

**Первый опыт  
использования  
аутологичных  
мультипотентных  
мезенхимальных клеток в  
комплексном лечении  
пациентов с хронической  
обструктивной болезнью  
легких в Республике  
Беларусь**

**Лицкевич Л.В., Гуревич Г.Л., Скрыгин А.Е., Исайкина Я.И.,  
Шпаковская Н.С., Солодовникова В.В.**

# Состояние проблемы

- **Fridenstein A.J., Deriglasova U.F., Kulagina N.N. et al.** Precursors for fibroblasts in different populations of hemopoietic cells as detected by the in colony assay method. **Exp Hematol 1974;2(2):83-92**
- **Caplan A.I.** The mesengenic process. **Clin. Plast Surg 1994;21:429-35.**
- **Lasarus H.M., et al.** Ex vivo expansion of human bone marrow-derived MSC remain host-derived despite successful hemato-poetic engraftment after allogeneic transplantatyon in patients with lysosomal and peroxisomal storage diseases. **Exp. Hematol 1999;27:1675-81**
- **Владимирская Е.Б.,** Мезенхимальные стволовые клетки (МСК) в клеточной терапии. **Онкогематология.-№1.-2007.-с.4-16**
- **Ribeiro-Paes JT1, Bilaqui A, et al./** Unicentric study of cell therapy in chronic obstructive pulmonary disease/pulmonary emphysema// **Int J Chron Obstruct Pulmon Dis. 2011**
- Autologous mesenchymal stromal cell infusion as adjunct treatment in patients with multidrug and extensively drug-resistant tuberculosis: an open-label phase 1 safety trial / **Skrahin A., Ahmed R.K., Ferrara G., Rane L., Poiret T., Isaikina Y., Skrahina A., Zumla A., Maeurer M.J. // Lancet Respir Med. 2014 Feb;2(2):108-22. doi: 10.1016/S2213-2600(13)70234-0. Epub 2014 Jan .**
- **Liu X., Fang Q., Kim H./**Preclinical Studies of Mesenchymal Stem Cell (MSC) Administration in Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD): A Systematic Review and Meta-Analysis// **PLoS One. 2016**
- **Broekman W., Hiemstra PS et al./**Mesenchymal stromal cells: a novel therapy for the treatment of chronic obstructive pulmonary disease?// **Thorax. 2018**

# Место исследований автора

- **«Разработать метод иммунотерапии пациентов с ХОБЛ и ИФА с использованием аутологичных ММСК»** (в рамках задания ГНТП «Новые техно-логии диагностики, лечения и профилактики, подпрограмма «Трансплантология и регенеративная медицина»), срок выполнения 2014-2016 гг.
- **«Разработать и внедрить методы комплексного лечения пациентов с лекарственно-устойчивым туберкулезом, ХОБЛ с использованием повторного введения ММСК»** (в рамках ГП «Здоровье народа и Демографическая безопасность Республики Беларусь», подпрограмма «Туберкулез» , срок выполнения 2017-2018 гг.

## **Цель исследования:**

- **улучшение результатов лечения и качества жизни пациентов с ХОБЛ с использованием двукратного введения БКП (аутологичных ММСК) в комплексной терапии заболевания.**

# Материалы и методы исследования

- В контролируемое проспективное рандомизированное исследование на базе пульмонологического отделения ГУ «РНПЦ пульмонологии и фтизиатрии» включено 31 человек с ХОБЛ.
- В основную группу отобраны 12 пациентов с ХОБЛ, в т.ч. 6 муж. (50,0%) и 6 жен. (50,0%), средний возраст  $56,3 \pm 1,6$  лет, которым на фоне поддерживающего лечения основного заболевания было проведено повторное введение аутологичных ММСК согласно инструкции по применению метода (рег. №159-1118 от 14.12.2018 г.).
- Контрольная группа – 19 пациентов с ХОБЛ, которым проводилось поддерживающее лечение основного заболевания согласно клиническим протоколам диагностики и лечения, из них 10 мужчин (52,6%), 9 женщин (47,4%), средний возраст –  $63,6 \pm 0,9$  лет.
- Среднетяжелое течение ХОБЛ было выявлено у 68,4% пациентов, тяжелое течение у 31,6%, длительность госпитализации пациентов КГ составила  $22,3 \pm 0,85$  дня, что было достоверно длительнее, чем в основной группе ( $p < 0,001$ ). Средний индекс курения –  $7,8 \pm 3,4$  пачки/лет. Все пациенты предъявляли жалобы на усиление одышки, кашель с увеличением объема мокроты, периодически затрудненное дыхание (100%).
- Проведен мониторинг клинико-рентгенологического и лабораторного обследования пациентов с ХОБЛ (через 1,5 месяца, 3, 5, 5, 10, 12 и более после повторного введения ММСК). Обследование пациентов включало рентгенологическое, лабораторное (общий и биохимический анализ крови, иммунологический с характеристикой иммунофенотипа клеток крови и уровня ключевых цитокинов, посев мокроты на вторичную флору) и инструментальных методов исследования (спирография, бодиплетизмография, газометрия артериальной крови, КТВР, ЭХО-кардиография).

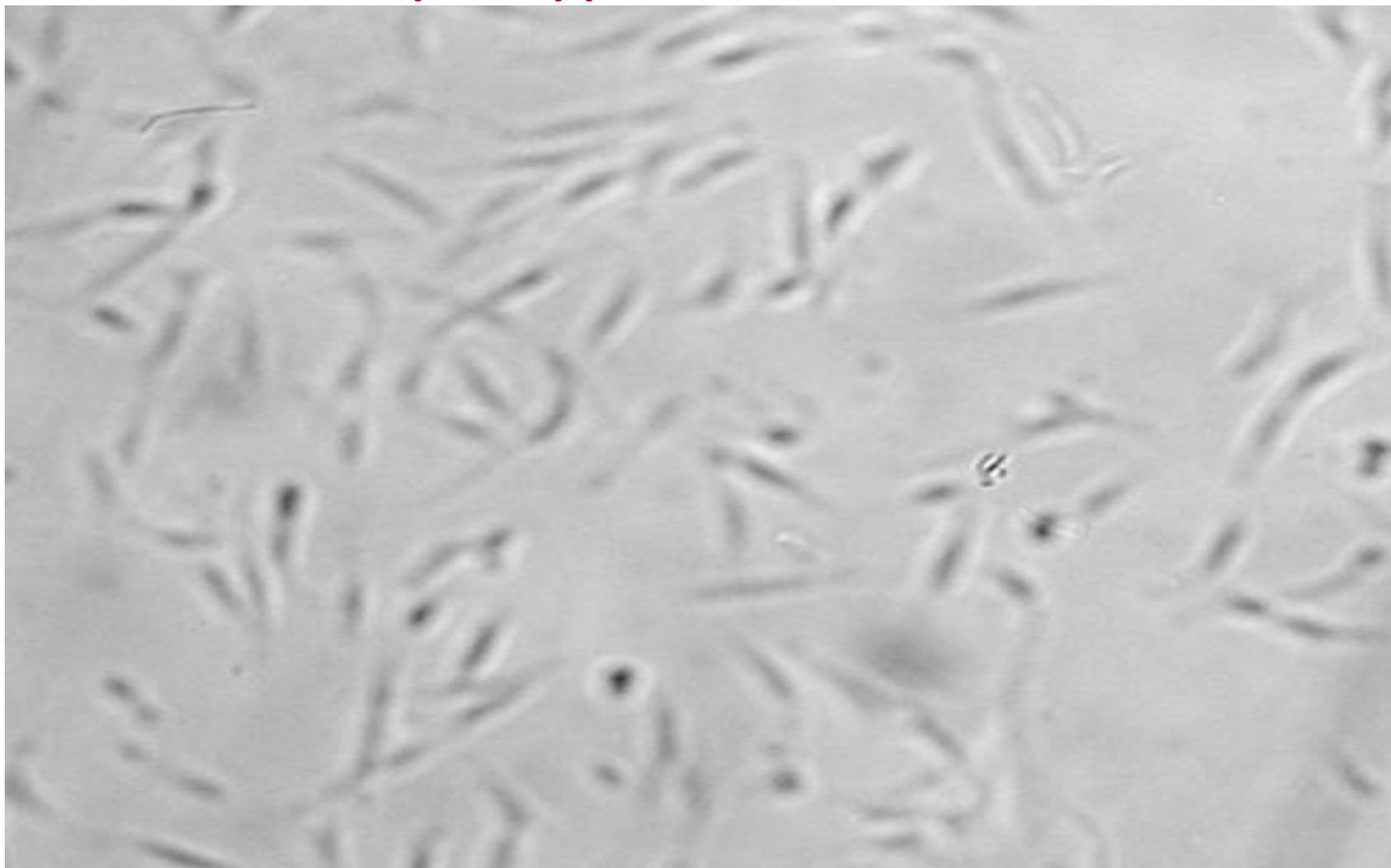
# Алгоритм лечения ХОБЛ с применением повторного введения мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток

## Хроническая обструктивная болезнь легких (ХОБЛ)

|   |  |  |   |  |
|---|--|--|---|--|
| <b>1.</b> Забор костного мозга для процессинга и культивации ММСК | <b>2.</b> Процессирование костного мозга, включающее: выделение моноклеаров костного мозга, культивирование ММСК до 30-40 дней, морфологический и иммунофенотипический анализ культур клеток, определение жизнеспособности и стерильности клеток). | <b>3.</b> После наращивания ММСК <i>in vitro</i> до оптимальной клеточной дозы $0,5-1,8 \times 10^6$ ММСК/кг массы тела пациента), клетки снятые с поверхности культурального слоя отмывают и переносят в шприц в объеме 20 мл в физиологическом растворе, для дальнейшей инфузии. | <b>4.</b> Аутологичную трансплантацию ММСК пациенту проводят в условиях отделения интенсивной терапии и реанимации. Полученную из лаборатории суспензию ММСК предварительно встряхивают несколько раз (для предотвращения клеточных клампов) и вводят внутривенно медленно в течение 3-х минут. | <b>5.</b> Наблюдение за пациентом в условиях ОИТиР продолжают не менее 2-х часов, после пациента переводят в отделение |
|---|--|--|---|--|

**После проведения первичной аутологичной трансплантации ММСК повторяют процедуру забора костного мозга и п.2-5**

Рис. 1 – ММСК на 7 день экспансии в основной культуре



# Забор костного мозга у пациентов с ХОБЛ



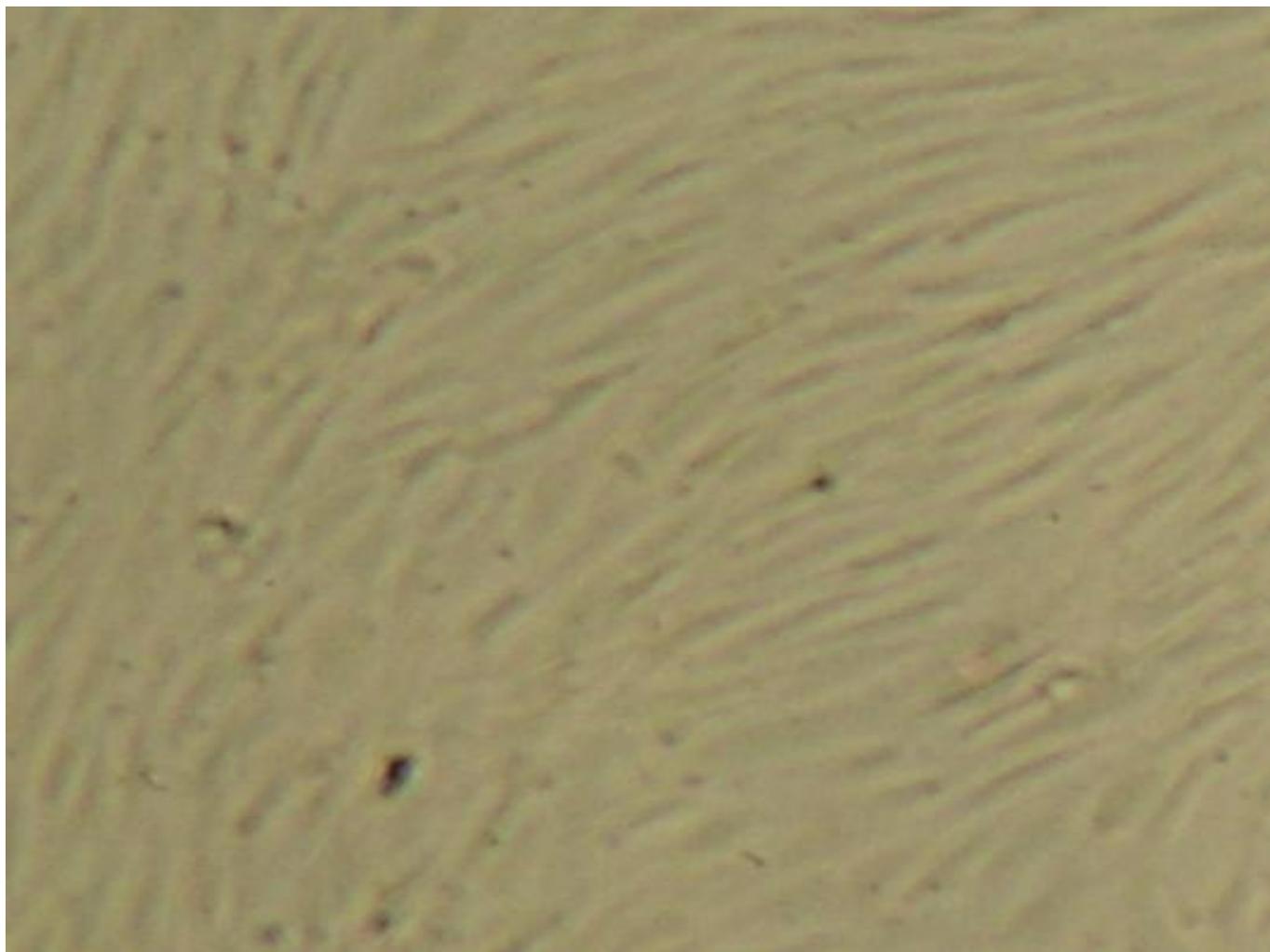
# Транспортировка костного мозга в вакутайнерах



# Процессинг МСК



Рис.4 – Монослойная культура  
ММСК 3-его пассажа



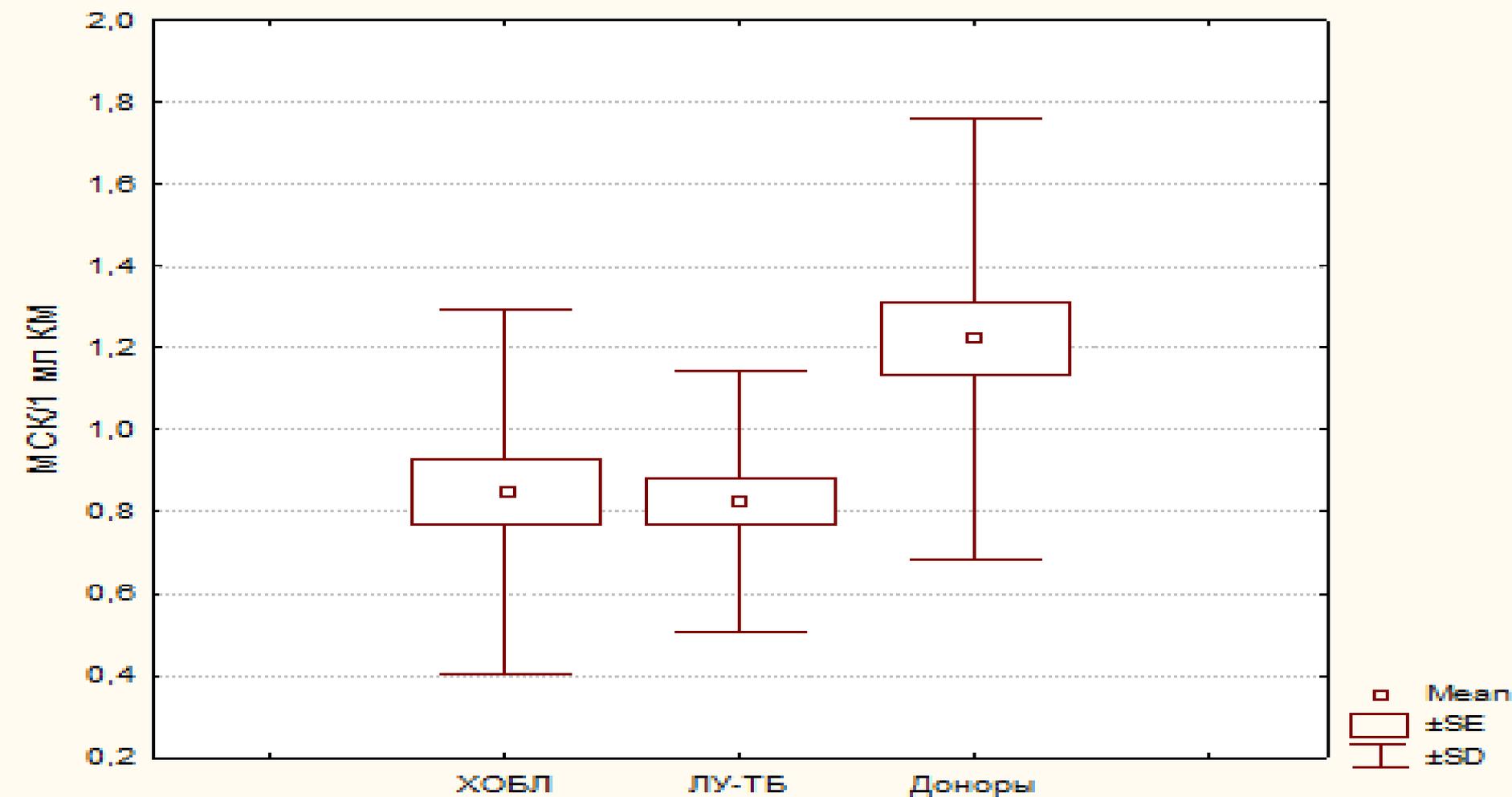
# Внутривенное введение клеточной суспензии пациенту



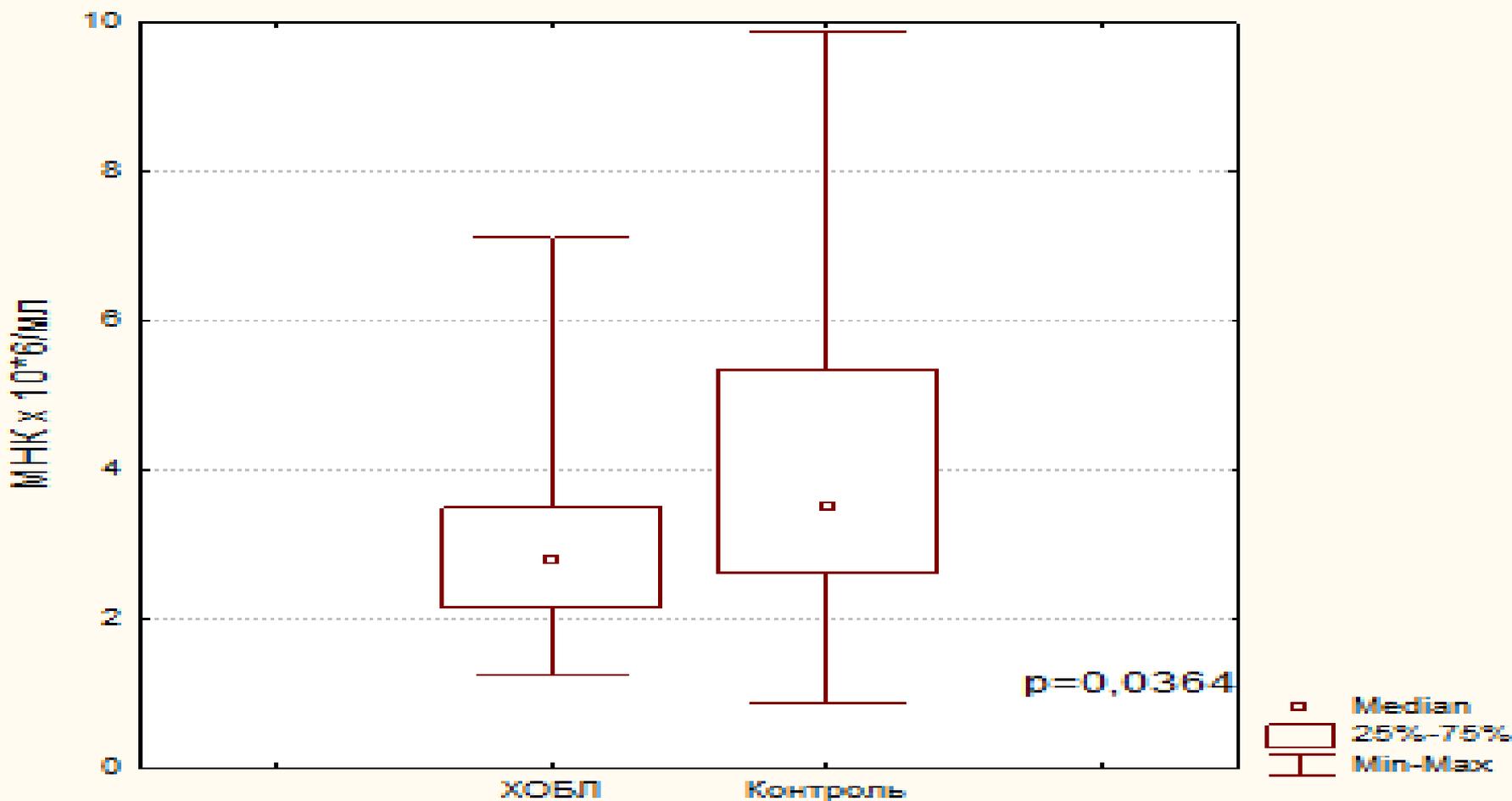
# Результаты:

- Получено 24 биологических клеточных продукта (БКП) ММСК, содержащих  $64,5 (2 - 118) \times 10^6$  клеток из 85 (70 – 100) мл костного мозга пациентов с ХОБЛ методом экспансии *in vitro* в течение  $34 \pm 3$  суток.
- Медиана введенной дозы ММСК для 12 пациентов составляла  $0,9 (0,2 - 1,63) \times 10^6$  клеток.
- Иммунофенотипический анализ подтвердил, что все аутологичные БКП ММСК пациентов с ХОБЛ содержат более 97% жизнеспособных клеток, экспрессирующих маркеры ММСК: CD90 -  $96,52 \pm 0,49\%$ , CD73 –  $96,76 \pm 0,51\%$ , CD105 -  $95,39 \pm 0,7$ .
- При этом содержание гемопоэтических клеток в БКП минимально -  $1,47 \pm 0,27\%$ .

Рис. 1 – Количество МСК , получаемое из 1 мл костного мозга пациентов с ХОБЛ, ЛУ-ТБ и здоровых доноров



# Рис. 6 – Содержание мононуклеарных клеток в 1 мл костного мозга пациентов с ХОБЛ и здоровых доноров



# РЕЗУЛЬТАТЫ

- У пациентов с ХОБЛ после повторного введения аутологичных ММСК в комплексном лечении отмечалось значимое снижение одышки на 37%, объективизированной показателем выраженности одышки в опроснике MRC с  $3,58 \pm 0,3$  до  $2,25 \pm 0,3$  баллов ( $p < 0,001$ );
- снижение степени выраженности динамической гиперинфляции (показателя RV – остаточного объема легких на 6,2% с  $218,2 \pm 1,9$  до  $204,7 \pm 1,7$  ( $p < 0,001$ )).

# РЕЗУЛЬТАТЫ

- Наблюдалось достоверное увеличение дистанции ходьбы пациентов с ХОБЛ на 9,4% после повторного введения БКП (ММСК) в 6-минутном шаговом тесте с  $391,5 \pm 0,9$  м до  $428,3 \pm 1,04$  м ( $p < 0,001$ )
- Значимое улучшение гемодинамических параметров сердечно-сосудистой системы, а именно нормализация САД на 14,8% с  $150,0 \pm 2,1$  до  $127,8 \pm 2,5$  ( $p < 0,001$ ); ДАД на 13,2% с  $95,0 \pm 1,0$  до  $82,5 \pm 1,4$  ( $p < 0,001$ ).
- Отмечались: увеличение общего количества Т-лимфоцитов как в процентном отношении, так и абсолютном содержании ( $p > 0,05$ ), выраженная тенденция к увеличению на 13,4% Т-хелперов (CD4+) с  $37,8 \pm 2,87\%$  до  $42,86 \pm 3,41$ ; увеличение иммунорегуляторного индекса на 28% ( $p > 0,05$ ).

# РЕЗУЛЬТАТЫ

- Выявленные корреляционные взаимосвязи между показателями ОФВ1 и МЕТ ( $r=0,887$ ,  $p<0,05$ ); ОФВ1 и дистанцией в тесте с 6-минутной ходьбой ( $r=0,783$ ,  $p<0,05$ ); ОФВ1 и одышкой ( $r=-0,656$ ,  $p<0,05$ ) свидетельствуют об улучшении параметров газообмена, сопровождающемся уменьшением одышки, что ведет к значительному улучшению гемодинамических параметров сердечно-сосудистой системы и повышению толерантности к физической нагрузке.
- Установлено улучшение интегральных показателей качества жизни (психического и физического здоровья) по опроснику SF-36 на 25%; снижение активности воспалительного процесса: тенденция к нормализации (нормализация) лабораторных и клинических показателей (общегематологических (снижение СОЭ, палочкоядерных нейтрофильных лейкоцитов).

# РЕЗУЛЬТАТЫ

- Опыт двукратного применения аутологичных ММСК в комплексном лечении пациентов с ХОБЛ в Республике Беларусь свидетельствует об отсутствии побочных реакций и осложнений на введение ММСК, что подтверждает безопасность метода.
- Положительный эффект характеризуется: снижением степени выраженности инвалидизирующих нарушений (дыхательной недостаточности, уменьшением степени выраженности одышки по данным MRC шкалы в среднем на 37%), снижением степени выраженности остаточного объема легких на 6,2% ( $p < 0,001$ ), что свидетельствует об улучшении проходимости дыхательных путей, об уменьшении воспалительного компонента бронхиальной обструкции, улучшении качества жизни пациентов на 25%, способствует уменьшению числа на 80,0% и тяжести обострений ХОБЛ.

# Эффективность лечения ХОБЛ с использованием ММСК

Первый в Республике Беларусь опыт применения аутологичных ММСК в комплексном лечении пациентов с ХОБЛ свидетельствует об отсутствии побочных реакций и осложнений на введение ММСК, что подтверждает его безопасность.

Положительный эффект лечения пациентов с ХОБЛ с помощью ММСК характеризуется:

1. уменьшением степени выраженности одышки;
2. уменьшением обструктивных нарушений механики дыхания от резких до умеренных;
3. повышением дистанции в тесте с 6-минутной ходьбой более 60% ( $p < 0,001$ );
4. улучшением качества жизни более значимым, чем в контрольной группе;
5. улучшением иммунологических параметров (увеличением СДЗ+38+ на 19,4%), что является признаком ранней активации Т-лимфоцитов
6. уменьшению количества обострений воспалительного процесса в среднем на 80,0% в течение года.

# Внедрение

1. Л.В. Лицкевич, Г.Л. Гуревич, Е.М. Скрягина, А.Е. Скрягин, Н.С. Шпаковская, М.А. Новикова /Метод иммунотерапии пациентов с хронической обструктивной болезнью легких и идиопатическим фиброзирующим альвеолитом с использованием аутологичных мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (ММСК) //Достижения медицинской науки. 2015. вып. XX. Минск. 2016. 15 С.
2. Л. В. Лицкевич, Г.Л. Гуревич, Е.М.Скрягина, А.Е. Скрягин, Н.С. Шпаковская, Д.Г Коваленко, Я.И.Исайкина, М.А. Новикова /Иммунотерапия пациентов с хронической обструктивной болезнью легких и идиопатическим фиброзирующим альвеолитом с использованием аутологичных мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток //Материалы IX Конгресса Евро-Азиатского респираторного общества и VII Конгресса пульмонологов Центральной Азии. Ташкент. 25-26 мая 2016. С.265-266.
3. Лицкевич Л. В., Гуревич Г. Л., Шпаковская, Н.С., Скрягин А. Г.,Скрягина Е. М., Солодовникова В. В., Исайкина Я.И., Новикова М. А., Коваленко Д.Г. /Отдаленные результаты лечения пациентов с хронической обструктивной болезнью легких и идеопатическим фиброзирующим альвеолитом с использованием аутологичных мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток //Материалы научно-практической конференции ГУ «РНПЦ трансфузиологии и медицинских биотехнологий. Минск.2016 г., 10С.
4. Аутологичные мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки в комплексном лечении пациентов с хронической обструктивной болезнью легких/Лицкевич Л. В., Смычек В.Б., Гуревич Г. Л., Шпаковская, Н.С., Скрягин А. Г.,Скрягина Е. М., Исайкина Я.И. / Инновационные технологии в медицине. Минск, 2017. –Том 5.-№3.-С.134-139.
5. Эффективность применения мультипотентных мезенхимальных стволовых клеток в комплексном лечении пациентов с хронической обструктивной болезнью легких/Лицкевич Л. В., Гуревич Г. Л., Шпаковская, Н.С., Скрягин А. Г.,Скрягина Е. М., В.В. Солодовникова, Исайкина Я.И., М.А.Новикова, Д.Г.Коваленко// Рецепт.-2017.- №3.-12 С.
6. Кардио-респираторные нарушения при бронхообструктивных заболеваниях / Лицкевич, Л. В.; Скрягина, Е. М.; Ольшевская, М. В.; Шпаковская, Н. С.; Рогова, З. И.; Атаманова, О. Г.; Скрягин, А. Е. // Лечебное дело. - 2018. - № 5. - С. 47-52.
7. Способ комбинированной терапии хронической обструктивной болезни легких с использованием аутологичных мезенхимальных мультипотентных стромальных клеток / Лицкевич Л.В., Скрягина Е.М., Скрягин А.Е., Шпаковская Н.С., Исайкина Я.И. // Сборник научных трудов первого съезда фтизиатров и пульмонологов Республики Беларусь «Современные направления развития респираторной медицины и фтизиатрии», г.Минск, 17-18 мая 2018г., С.276-

# Внедрение

- 1. «Метод клеточной терапии хронической обструктивной болезни легких и идеопатического фиброзирующего альвеолита с использованием аутологичных мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток» (рег.№204-1215от 29.11.2015г.). Получено 2 акта о внедрении.
- 2. «Метод комплексного лечения пациентов с ХОБЛ с использованием двухкратного введения аутологичных мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток», рег. №159-1118от14.12.2018г. Получено 3 акта о внедрении.
- 3. Получен патент на изобретение №21852 по заявке №а20150567/Способ комбинированной терапии хронической обструктивной болезни легких// Лицкевич Л.В., Гуревич Г.Л., Скрягин А.Е., Шпаковская Н.С., Скрягина Е.М., Новикова М.А., Исайкина Я.И. от 29.01.2018.
- Litskevich L., Skrahin A., Shpacovskaya N., Solodovnicova V., Isaikina J. / Effectiveness of mesenchimal stem cells in the treatment of patients with chronical obstructive pulmonary disease in Belarus // ERC, Mijan.– 2017. –№1283.

**СПАСИБО ЗА ВНИМАНИЕ!**

