

КЛИНИЧЕСКИЙ ОПЫТ

Лечебный эффект системной трансплантации культивируемых аутогенных мезенхимальных стволовых клеток костного мозга у больных с резистентными формами туберкулеза легких

И.А. Васильева¹, А.Г. Конопляников^{*2}, В.В. Ерохин¹, А.Ф. Цыб², Т.Р. Багдасарян¹, А.А. Даниленко², Л.А. Лепехина², С.Ш. Кальсина², И.В. Семенова², Е.В. Агаева²

¹Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза РАМН, Москва

²Медицинский радиологический научный центр РАМН, Обнинск

Therapeutic effects of systemic transplantation of cultured autologous mesenchymal stem cells derived from bone marrow in patients with resistant pulmonary tuberculosis

I.A. Vasiljeva¹, A.G. Konoplyannikov², V.V. Erokhin¹, A.F. Tsyb², T.R. Bagdasaryan¹, A.A. Danilenko², L.A. Lepekhina², S.Sh. Kalsina², I.V. Semenova², E.A. Agaeva²

¹Central Tuberculosis Research Institute, RAMS, Moscow

²Medical Radiological Research Center, RAMS, Obninsk

Известно, что системная трансплантация мезенхимальных стволовых клеток (МСК) может способствовать развитию репаративных процессов в различных поврежденных тканях, в том числе и в ткани легкого. Это послужило основанием для нашего исследования, в котором изучали эффект системной трансплантации (внутривенного введения) аутогенных МСК при проведении комплексной терапии больных с резистентными формами туберкулеза легких. В нашем исследовании, начатом три года назад, под наблюдением находится 27 больных с туберкулезом легких, из которых 15 пациентов относятся к категории MDR (multidrug resistance), а 12 пациентов – к категории X-DR (X-drug resistance). Все больные являлись бактериовыделителями с распространенными кавернозными процессами в легочной ткани, у 17 пациентов до включения в схему терапии системной трансплантации 150–200 млн размноженных в клеточной культуре МСК из аутогенного костного мозга был хронический туберкулез (продолжительность заболевания – от 13 месяцев до 5 лет), а у остальных 10 пациентов диагноз заболевания был поставлен за 6–12 месяцев. После введения МСК во всех 27 случаях наблюдался положительный клинический эффект; больные отмечали улучшение общего состояния, уменьшение одышки, значительное уменьшение или исчезновение слабости и недомогания, 24 пациента прибавили в весе. У 20 пациентов через 3–4 месяца после трансплантации аутогенных МСК отмечено стойкое прекращение бактериовыделения, а у 11 больных в дальнейшем наступило заживление длительно существующих каверн легочной ткани. В настоящий период у 9 из 16 больных, которым трансплантировали МСК 1,5–2 года назад, можно констатировать стойкую ремиссию туберкулезного процесса. У 6 пациентов этой группы наблюдается существенная положительная бактериологическая и морфологическая динамика, только в 1 случае из 16 эффект трансплантации МСК ограничился непродолжительным клиническим улучшением. Таким образом, включение в курс противотуберкулезной терапии трансплантации размноженных в культуре аутогенных МСК может явиться перспективным способом повышения эффективности проводимой терапии у пациентов с резистентными формами туберкулеза легких.

Ключевые слова: мезенхимальные стволовые клетки, системная трансплантация, туберкулез легких, множественная резистентность к препаратам

Systemic transplantation of mesenchymal stem cells (MSC) is known to promote reparative process in a number of tissue damage as well as lung tissue one. It provided the basis for our study which was aimed to the effect of systemic transplantation of autologous MSC (intravenous transfusion) in complex therapy of patients with resistant pulmonary tuberculosis. Started three years ago, 27 tuberculous patients are being under our observation now; 15 patients were classified as having multidrug resistance, 12 cases – as being X-drug resistant. Bacterioexcretion and substantial pulmonary cavitation were observed in every patient, most of them (n=17) having chronic tuberculosis of 13 months to 5 years duration, the rest 10 patients diagnosed 6 to 12 months before including them to the study. All these patients had previously been undertreated or unsuccessfully treated, with one patient having one lung removed. Undergone systemic transplantation of 150–200 million of cultured MSCs derived from autologous bone marrow the patients continued conservative therapy started before. 16 patients have been under observation for 1.5–2 years and longer after transplantation, the rest 11 patients observed not less than 6 months. MSC-introduction gave positive clinical effects in all 27 cases: somatic status improvement, dyspnoea reduction, relieving of weakness and indisposition, putting on weight (24 cases). 3–4 months after transplantation bacterioexcretion was noticed to stop in 20 patients, in 11 patients long-termed cavities healed later. At present 9 of 16 patients who had MSC transplantation 1.5–2 years ago can be stated to have stable remission of tuberculosis, 6 patients of this group demonstrate significant positive bacteriological and morphological dynamics. Only in one of 16 cases MSC transplantation resulted in short clinical improvement. Thus, MSC transplantation as a part of antitubercular therapy can be perspective in enhancing treatment of patients with drug-resistant tuberculosis.

Key words: mesenchymal stem cells, systemic transplantation, pulmonary tuberculosis, multidrug resistance.

*Адрес для корреспонденции:

249036, Обнинск, ул. Королева, 4

Тел.: (48439)9–32–90; факс: (495)956–14–40;

эл. почта: konopl@mrrc.obninsk.ru и konopl@obninsk.ru

Введение

Системное (внутривенное) введение мезенхимальных стволовых клеток (МСК) в организм в настоящее время рассматривается как один из перспективных методов активизации репаративных процессов в поврежденных органах и тканях [1, 2]. Для легких оседание МСК в тканях документировано в ряде исследований [3, 4], однако проявления биологического эффекта клеточной терапии поврежденных легких с использованием МСК неоднозначны, а возможный терапевтический эффект практически не изучен [5–7]. Необходимость использования дополнительного воздействия на способность поврежденной легочной ткани к репарации в некоторых ситуациях весьма остра. К ним, несомненно, относятся ситуации лечения больных с резистентными формами туберкулеза. Мы уже сообщали о нашем первом опыте такой терапии [8], а в данной работе предпринята попытка обобщить некоторые из полученных результатов работы, которая ведется силами двух наших научных учреждений в течение последних 3 лет.

Материал и методы

Под наблюдением в нашем исследовании, начатом три года назад, находятся 27 больных с туберкулезом легких, из которых 15 пациентов относятся к категории MDR (multidrug resistance), а 12 пациентов – к категории X-DR (X-drug resistance). Лечение подобных больных представляет сложную терапевтическую задачу, обусловленную устойчивостью возбудителя заболевания к большинству противотуберкулезных препаратов, в т. ч. – к наиболее активным. По сути дела, MDR и, особенно, X-DR туберкулез сродни туберкулезу доантибактериальной эпохи, против которого нет эффективных средств этиотропной терапии.

Информация о поле, возрасте пациентов и продолжительности заболевания представлена в табл. 1. Распространенность патологического процесса в легких представлена в табл. 2.

Все пациенты после выявления заболевания подвергались специфическому лечению стандартными режимами химиотерапии, а после выявления лекарственной устойчивости возбудителя использовали схемы на основе резервных химиопрепаратов в соответствии с данными тестов на

чувствительности микобактерий туберкулеза (МБТ). Длительная комбинированная противотуберкулезная терапия у данной группы пациентов не оказала желаемого эффекта, больные перешли в категорию хронических с постоянным выделением мультирезистентных форм микобактерий и прогрессирующими воспалительно-деструктивными изменениями в легочной ткани. При этом, у 17 (63,0%) больных наблюдались фиброзные полости распада, которые, как правило, не поддаются терапевтическому лечению даже в случае сохранения чувствительности МБТ к химиопрепаратам.

В этой ситуации возникла необходимость дополнения проводимого лечения процедурой системной трансплантации аутогенных МСК, проводимой в рамках разработанного клинического протокола, утвержденного Учеными Советами двух учреждений и одобренного Этическим Комитетом ЦНИИТ РАМН, а также на основе информированного согласия каждого пациента. Исследование проводилось в рамках отраслевой программы «Новые клеточные технологии – медицине», утвержденной Президиумом РАМН 29 мая 2002 г.

Метод получения и размножения аутогенных МСК в необходимом для системной трансплантации количестве (порядка 150–200 млн клеток) в настоящее время разрешен Федеральной службой по надзору в сфере здравоохранения и социального развития МЗиСР РФ (лицензия ФС–2006/206). Описание этого метода уже представлено в публикации [3] и кратко сводится к следующему.

Клетки костного мозга (0,5–1 мл) получали путем пункции грудины или подвздошной кости пациента под местной анестезией в строго стерильных условиях, которые соблюдали в процессе всей дальнейшей работы с клетками в культуральном боксе. После отстаивания эритроцитов в течение 1–2 часов при комнатной температуре супернатант из суспензии костномозговых клеток отсасывали пастеровской пипеткой, выделенные клетки переносили в среду 199 (здесь и далее указанные среды и посуда закупались в фирмах, уполномоченных на поставку МЗиСР РФ). Полученную суспензию клеток центрифугировали при 1000 об/мин в течение 10 мин для получения осадка, который ресуспендировали в ростовой среде. В качестве ростовой среды

Таблица 1. Сведения о распределении пациентов по полу, возрасту и продолжительности выявленного заболевания туберкулезом легких

Число больных	Пол		Возраст				Длительность заболевания после его выявления			
	муж.	жен.	17–29 лет	30–39 лет	40–49 лет	50–59 лет	6–12 мес.	13–24 мес.	2–3 года	3–5 лет
Абс. 27	17	10	17	5	4	1	10	4	11	2
% 100	63,0	37,0	63,0	18,5	14,8	3,7	37,0	14,8	40,7	7,4

Таблица 2. Распространенность туберкулезного процесса в легочной ткани у хронических больных мультирезистентным туберкулезом

Число больных	Распространенность туберкулезного процесса		
	1–2 сегмента	1–2 доли	3 и более долей
Абс. 27	3	11	13
% 100	11,1	40,7	48,2

использовали среду RPMI-1640, содержащую пенициллин (100 ЕД/мл), амфотерицин (100 нг/мл), L-глутамин (2 мМ) и 20% эмбриональной бычьей сыворотки. Культивирование проводили в пластиковых флаконах Карреля с площадью дна 25 см², в которые вносили 5×10^6 – 10^7 клеток костного мозга в 8 мл ростовой среды. Флаконы продували газовой смесью, содержащей 5% углекислого газа и 95% воздуха, и помещали в термостат на 37°C. Продувание флаконов такой газовой смесью проводили каждый раз, когда меняли среду или пересеивали клетки в новые культуральные флаконы. При достижении сливного (конфлюэнтного) монослоя клетки пересеивали с использованием 0,25% раствора трипсина в новые флаконы, вначале с той же площадью дна (25 см²), а впоследствии – при нарастании клеточной массы – с площадью дна 175 см². Такой метод культивирования позволял к концу 5–6-й недели добиться получения популяции аутогенных МСК пациента в количестве $(1,5\text{--}2) \times 10^5$ клеток, необходимой для трансплантации в организм донора исходного костного мозга. Дополнительно проведенными исследованиями было показано, что полученные в условиях примененного в нашей работе способа культивирования клетки человека во всех исследованных случаях имели фенотип CD10^{low}/CD34⁺/CD45⁺/CD105⁺-kit⁺, что характерно для клеток, относимых в настоящее время к МСК. Как мы уже сообщали ранее [3], в выполненных на лабораторных животных опытах была показана безопасность применения полученных таким способом культур МСК в отношении мутагенного, тератогенного и канцерогенного эффектов.

Перед внутривенным введением пациентам клеток из полученных выращиванием в культуре популяций делался посев для контроля возможного бактериального загрязнения (его не было выявлено ни в одном случае). Для осуществления системной трансплантации 150–200 млн аутогенных МСК, размноженных в культуре, клетки взвешивались в 200 мл стерильного физиологического раствора, содержащего гепарин в концентрации 10 ед/мл, и путем постановки капельницы вводились пациенту в течение 40–60 минут. Примерно у 20% пациентов трансплантация МСК приводила к развитию слабой трансфузионной реакции (повышение в первые сутки температуры до 37,2–37,4°C, ломота, разбитость), которая не требовала дополнительного пособия и исчезала на следующие сутки.

После системной трансплантации аутогенных МСК пациенты продолжали получать ранее назначенное медикаментозное лечение. Контроль за результатами лечения вели по динамике клинических проявлений заболевания, бактериовыделения и специфических изменений в легких по данным рентгено-томографического и КТ исследований.

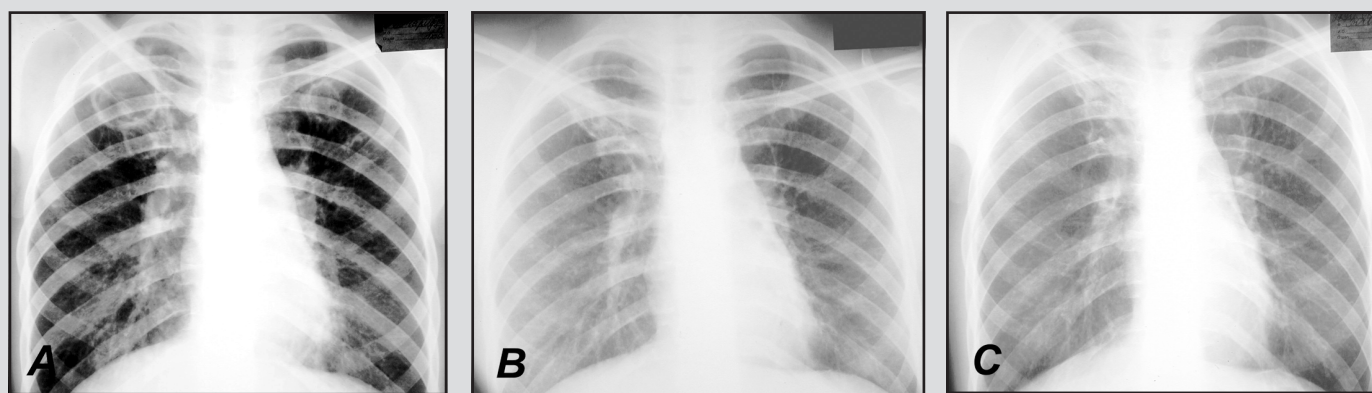
Результаты и их обсуждение

После системной трансплантации МСК из 27 пациентов 16 наблюдаются в течение 1,5–2 лет и более, а остальные 11 пациентов – не менее 6 месяцев. Спустя от 1 до 5 месяцев после введения МСК у всех 27 больных наблюдался положительный клинический эффект: улучшение общего состояния, уменьшение одышки, значительное уменьшение или исчезновение слабости и недомогания, 24 пациента значительно прибавили в весе и отмечали «прилив сил и энергии».

У всех больных на момент введения МСК отмечались воспалительные изменения в клиническом анализе крови: лейкоцитоз с увеличением палочкоядерной фракции, моноцитоз и/или лимфопения, ускорение СОЭ до 27–65 мм/ч. Через 1–2 месяца после трансплантации стволовых клеток показатели периферической крови улучшались: нормализовалось количество лейкоцитов, моноцитов и лимфоцитов, СОЭ снижалась до нормальных и субнормальных цифр (2–19 мм/ч).

Одним из наиболее важных критериев активности специфического процесса является бактериовыделение. У 20 (74,1%) больных, длительное время выделявших микобактерии туберкулеза, через 3–4 месяца после трансплантации аутогенных МСК отмечено стойкое прекращение бактериовыделения, подтвержденное микробиологическими и молекулярно-генетическими методами.

Наиболее полную информацию о течении, характере и распространенности туберкулеза дают рентгено-томографические методы исследования. Так, у 11 (40,7%) больных в дальнейшем наступило заживление длительно существующих каверн в легочной ткани, в т. ч. числе фиброзных – в 7 наблюдениях. У 15 пациентов отмечалось выраженное рассасывание воспалительных изменений, частичное закрытие полостей распада и/или уменьшение их размеров при множественных деструкциях. В качестве примера заживления существующих более 2-х лет каверн в обоих легких приводятся рентгенограммы больной Б. до введения МСК и спустя 6 и 17 месяцев после него (рис.).



Рентгенограммы легких у пациентки Б. до проведения системной трансплантации аутогенных МСК (А), а также через 6 (В) и 17 (С) месяцев после трансплантации:

А – в верхних долях обоих легких определяются сформированные каверны с неравномерно широкими стенками, перикавитарной инфильтрацией и очагами отсева по всем полям легких;

В – слева на месте каверны – фиброзная трансформация легочной ткани, справа каверны значительно уменьшились в размерах, отмечается рассасывание перикавитарной инфильтрации и очагов отсева;

С – заживление каверн в обоих легких с развитием рубцовой ткани

В настоящий период у 9 (56,3%) из 16 пациентов, которым трансплантировали МСК 1,5–2 года назад, можно констатировать стойкую ремиссию туберкулезного процесса с рассасыванием воспалительных и исчезновением деструктивных изменений в легких, у 6 (37,5%) – существенную положительную бактериологическую и морфологическую динамику. Лишь в одном случае из 16 эффект трансплантации МСК ограничился непродолжительным клиническим улучшением. Остальные 11 больных продолжают начатое ранее лечение, об эффективности которого можно будет судить спустя 12–15 месяцев.

Заключение

Таким образом, полученный в данном пилотном исследовании материал позволяет надеяться на то, что использование системной трансплантации аутогенных МСК открывает новые перспективы при лечении пациентов с резистентными формами легочного туберкулеза. Природа наблюдаемых эффектов пока остается недостаточно понятной, можно только констатировать усиление регенеративных процессов

в поврежденных участках легких. Вызваны ли они длительным существованием в тканях трансплантированных МСК с их необычными иммунологическими свойствами (способностью ослаблять продукцию активных форм кислорода клетками, принимающими участие в развитии воспалительных процессов [9]) или эффекты опосредуются в основном через паракринные механизмы [10], или еще какими-то другими возможными механизмами, например, нормализацией кроветворения с уменьшением доли клеток-продуцентов фактора некроза опухолей, что существенно для развития патологических процессов в поврежденных тканях легкого при туберкулезе, можно будет выяснить только на основе продолжения экспериментально-клинических работ в данном направлении. Одновременно можно отметить, что полученные результаты указывают на перспективность использования аутогенных МСК при лечении резистентных форм легочного туберкулеза не только путем проведения клеточной терапии, но и генной терапии, основанной на использовании МСК для доставки ряда генов в поврежденные ткани легкого (например, гена γ -интерферона).

ЛИТЕРАТУРА

1. Battler A., Leor J. Stem cell and gene-based therapy. Frontiers in regenerative medicine. L., Springer-Verlag, 2006.
2. Gnechi M., He H., Nicolas Noiseux N. et al. Evidence supporting paracrine hypothesis for Akt-modified mesenchymal stem cell-mediated cardiac protection and functional improvement. The FASEB J. 2006; 20: 661–9.
3. Цыб А.Ф., Конопляников А.Г., Колесникова А.И., и др. Получение и использование в медицине клеточных культур из мезенхимальных стволовых клеток костного мозга человека. Вестник Российской Академии медицинских наук. 2004; 59(9): 71–6.
4. Bröcker V., Florian Länger F., Tariq G. et al. Fibroblasts of recipient origin contribute to bronchiolitis obliterans in human lung transplants. American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine. 2006; 173(11): 1276–82.
5. Weiss D.J., Berberich M.A., Borok Z. et al. Adult stem cells, lung biology,

and lung disease. NHLBI/Cystic Fibrosis Foundation Workshop. Proc Am. Thorac Soc. 2006; 3(3): 193–207.

6. Kotton D. N., Fabian A. J., Mulligan R. C. Failure of bone marrow to reconstitute lung epithelium. Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 2005; 33(4): 328–34.

7. MacPherson H., Keir P., S. Webb S. et al. Bone marrow-derived SP cells can contribute to the respiratory tract of mice in vivo. J. Cell Sci. 2005; 118(Pt 11): 2441–50.

8. Ерохин В.В., Цыб А.Ф., Чуканов В.И. и др. Клеточные технологии в терапии хронического мультирезистентного туберкулеза легких. Проблемы туберкулеза и болезней легких. 2006; (8): 3–5.

9. Ryan J.M., Barry F.P., Murphy J.M., Mahon B.P. Mesenchymal stem cells avoid allogeneic rejection. J. Inflammation, 2005; 2(8): 1–11.

10. Thum T., Bauersachs J., Barry F.P. et al. The dying stem cell hypothesis. J. Amer. Coll. of Cardiology. 2005; 46(10): 1799–802.