования (GeneXpert MTB/RIF, LPA), посевы на плотные и жидкие питательные среды для определения МБТ и модели лекарственной чувствительности к препаратам первого и второго ряда.

На фоне противотуберкулезного лечения пациентам с МЛУ-ТБ проводился забор костного мозга, а затем внутривенное введение аутологичных МСК. Некоторым пациентам ($n=10$) с туберкулезом с широкой лекарственной устойчивостью (ШЛУ-ТБ) введение аутологичных МСК проводили дважды.

Получение МСК. Аутологичные МСК получали из костного мозга пациентов с МЛУ-ТБ. Эксфузию костного мозга в объеме 60–80 мл проводили посредством костномозговой пункции под местной анестезией. Мононуклеарные клетки выделяли на Гистопаке плотностью $1,077$ (Sigma, США), дважды отмывали в 0,9% растворе NaCl, ресуспендировали в IMDM с 10% ЭТС (Invitrogen, США) и переносили в концентрации $2-3 \times 10^6$ /мл во флакон объемом 175 см^2 (Sarstedt, Германия). Клетки инкубировали при 37°C в 5% CO_2 . При 80–90% покрытии поверхности флакона прикрепленными клетками их дезадгезировали при помощи 0,25% трипсин-ЭДТА (Invitrogen, США). Полученную первичную культуру МСК пересеживали в новые флаконы 175 см^2 (I пассаж) и культивировали при разных условиях: в первом случае полная культуральная среда состояла из IMDM с 10% ЭТС; во втором случае полная культуральная среда состояла из IMDM с добавлением 5% лизата тромбоцитов и гепарина.

МСК экспандировали на протяжении 2–3 пассажей для получения эффективного количества МСК с клеточностью не менее 1×10^6 /кг веса пациента. Клетки дважды отмывали в NaCl, концентрировали и переносили в шприц в 0,9% растворе NaCl в объеме 20 мл для введения пациенту. Аутологичные МСК были идентифицированы на проточном цитофлуориметре на наличие поверхностных маркеров CD90, CD105, CD73, характерных для МСК. Обязательным требованием являлось исследование культуры МСК на стерильность по всему спектру бактериальной и вирусной контаминации.

Для проведения процедуры введения аутологичных МСК пациентов переводили в отделение интенсивной терапии и реанимации (ОИТР), где начинали мониторинг жизненных функций (ЭКГ, артериальное давление, пульс, частота дыхания, SpO_2). Мониторинг в условиях ОИТР продолжали не менее 2 часов после реинфузии, после чего пациентов переводили в туберкулезное отделение под наблюдение персонала отделения.

Необходимо отметить преимущества внутривенного введения клеточного материала: является наиболее безопасным способом введения клеток в организм



по сравнению с внутриартериальным, интратрахеальным, внутриопухолевым и другими методами доставки клеток; дает возможность применять МСК в высоких дозах в течение длительного времени по сравнению с вышеперечисленными методами; отсутствует необходимость хирургического вмешательства, т. е. меньшая травматичность операции; дает возможность повторного введения МСК для усиления эффекта; обеспечивает доставку МСК в зону поражения в связи с наличием на МСК рецепторов CXCR4 и CCR7. В первые сутки после внутривенной трансплантации МСК в основном обнаруживаются в легких.

■ РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Возрастной состав пациентов был представлен от 18 до 50 лет. Среди пациентов 48% составляли мужчины. 40% пациентов были впервые выявленные, ранее не получавшие лечения по поводу туберкулеза. У всех пациентов установлена устойчивость к рифампицину (R), при этом 23,5% составляли пациенты с устойчивостью только к препаратам 1-го ряда (изониазиду, рифампицину, этамбутолу и пиразинамиду) и 63,5% составляли пациенты с дополнительной устойчивостью к фторхинолонам (офлоксацин, левофлоксацин, моксифлоксацин). У 30% пациентов наблюдалась положительная микроскопия мазка, причем у всех пациентов было массивное бактериовыделение. Двустороннее поражение легких отмечалось у 33% пациентов, у 73% определялись полости распада.

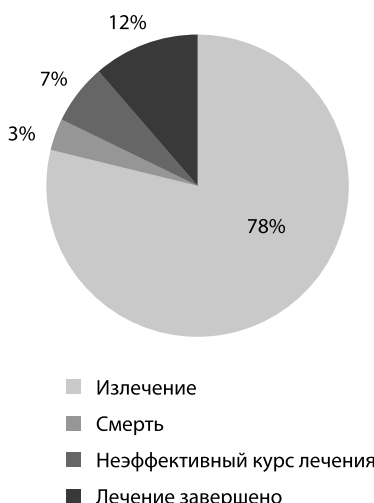
Лечение пациентов с МЛУ-ТБ состояло из интенсивной фазы, продолжительностью 6–8 месяцев, и фазы продолжения лечения – 12–14 месяцев. Пациенты были госпитализированы в РНПЦ ПиФ на срок не менее четырех месяцев во время интенсивной фазы лечения. После завершения интенсивной фазы лечения пациентов выписывали на амбулаторный этап по месту жительства. Всем пациентам проводилось тестирование на ВИЧ.

В связи с тем, что применение новых ПТЛС (бедаквилина и деламаида) началось в республике с 2015–2016 гг., соответственно, доля пациентов, получавших новые ПТЛС, составила всего 22%.

Ответ на лечение оценивался ежемесячно путем проведения микроскопии мазка, посева мокроты на плотные питательные среды и клинического обследования. Рентгенография органов грудной клетки выполнялась каждые три месяца во время интенсивной фазы и каждые шесть месяцев во время фазы продолжения. Анализы крови проводились ежемесячно для диагностики и своевременного лечения нежелательных явлений, включая электролитные нарушения, анемию, тромбоцитопению, лейкопению, тесты функции печени и почек.

Среднее значение мононуклеарных клеток, выделенное из костного мозга пациентов с МЛУ-ТБ, составило 323×10^6 , при этом среднее значение аутологичных МСК, полученных для введения пациентам, было 68×10^6 . В среднем клеточная доза составила 1×10^6 /кг веса пациента. Длительность культивации МСК в среднем была 35 дней.

Результаты лечения пациентов с МЛУ-ТБ с применением аутологичных МСК представлены на рисунке, из которого видно, что успех лечения (излечение + лечение завершено) был очень высоким и составил 90%.



**Результаты лечения пациентов с ЛУ-ТБ с применением аутологических МСК в период с 2009 по 2018 г.
Results of treatment of patients with DR-TB, using autologous MSCs from 2009 to 2018**

Для сравнения, по данным республиканского регистра «Туберкулез», эффективность лечения пациентов с МЛУ-ТБ, начавших лечение в 2014 г., составила 54%. У пациентов, начавших лечение в 2018 г. (часть пациентов получала новые ПТЛС), эффективность лечения составила 74%. Случаи смертельного исхода были связаны с неэффективностью проводимого противотуберкулезного лечения и прогрессированием туберкулеза.

Необходимо отметить, что на момент окончания II квартала 2022 г. у всех пациентов, успешно излечившихся от ТБ с применением аутологических МСК, рецидивов туберкулезного процесса зарегистрировано не было.

■ ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Наши результаты показывают высокую эффективность применения аутологических МСК у пациентов с МЛУ-ТБ. Аутологичные МСК не только способствовали излечению МЛУ-ТБ, но и оказывали противорецидивное действие. В настоящее время продолжаются исследования в этой области. Аутологичные МСК используются у пациентов, находящихся на коротких режимах лечения МЛУ-ТБ, с применением бедаквилина и претоманида.



■ ЛИТЕРАТУРА

1. World Health Organization (2019) *Global tuberculosis report 2019*. Geneva: World Health Organization. Available from: https://www.who.int/tb/publications/global_report/en/
2. Kral'ko V.YA., Klimuk D.A., Gurevich G.L. et al. (2017) Epidemiologiya tuberkuleza s shirokoj lekarstvennoj ustojchivost'yu v respublike Belarus'. Proceedings of the *Mezhdunarodnaya nauchno-prakticheskaya konferenciya «Novye podhody k diagnostike i lecheniyu tuberkuleza»* (Minsk, Belarus, December 11–12, 2017), pp. 10–16 (In Russian).
3. Rankin S. (2012) Mesenchymal stem cells. *S. Thorax*, vol. 67, no 6, pp. 565–566.
4. Korbli M., Estrov Z. (2003) Adult stem cells for tissue repair – a new therapeutic concept. *N. Engl. J. Med.*, vol. 349, pp. 570–582.
5. Moravej A., Kouhpayeh A., Geramizadeh B. et al. (2019) The Effect of Mesenchymal Stem Cells on the Expression of IDO and Qa2 Molecules in Dendritic Cells. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, vol. 9, no 1, pp. 56–63. doi:10.15171/apb.2019.007
6. Meisel R., Brockers S., Heseler K. et al. (2011) Human but not murine multipotent mesenchymal stromal cells exhibit broad-spectrum antimicrobial effector function mediated by indoleamine 2,3-dioxygenase. *Leukemia*, vol. 25, pp. 648–654.
7. Chow L., Johnson V., Impastato R. et al. (2019) Antibacterial activity of human mesenchymal stem cells mediated directly by constitutively secreted factors and indirectly by activation of innate immune effector cells. *Stem Cells Transl. Med.*, vol. 9, no 2, pp. 235–249. doi: 10.1002/sctm.19-0092.
8. Lai R.C., Arslan F., Lee M.M. et al. (2010) Exosome secreted by MSC reduces myocardial ischemia/reperfusion injury. *Stem Cell Res.*, vol. 4, no 3, pp. 214–222.
9. Caplan A., Dennis J.E. (2006) Mesenchymal stem cells as trophic mediators. *J. Cell Biochem.*, vol. 98, no 5, pp. 1076–1084.
10. Skrahin A., Jenkins H.E., Hurevich H. et al. (2016) Effectiveness of a novel cellular therapy to treat multidrug-resistant tuberculosis. *Int. J. Mycobacteriol.*, vol. 1, pp. 23. doi: 10.1016 / j.ijmyco.2016.11.018.