

Применение мультипотентных мезенхимных стромальных клеток для лечения острой реакции «трансплантат против хозяина»

Л.А. Кузьмина, Н.А. Петинати, В.А. Васильева, М.В. Довыденко, М.Ю. Дроков, Ю.О. Давыдова, Н.М. Капранов, Н.В. Сац, Ю.А. Чабаяева, С.М. Куликов, Т.В. Гапонова, Н.И. Дризе, Е.Н. Паровичникова, В.Г. Савченко

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Минздрава России, Москва, Россия

Резюме

Цель. Определение эффективности введения мезенхимных стромальных клеток (МСК) в качестве терапии 2–3-й линий при острой реакции «трансплантат против хозяина» (oРТПХ), резистентной к терапии глюкокортикостероидами.

Материалы и методы. В исследование включены 35 больных, которым с целью терапии oРТПХ, резистентной к лечению, введены МСК, полученные из костного мозга здоровых доноров. Проанализированы клинические показатели пациентов, культуральные характеристики МСК, профиль экспрессии различных генов, в том числе участвующих в иммуномодуляции, экспрессия поверхностных маркеров, источник МСК, частота и количество введений МСК.

Результаты. Ответ на терапию достигнут в 74% случаев, полный ответ – у 13 (37%) пациентов, частичный ответ/клиническое улучшение также у 13 (37%). У 9 пациентов лечение оказалось неэффективным. Выявить группу пациентов, у которых можно прогнозировать хороший ответ на терапию с использованием МСК, не удалось. Обнаружены отличия в эффективных для лечения oРТПХ образцов МСК от неэффективных. В первых отмечены снижение суммарной клеточной продукции МСК, повышение экспрессии антигенов главного комплекса гистосовместимости и PDL-1.

Заключение. Эти данные позволяют выбирать необходимые образцы для лечения oРТПХ, что может улучшить клинические результаты. Терапия oРТПХ с помощью МСК показала сопоставимую эффективность по сравнению с другими подходами лечения. Учитывая низкий процент осложнений и отсутствие значимых негативных последствий, терапия МСК представляется одним из оптимальных подходов к лечению резистентных форм oРТПХ.

Ключевые слова: трансплантация аллогенных гемопоэтических стволовых клеток, реакция «трансплантат против хозяина», мультипотентные мезенхимные стромальные клетки.

Для цитирования: Кузьмина Л.А., Петинати Н.А., Васильева В.А. и др. Применение мультипотентных мезенхимных стромальных клеток для лечения острой реакции «трансплантат против хозяина». *Терапевтический архив.* 2020; 92 (7): 23–30. DOI: 10.26442/00403660.2020.07.000757

Multipotent mesenchymal stromal cells application for acute graft versus host disease treatment

L.A. Kuzmina, N.A. Petinati, V.A. Vasilieva, M.V. Dovydenko, M.Yu. Drovkov, Yu.O. Davydova, N.M. Kapranov, N.V. Sats, Yu.A. Chabaeva, S.M. Kulikov, T.V. Gaponova, N.I. Drize, E.N. Parovichnikova, V.G. Savchenko

National Research Center for Hematology, Moscow, Russia

Aim. Analysis of the effectiveness of the MSCs administration as the second- or third-line therapy of acute GVHD (aGVHD) resistant to glucocorticosteroid treatment.

Materials and methods. The study included 35 patients who received MSCs obtained from the bone marrow of healthy donors as a treatment of steroid-resistant aGVHD. The clinical parameters of patients, MSCs' cultural characteristics, the MSC expression profile for various genes including those involved in immunomodulation, expression of cells' surface markers, the source of MSCs, as well as the frequency and number of MSC administrations were analyzed.

Results. Response to therapy was achieved in 74% of cases, a complete response was reached in 13 (37%) patients, partial response/clinical improvement was demonstrated in 13 (37%). This treatment was ineffective in 9 patients. The prediction of a group of patients with good response to MSC therapy turned to be impossible. The differences between the effective and ineffective for the GVHD treatment MSCs samples were found. The effective ones were characterized with a decreased total MSCs production and an increase in the main histocompatibility complex and PDL-1 antigens expression.

Conclusion. These data allow to select optimal samples for aGVHD treatment that can improve clinical results. aGVHD treatment with MSCs has shown efficacy comparable to other treatment approaches. Given the low percentage of complications and the absence of significant adverse effects, MSC therapy seems to be one of the optimal approaches to the treatment of resistant forms of GVHD.

Keywords: allogeneic hematopoietic stem cell transplantation, graft versus host disease, multipotent mesenchymal stromal cells.

For citation: Kuzmina L.A., Petinati N.A., Vasilieva V.A., et al. Multipotent mesenchymal stromal cells application for acute graft versus host disease treatment. *Therapeutic Archive.* 2020; 92 (7): 23–30. DOI: 10.26442/00403660.2020.07.000757

Алло-ТГСК – трансплантация аллогенных гемопоэтических стволовых клеток
ИЛ – интерлейкин
кДНК – кодирующая дезоксирибонуклеиновая кислота
КМ – костный мозг
КОЕф – колониеобразующие единицы фибробластов
КУ – клиническое улучшение
мРНК – матричная рибонуклеиновая кислота
МСК – мезенхимные стромальные клетки

ОВ – общая выживаемость
oРТПХ – острая реакция «трансплантат против хозяина»
ПО – полный ответ
ПЦР – полимеразная цепная реакция
РТПХ – реакция «трансплантат против хозяина»
хРТПХ – хроническая реакция «трансплантат против хозяина»
ЧО – частичный ответ
IDO (indoleamine-2,3-dioxygenase) – индолеамин-2,3-диоксеназа

Введение

Несмотря на появление большого числа новых эффективных препаратов для лечения гемобластозов, трансплантация аллогенных гемопоэтических стволовых клеток (алло-ТГСК) остается единственным методом излечения для многих пациентов с онкогематологическими и другими заболеваниями. Однако алло-ТГСК связана с развитием тяжелых осложнений, одно из ведущих мест среди которых занимают острая (ОРТПХ) и хроническая реакция «трансплантат против хозяина» (хрТПХ) [1]. При развитии этого осложнения увеличивается летальность после трансплантации и может существенно снижаться качество жизни.

Реакция «трансплантат против хозяина» (РТПХ) – это системное заболевание, при котором лимфоциты донора распознают антигены реципиента как чужеродные. Это приводит к иммунному ответу с участием донорских активированных Т-клеток, которые атакуют клетки хозяина и могут вызвать тяжелые полиорганные повреждения [2]. В патогенезе хрТПХ наряду с Т-клетками существенную роль играют также В-клетки [3]. Для фармакологической профилактики РТПХ у большинства пациентов в настоящее время используют ингибиторы кальциневрина (циклоsporин А, такролимус), метотрексат [2], микофенолата мофетил [4, 5]. Несмотря на комбинированную профилактику, в 30–50% случаев после алло-ТГСК развивается ОРТПХ [6] и в 30–70% – хрТПХ. В качестве 1-й линии терапии ОРТПХ используют высокие дозы метилпреднизолон [7, 8], в большинстве случаев с ингибиторами кальциневрина.

Примерно у 1/2 пациентов отмечается положительный ответ на лечение глюкокортикостероидами [7]. В ряде случаев развивается рефрактерность к метилпреднизолону, которая определяется либо как отсутствие какого-то ответа или прогрессирование симптомов после 3–7 дней системной терапии, а также отсутствие полного ответа (ПО) через 14 дней лечения. При констатации резистентности к иммуносупрессивной терапии долгосрочный прогноз у пациентов крайне неблагоприятный, общая выживаемость (ОВ) в течение 1 года составляет менее 30%. Летальность обусловлена проявлениями РТПХ, а также последствиями агрессивной иммуносупрессивной терапии, такими как реактивация вирусных, возникновение жизнеугрожающих бактериальных и грибковых инфекций, развитием рецидива основного заболевания [9, 10]. Стандартного подхода к терапии 2-й линии не существует, так как не доказано преимущество какого-либо метода терапии перед другими. Используют: микофенолат мофетил, сиролимус, такролимус, эстрокорпоральный фотоферез, ингибиторы JAK, ингибиторы протеасом, моноклональные антитела, анти тимоцитарный глобулин и мультипотентные мезенхимные стромальные клетки (МСК) [11, 12].

В 2004 г. К. Le Blanc и соавт. [13] описали полный регресс проявлений тяжелой рефрактерной РТПХ кишечника и печени 4-й степени у 9-летнего мальчика после внутривенного введения МСК. С этого момента проведено немало исследований по изучению терапевтического подхода лечения РТПХ на основе МСК [14, 15].

Мультипотентные МСК – это прилипающие к пластику фибробластоподобные клетки, способные дифференцироваться в остеогенном, хондрогенном, миогенном и адипогенном направлениях [16, 17]. МСК не экспрессируют маркеры гемопоэтических клеток, но экспрессируют CD90, CD73, CD105 [18, 19]. В качестве источников мультипотентных МСК могут использоваться КМ, жировая ткань, плацента, пуповинная кровь, пульпа зуба [20]. В дополнение к их способности к дифференцировке в различные клеточные линии МСК обладают иммуносупрессивными свойствами [18, 19], секретируя большое число растворимых факторов, таких как индолеамин-2,3-диоксеназа (IDO), простагландин-2, интерлейкин (ИЛ)-10, трансформирующий фактор роста β , оксид азота, HLA-G5, белок-индуцибельный фактор-индуцируемый опухолевым геном 6 (TSG-6), МСК способны ингибировать активацию комплемента, подавлять пролиферацию Т- и В-лимфоцитов, NK-клеток, менять соотношение между различными субпопуляциями Т-клеток, индуцировать пролиферацию регуляторных Т-клеток. Вследствие этого МСК используют для лечения различных заболеваний: болезнь Крона, болезнь Альцгеймера, инфаркт миокарда, сахарный диабет 1-го типа [11, 21–23].

Мультипотентные МСК применяют в том числе для лечения пациентов с ОРТПХ и хрТПХ, резистентной к терапии глюкокортикостероидами. Продемонстрировано, что МСК улучшают ОВ пациентов, у которых достигнут ПО или частичный ответ (ЧО) [24, 25]. Несмотря на эти обнадеживающие результаты, по-прежнему существует необходимость в определении факторов, которые могут влиять на эффективность лечения при использовании МСК.

Сведения об авторах:

Петинати Наталья Арнольдовна – ст. науч. сотр. лаб. физиологии кроветворения. ORCID: 0000-0001-6591-3183

Васильева Вера Алексеевна – зав. отд-нием иммунохимиотерапии с дневным стационаром для больных после трансплантации костного мозга. ORCID: 0000-0003-0904-7385

Довыденко Мария Вячеславовна – врач-гематолог отд-ния интенсивной высокодозной химиотерапии и трансплантации костного мозга. ORCID: 0000-0002-6082-0110

Дроков Михаил Юрьевич – рук. сектора по изучению иммунных воздействий и осложнений после трансплантации костного мозга. ORCID: 0000-0001-9431-8316

Давыдова Юлия Олеговна – врач клинической лабораторной диагностики лаб. иммунофенотипирования клеток крови и костного мозга. ORCID: 0000-0001-5932-0285

Капранов Николай Михайлович – медицинский физик лаб. иммунофенотипирования клеток крови и костного мозга. ORCID: 0000-0002-6512-910X

Сац Наталья Владимировна – ст. науч. сотр. лаб. физиологии кроветворения. ORCID: 0000-0002-1559-9381

Чабаева Юлия Александровна – сотр. информационно-аналитического отд. ORCID: 0000-0001-8044-598X

Куликов Сергей Михайлович – зав. информационно-аналитическим отд. ORCID: 0000-0002-6288-7570

Гапонова Татьяна Владимировна – зам. ген. дир. по трансфузиологии, зав. отд. процессинга клеток крови и криоконсервирования. ORCID: 0000-0002-9684-5045

Дризе Нина Иосифовна – зав. лаб. физиологии кроветворения. ORCID: 0000-0002-7150-0403

Паровичникова Елена Николаевна – зав. отд. химиотерапии гемобластозов, депрессий кроветворения и трансплантации костного мозга. ORCID: 0000-0001-6177-3566

Савченко Валерий Григорьевич – акад. РАН, д.м.н., проф., ген. дир. ORCID: 0000-0001-8188-5557

Контактная информация:

Кузьмина Лариса Анатольевна – к.м.н., зав. отд-нием интенсивной высокодозной химиотерапии и трансплантации костного мозга с круглосуточным и дневным стационарами. Тел.: +7(916)148-71-31; e-mail: kuzlara@rambler.ru; ORCID: 0000-0001-6201-6276

Таблица 1. Характеристика пациентов в зависимости от ответа на лечение

		ПО (n=13)	ЧО/КУ (n=13)	Нет ответа (n=9)
Мужчины/женщины		3/10	6/7	7/2
Возраст, лет		Медиана 42 (19–60)	Медиана 37 (19–55)	Медиана 37 (19–55)
Диагнозы	Острый миелоидный лейкоз	11	5	2
	Острый лимфобластный лейкоз	2	4	2
	Миелодиспластический синдром		2	3
	Хронический миелолейкоз		2	1
	Грибовидный микоз			1
Донор гемопоэтических стволовых клеток	Родственный совместимый по антигенам гистосовместимости донор	7	6	4
	Неродственный совместимый по антигенам гистосовместимости донор	4	6	3
	Неродственный частично совместимый по антигенам гистосовместимости донор	2	1	2
Источник трансплантата	КМ	9	8	7
	Стволовые клетки периферической крови	4	5	2
Срок возникновения оРТПХ, дни		Медиана 62 (8–162)	Медиана 87 (15–150)	Медиана 58 (37–90)
Поздние формы оРТПХ (n=8)	Трансфузия лимфоцитов донора	3		
	Отмена иммуносупрессии		4	1
Поражение органов				
Кожа (n=3)		1	2	
Печень (n=1)				1
Кишечник (n=13)		5	4	4
Кожа и печень (n=2)		2		
Кожа и кишечник (n=10)		3	5	2
Печень и кишечник (n=2)			1	1
Кожа, печень и кишечник (n=4)		2	1	1
Степень поражения	2-я (n=13)	5	5	3
	3-я (n=16)	6	7	3
	4-я (n=6)	2	1	3
Линия терапии	2-я	10	10	7
	3-я	2	3	2
	4-я	1		
МСК	Донор собственный	7	8	6
	Сторонний донор	6	5	3
Срок 1 введения МСК от диагностики оРТПХ, дни		Медиана 16 (7–62)	Медиана 15 (8–61)	Медиана 12 (7–31)
Количество введений МСК	1	5	3	1
	2	8	6	5
	3	6	4	1
	4	1		1
	5	1		1
Использование следующих линий иммуносупрессивной терапии, n (%)		4 (31)	4 (31)	9 (100)

В этой работе мы представляем ретроспективный анализ лечения пациентов с оРТПХ, которая резистентна к терапии глюкокортикостероидами, с помощью МСК, выделенных из КМ доноров гемопоэтических клеток.

Материалы и методы

В исследование включены 35 пациентов (16 мужчин, 19 женщин), которым выполнена алло-ТГСК. У большин-

ства лиц алло-ТГСК произведена в качестве этапа программной терапии острого миелоидного лейкоза (18 пациентов) или острого лимфобластного лейкоза (8 больных). В других случаях показание к алло-ТГСК – миелодиспластический синдром – у 5 пациентов, хронический миелолейкоз – у 3, грибовидный микоз – у 1. Медиана возраста больных при проведении алло-ТГСК составила 38 лет (19–60 лет). В 17 случаях алло-ТГСК выполнена от родственного полностью совместимого донора, в 13 – от неродственного пол-

ностью совместимого донора и в 5 – от неродственного частично совместимого донора. В качестве источника трансплантата у 24 больных использовано КМ, у 11 пациентов – периферические стволовые клетки. Срок возникновения оРТПХ составил 8–162 дня после алло-ТГСК, медиана – 64 дня. У 3 пациентов РТПХ развилась после трансфузии лимфоцитов донора, у 5 – во время отмены иммуносупрессивной терапии. Изолированное поражение кожи выявлено у 3 человек, печени – у 1, кишечника – у 13, кожи и печени – у 2, кожи и кишечника – у 10, печени и кишечника – у 2, у 4 больных отмечено вовлечение 3 органов-мишеней (кожи, печени и кишечника). У большинства пациентов (62,8%) выявлена 3–4-я степень оРТПХ: у 16 – 3-я, у 6 – 4-я. У 13 пациентов диагностирована оРТПХ 2-й степени. Степень оРТПХ определена в соответствии с критериями Н. Glucksberg и соавт., 1974 [26].

В качестве 1-й линии терапии назначен метилпреднизолон в дозе не менее 1 мг/кг в сутки (в 2 случаях проводилась терапия ингибиторами кальциневрина в связи с развившимися осложнениями и высоким риском назначения глюкокортикостероидов). оРТПХ считали резистентной к терапии, если не достигнут ПО через 14 дней или при признаках прогрессирования оРТПХ во время лечения, а также при отсутствии какого-либо ответа через 5–7 дней лечения.

Исследование одобрено локальным этическим комитетом. Информированное согласие на применение МСК получено от всех пациентов. С целью терапии оРТПХ, резистентной к лечению, всем пациентам введены МСК, полученные из КМ здоровых доноров – как собственных доноров гемопоэтических стволовых клеток, так и других (сторонних) доноров.

С целью терапии оРТПХ МСК вводили в дозировке 1×10^6 /кг массы тела больного. У 8 лиц выполнено 1 введение МСК, у 17 – 2, у 8 – 3, у 1 – 4 и у 1 – 5 введений. Интервал между введениями составил 1 нед. В качестве терапии введены МСК, полученные из КМ собственного донора (донора гемопоэтических клеток), 21 пациенту, 14 – МСК из КМ стороннего донора. Медиана срока введения МСК от диагностики РТПХ составила 15,5 дня (7–62). У 27 пациентов МСК использованы в качестве терапии резистентной формы РТПХ как 2-я линия терапии, у 7 – 3-я, у 1 – 4-я (табл. 1).

Ответ на лечение МСК оценивали через 28 дней после их введения. Ответ на введение МСК определен как ПО в случае полного исчезновения всех признаков оРТПХ или ЧО – при уменьшении симптомов поражения в органах-мишенях более чем на 50%, клиническое улучшение (КУ) – менее чем на 50%. Стабильное или прогрессирующее течение РТПХ классифицировано как отсутствие ответа.

МСК выделяли из КМ, полученного во время эксфузии у доноров после подписания ими информированного согласия. Для получения ядросодержащих клеток КМ смешивали с одинаковым объемом среды α MEM (ICN), который содержал 0,2% метилцеллюлозы (1500 cP, Sigma-Aldrich). Большинство эритроцитов и гранулоцитов оседало через 40 мин, в то время как мононуклеарные клетки оставались в суспензии. Далее клеточный осадок ресуспендировали в стандартной среде для культивирования, которая состояла из среды α MEM с 4% плазмы, обогащенной тромбоцитами, 100 ЕД/мл пенициллина («Ферейн», Россия), 2 мМ L-глутамин (ICN) и 50 мкг/мл стрептомицина («Ферейн», Россия). Клетки культивировали по $27\text{--}30 \times 10^6$ клеток на флакон T175 см² (Corning-Costar). После формирования конфлюэнтного монослоя клетки отмывались 0,02% ЭДТА (ICN) в физиологическом растворе (Sigma-Aldrich), а затем обрабатывались трипсином (ICN). Клетки рассаживали по 4×10^3 клеток на 1 см² площади

флакона. Культуры держали в условиях гипоксии при 37°C в атмосфере с 5% CO₂ и 5% O₂. Для лабораторных исследований МСК культивировали с 10% эмбриональной телячьей сывороткой (Hyclone, США).

Для анализа колониеобразующих единиц фибробластов (КОЕф) ядросодержащие клетки полученных образцов КМ культивировали по 10^6 и 5×10^5 на флакон с площадью дна 25 см² в среде альфа-МЕМ с 20% эмбриональной телячьей сывороткой, 2 мМ L-глутамин (ICN, США), 100 ед/мл пенициллина («Ферейн», Россия), 50 мкг/мл стрептомицина («Ферейн», Россия) в течение 14 дней. Подсчет колоний производили под бинокулярной лупой (Opton, Германия) после окрашивания в 1% кристаллвиолете на 20% метаноле.

Определение антигенов комплекса гистосовместимости на МСК выполняли методом проточной цитометрии. После снятия МСК со дна флакона их дважды отмывали раствором CellWash (BD Biosciences, США) и после этого 2×10^4 клеток инкубировали 20 мин в темноте с моноклональными антителами. Анализ проводили с использованием проточного цитометра FACSCanto II (BD Biosciences, США), данные анализировали с помощью программы FACSDiva (BD Biosciences, США). Популяцию МСК определяли сначала по параметрам прямого и бокового светорассеяния, далее выделяли клетки, экспрессирующие CD90. В этой популяции клеток оценивали средний уровень флуоресценции (MFI) по каналам PE (CD90, CD146, CD73), APC (HLA-DR, CD178, CD54, CD86), FITC (HLA-ABC, CD80, CD105, CD274).

Определение уровня экспрессии генов в МСК осуществляли на первом пассаже методом обратной транскрипции с последующей полимеразной цепной реакцией (ПЦР) в режиме реального времени (модификация Taq-Man) на приборе Abiprism 7500 (Applied Biosystems). РНК выделяли, используя стандартный протокол с небольшими модификациями. Обратную транскриптазу (M-MLV, Promega) применяли для построения первых цепей ДНК после гибридизации мРНК со смесью поли-Т-праймеров и случайных гексамеров. Нуклеотидные последовательности специфичных к соответствующим генам праймеров и зондов приведены ранее в статье [27]. Для анализа полученных данных использовали метод $\Delta\Delta C_t$ [28]. После проведения ПЦР вычисляли средние значения порогового цикла C_t из 3 проб для каждого из образцов. Вычисляли разницу средних значений порогового цикла для исследуемого гена между опытным и контрольным образцом (в качестве контрольного образца взята смесь кДНК из проб от 8 доноров). Ненормированную разницу экспрессии гена вычисляли по формуле:

$$D = 2 - \Delta C_t \quad (1),$$

где D – ненормированная разность в экспрессии исследуемого гена, а ΔC_t – разность средних значений порогового цикла опытного и контрольного образцов. Для нормирования количества кДНК в исходных пробах использовали гены домашнего хозяйства, кодирующие *GAPDH* (глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа) и *BACT* (β -актин). Для каждого из этих генов проводили ПЦР в режиме реального времени с соответствующими праймерами и зондом. Вычисляли показатель D по каждому из этих генов по формуле (1). Показатель D в случае гена домашнего хозяйства отражает разницу в количестве исходного материала (тотальной РНК) в разных пробах. Суммарный фактор нормализации вычисляли как среднее геометрическое из факторов нормализации по отдельным генам домашнего хозяйства. Нормированную разницу экспрессии интересующих нас генов вычисляли по формуле (2):

$$D_n = \frac{D}{NF} \quad (2),$$

Таблица 2. Результаты терапии с использованием МСК в зависимости от ответа на лечение

	ПО (n=13)	ЧО/КУ (n=13)	Нет ответа (n=9)
Живы на момент анализа	6/13 (46%)	6/13 (46%)	1/9 (11%)
Причины смерти			
Рецидив	4	2	–
РТПХ	1	2	6
Инфекционные осложнения	2	3	2

Таблица 3. Характеристика МСК в зависимости от клинического ответа

	ПО (n=13)	ЧО/КУ (n=13)	Нет ответа (n=9)
Возраст донора, лет	Медиана 40 (16–62)	Медиана 34 (13–61)	Медиана 38 (27–55)
КОЕф	18,8±6,5	37,7±14,3	6,1±1,4
Суммарная клеточная продукция МСК	7,5±1,5	11,4±2,5	14,5±6,5
Время до P0	13,5±0,8	12,7±0,4	14,4±0,9

где Dn – нормированная разница экспрессии гена, D – ненормированная разница экспрессии гена, NF – суммарный фактор нормализации по 2 генам домашнего хозяйства.

ОВ всех больных, включенных в исследование, рассчитывали от 1-го дня введения МСК; за событие принимали смерть от любых причин. Для сравнения показателей ОВ больных, у кого отмечался или не отмечался положительный ответ на лечение, за точку отсчета приняли максимальное время до достижения эффекта от введения МСК (+24-й день), поскольку это позволяет избежать отрицательной селекции в группе лиц, у которых МСК оказались неэффективны (смерти до возможного достижения ответа).

Статистический анализ выполнен с помощью программы GraphPad Prism version 8.1 (GraphPad Software Inc.). Применяли непарный Т-критерий Стьюдента и событийный анализ Каплана–Майера. Достоверными считали различия при $p < 0,05$.

Результаты

Ответ на лечение с использованием МСК достигнут у 26 (74%) больных, при этом ПО отмечался у 13 (37%) пациентов, ЧО/КУ – также у 13. У 9 пациентов не наблюдалось положительного эффекта после начала лечения МСК.

Отмечено, что в группе больных, у которых достигнут положительный ответ на лечение, медиана времени от начала терапии с использованием МСК до улучшения состояния пациента составила – 7 дней (2–24). У 17 пациентов после терапии МСК использованы следующие линии иммуносупрессивной терапии, которая назначалась при отсутствии ответа, прогрессии или рецидива РТПХ.

Не выявлено тяжелых осложнений при терапии МСК, и только у одного пациента отмечался небольшой озноб при повторном введении.

При анализе результатов лечения не выявлено различий в возрасте пациентов, степени оРТПХ, сроков ее возникновения, вовлечения органов-мишеней, совместимости с донором гемопоэтических клеток и источником трансплантата (КМ или стволовые клетки периферической крови), интервала от времени диагностики РТПХ до начала лечения с использованием МСК среди пациентов, у которых достигнут ПО или ЧО/КУ или нет ответа на лечение. Не выявлено зависимости частоты ответов на терапию от возраста донора МСК и количества введений, а также в качестве какой линии терапии использовали МСК, хотя у большинства пациентов во всех группах МСК применяли в качестве 2-й линии терапии. При этом выявлено, что среди ответивших на терапию

МСК достоверно больше женщин, чем мужчин (по критерию $\chi^2 p=0,012$).

В нашем исследовании вероятность ОВ пациентов после начала терапии МСК составила к 6 мес – 63%, к 24 мес – 48%, к 60 мес – 29% (рис. 1, см. на цветной вклейке).

Для оценки скорости достижения ответа и медианы времени его достижения проанализирована вероятность достижения ответа. На рис. 2 (см. на цветной вклейке) видно, что среди пациентов, у которых достигнут ответ на терапию, максимальный срок достижения ответа составил 24 дня после введения МСК, а медиана времени до достижения ответа – 7 дней. При этом вероятность получения положительного эффекта после начала терапии МСК составила 75%.

Для того, чтобы сравнить показатели ОВ у больных, у которых достигнут или не достигнут ответ на лечение МСК, за точку 0 принят 24-й день после введения МСК (максимальный срок достижения ПО/ЧО/КУ).

ОВ закономерно выше в группе пациентов с ПО и ЧО/КУ, чем у пациентов, у которых нет ответа на терапию (рис. 3, см. на цветной вклейке). Также видно, что у большинства пациентов, у которых терапия МСК неэффективна, ОВ крайне низка, так как не наблюдалось ответа и на последующие линии терапии.

У 6 пациентов в группе ПО или ЧО на лечение в дальнейшем развились рецидивы заболевания, а также тяжелые инфекционные осложнения, в то время как рецидивы РТПХ, приведшие к летальному исходу, отмечались реже. У большинства пациентов, у которых не получено ПО или ЧО при лечении МСК (8 из 9), не зафиксировано ответа на все последующие линии терапии. Они погибли в результате прогрессии РТПХ и инфекционных осложнений (табл. 2).

Одной из целей нашего исследования стала попытка выявить характеристики МСК, влияющие на их эффективность. Анализ приведен в табл. 3.

С целью терапии РТПХ пациентам вводили как МСК, полученные из КМ собственного донора гемопоэтических клеток, так и МСК, полученные из КМ стороннего донора. Анализ не продемонстрировал влияния источника МСК на эффективность терапии. Не выявлено достоверных отличий в возрасте донора, из КМ которого получены МСК, концентрации МСК в КМ (на которую указывает время до P0) и суммарной клеточной продукции МСК. Однако видна тенденция к повышению суммарной клеточной продукции МСК со снижением клинической эффективности. Суммарная клеточная продукция МСК за 4 пассажа несколько выше, хотя и недостоверно, в тех МСК, введение которых оказалось неэффективным ($7,6 \pm 1,5 \times 10^6$ против $14,6 \pm 6,5 \times 10^6$; $p=0,37$).

Таблица 4. Медиана относительного уровня экспрессии генов, важных для иммуномодуляции, в МСК в зависимости от их клинического эффекта

Ген	МСК		Значение <i>p</i>
	Эффективные	Неэффективные	
<i>IL6</i>	2,4	5,5	0,07
<i>IDO1</i>	0,004	8,7	0,2
<i>PDGFRa</i>	0,8	2	0,32
<i>IL1BR1</i>	1,4	2,2	0,38
<i>FGF2</i>	3,4	9,1	0,18
<i>LIF</i>	1	2,7	0,24
<i>ICAM1</i>	0,2	0,6	0,4
<i>VEGF</i>	1,6	0,2	0,005

Таблица 5. Средний уровень флуоресценции поверхностных маркеров МСК в зависимости от их клинического эффекта

Маркер	Средний уровень флуоресценции МСК		Значение <i>p</i>
	Эффективные	Неэффективные	
HLA-ABC	14549±1164	10115±1226	0,03
HLA-DR	420±74	259±122	0,31
CD90	79473±5946	54338±7646	0,03
CD274 (PDL-1)	92±34	0–2	0,02

Выявлено достоверное увеличение концентрации КОЕф в КМ доноров, МСК которых эффективны ($27,1 \pm 7,5/10^6$ ядросодержащих клеток КМ против $6,1 \pm 1,4$; $p=0,01$).

При анализе относительного уровня экспрессии генов иммуномодулирующих факторов достоверных различий не выявлено при анализе 3 групп (ПО, ЧО/КУ и отсутствие ответа), однако также видна тенденция повышения экспрессии генов, отвечающих за иммуномодулирующие свойства МСК (*IL6*, *IDO1*, *IL1BR1*, *ICAM1*) в группе неэффективных, кроме того, повышен относительный уровень экспрессии генов основным фактором роста фибробластов (*FGF2*) и рецептора ИЛ-1 β (*IL1BR1*); табл. 4. При объединении групп ПО и ЧО/КУ достоверно отличается относительный уровень экспрессии *VEGF*.

Анализ среднего уровня флуоресценции поверхностных маркеров на МСК из 2 групп показал достоверные отличия между эффективными и неэффективными для терапии оРТПХ образцами МСК (табл. 5). В эффективных образцах МСК экспрессия молекул главного комплекса гистосовместимости, CD90 и PDL-1 повышена по сравнению с неэффективными.

Обсуждение

В метаанализ результатов терапии резистентной к глюкокортикостероидам РТПХ с использованием МСК включены данные более 25 крупных исследований [22, 29]. Большинство из них использует МСК стороннего донора, при этом клиники получают клетки из других учреждений, что не позволяет изучать свойства отдельных образцов МСК и сопоставлять их с клиническими результатами. В нашем исследовании получена уникальная возможность проанализировать все образцы МСК, использованные для лечения оРТПХ, резистентной к глюкокортикостероидам, и сопоставить характеристики МСК с эффективностью терапии.

Данные об эффективности МСК в терапии резистентных форм РТПХ очень разнятся, ПО наблюдается у 6,5–54,5%, ЧО – у 17–50,7% пациентов [11, 22]. Показано, что МСК более эффективны у пациентов детского возраста [13,

30, 31]. В нашем исследовании зависимости эффективности терапии от возраста доноров и пациентов не выявлено. Возможно, это связано с тем, что вся когорта лиц, включенных в исследование, взрослая.

Отсутствие крупных исследований не позволяет выявить факторы, влияющие на эффективность МСК, как со стороны самих клеток (протоколы получения и введения, характеристики клеток), так и со стороны пациентов (у кого может быть достигнут ответ на лечение, сроки, дозы и т.п.) [32]. В анализе, включившем 15 работ по лечению резистентной к глюкокортикостероидам РТПХ у 558 пациентов (269 взрослых и 289 детей), по данным разных исследователей, продемонстрировано, что вероятность ОВ в течение 6 мес составила от 37 до 71%, 24 мес – от 17,4 до 40%, что превышает результаты некоторых других подходов к терапии. В нашем исследовании получены практически аналогичные результаты: ОВ в течение 6 мес составила 63%, в течение 2 лет – 48%.

Известно, что эффективность лечения при резистентных формах РТПХ может определяться вовлечением органов-мишеней. Так, при поражении печени и кишечника реже отмечаются ПО на лечение. Эффективность терапии РТПХ с помощью МСК также зависит от пораженных органов [23, 33, 34]. Лучший ответ, по данным других исследователей, достигается при лечении РТПХ с поражением кожи, при более низкой степени РТПХ и при большем количестве введений [35]. В нашем исследовании локализация и степень поражения не оказывали значительного влияния на эффективность ответа на терапию, нередко отмечался положительный эффект на лечение у пациентов с прогностически неблагоприятными формами РТПХ с поражением кишечника, при сочетанном вовлечении органов.

Некоторые исследователи предполагают, что более раннее после диагностики резистентности к глюкокортикостероидам введение МСК эффективнее [36]. Мы не отметили такого влияния времени начала терапии МСК на эффективность лечения.

Большинство опубликованных работ описывает введение МСК от стороннего донора. В нашем исследовании име-

лась возможность проанализировать также введение МСК от собственного донора гемопоэтических клеток. Не выявлено зависимости эффективности терапии с использованием МСК от того, вводились клетки от собственного донора гемопоэтических клеток или от стороннего (не совместимого по антигенам HLA) донора.

Ранее не выявлено никаких факторов, прогнозирующих эффективность использования МСК при внутривенном введении [29]. В нашем исследовании характеристик использованных МСК обнаружены отличия между эффективными и неэффективными для терапии оРТПХ образцами. Оказалось, что на поверхности МСК из эффективных образцов достоверно выше экспрессированы молекулы главного комплекса гистосовместимости. Считалось, что молекулы HLA-ABC слабо экспрессированы, а HLA-DR крайне слабо экспрессированы на поверхности МСК [37, 38]. При анализе множества образцов выявились отличия в уровне экспрессии этих молекул. На эффективных образцах их экспрессия достоверно выше примерно в 1,5 раза. Известно, что при активации МСК, например интерфероном γ или при сокультивировании с лимфоцитами, экспрессия этих молекул сильно повышается [39]. Можно предполагать, что клетки из эффективных образцов более активны в ингибировании Т-клеток, вызывающих РТПХ, за счет повышенной способности к иммуномодуляции. Более того, достоверное повышение экспрессии CD274(PDL-1) свидетельствует о более высокой способности ингибировать пролиферацию Т-клеток. Известно, что в присутствии PDL-1 снижаются пролиферация Т-клеток и секреция ими цитокинов [40].

В эффективных для лечения образцах МСК отмечалась меньшая суммарная клеточная продукция, чем в неэффективных, что коррелирует с экспрессией *FGF2* и *IL1BR1*. Проллиферация МСК стимулируется основным фактором

роста фибробластов (*FGF2*) и ИЛ-1 β (*IL1B*) [41, 42]. Несмотря на отсутствие достоверных различий, в неэффективных МСК повышен относительный уровень экспрессии генов *FGF2* и рецептора *IL1BR1* (см. табл. 3).

Мировое научное сообщество пытается рационализировать клиническое применение МСК и выявить закономерности успешной и неуспешной терапии [11, 29]. Ранее нами выявлены различия в свойствах МСК при взаимодействии с лимфоцитами [43]. На основании этой работы проведен анализ всех МСК, использованных для лечения оРТПХ, который выявил существенные различия между эффективными и неэффективными образцами. Эти данные позволяют выбирать потенциально более эффективные образцы для лечения оРТПХ, что может в дальнейшем улучшить клинические результаты.

Заключение

Терапия РТПХ с помощью МСК показала сопоставимую эффективность по сравнению с другими методами терапии оРТПХ, резистентной к глюкокортикоидам РТПХ. Учитывая низкий процент осложнений и высокую эффективность при крайне неблагоприятных формах РТПХ (3–4-я степень, вовлечение кишечника), этот подход представляется одним из оптимальных для лечения данного осложнения. Дальнейшие изучение и подбор оптимальных для терапии образцов МСК могут позволить добиться лучших результатов терапии резистентных форм оРТПХ.

Благодарности

В работе использованы материалы, поддержанные грантом Российского фонда фундаментальных исследований (проект №19-29-04023).

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

- Zeiser R, Blazar BR. Acute Graft-versus-Host Disease – Biologic Process, Prevention, and Therapy. *N Engl J Med*. 2017;377:2167-79. doi: 10.1056/NEJMra1609337
- Choi SW, Levine JE, Ferrara JLM. Pathogenesis and management of graft-versus-host disease. *Immunol Allergy Clin North Am*. 2010;30:75-101 doi: 10.1016/j.iac.2009.10.001
- Allen JL, Fore MS, Wooten J, et al. B cells from patients with chronic GVHD are activated and primed for survival via BAFF-mediated pathways. *Blood*. 2012;120:2529-36. doi: 10.1182/blood-2012-06-438911
- Perkins J, Field T, Kim J, et al. A Randomized Phase II Trial Comparing Tacrolimus and Mycophenolate Mofetil to Tacrolimus and Methotrexate for Acute Graft-versus-Host Disease Prophylaxis. *Biol. Blood Marrow Transplant*. 2010;16:937-47. doi: 10.1016/j.bbmt.2010.01.010
- Nakane T, Nakamae H, Yamaguchi T, et al. Use of mycophenolate mofetil and a calcineurin inhibitor in allogeneic hematopoietic stem-cell transplantation from HLA-matched siblings or unrelated volunteer donors: Japanese multicenter phase II trials. *Int J Hematol*. 2017;105:485-96. doi: 10.1007/s12185-016-2154-4
- Zeiser R, Blazar BR. Acute graft-versus-host disease – Biologic process, prevention, and therapy. *N Engl J Med*. 2017;377:2167-79. doi: 10.1056/NEJMra1609337
- Hill L, Alousi A, Kebriaei P, et al. New and emerging therapies for acute and chronic graft versus host disease. *Ther Adv Hematol*. 2018;9:21-46. doi: 10.1177/2040620717741860
- Ruutu T, Gratwohl A, De Witte T, et al. Niederwieser, Prophylaxis and treatment of GVHD: EBMT-ELN working group recommendations for a standardized practice. *Bone Marrow Transplant*. 2014;49:168-73. doi: 10.1038/bmt.2013.107
- Bader P, Kuçi Z, Bakhtiar S, et al. Effective treatment of steroid and therapy-refractory acute graft-versus-host disease with a novel mesenchymal stromal cell product (MSC-FFM). *Bone Marrow Transplant*. 2018;53:852-62. doi: 10.1038/s41409-018-0102-z
- Deeg HJ. How I treat refractory acute GVHD. *Blood*. 2007;109:4119-26. doi: 10.1182/blood-2006-12-041889
- Elgaz S, Kuçi Z, Kuçi S, et al. Clinical Use of Mesenchymal Stromal Cells in the Treatment of Acute Graft-versus-Host Disease. *Transfus Med Hemotherapy*. 2019;46:27-34. doi: 10.1159/000496809
- Kitko CL, Levine JE. Extracorporeal photopheresis in prevention and treatment of acute GVHD. *Transfus Apher Sci*. 2015;52:151-6. doi: 10.1016/j.transci.2015.02.001
- Le Blanc K, Rasmusson I, Sundberg B, et al. Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells. *Lancet*. 2004;363:1439-41. doi: 10.1016/S0140-6736(04)16104-7
- Corcione A, Benvenuto F, Ferretti E, et al. Human mesenchymal stem cells modulate B-cell functions. *Blood*. 2006;107:367-72. doi: 10.1182/blood-2005-07-2657
- Uccelli A, Moretta L, Pistoia V. Mesenchymal stem cells in health and disease. *Nat Rev Immunol*. 2008;8:726-36. doi: 10.1038/nri2395
- Dan YY, Riehle KJ, Lazaro C, et al. Isolation of multipotent progenitor cells from human fetal liver capable of differentiating into liver and mesenchymal lineages. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103:9912-7. doi: 10.1073/pnas.0603824103
- Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006;8:315-7. doi: 10.1080/14653240600855905

18. Bartholomew A, Sturgeon C, Siatskas M, et al. Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro and prolong skin graft survival in vivo. *Exp Hematol.* 2002;30:42-8.
19. Jones BJ, McTaggart SJ. Immunosuppression by mesenchymal stromal cells: from culture to clinic. *Exp Hematol.* 2008;36:733-41. doi: 10.1016/j.exphem.2008.03.006
20. Le Blanc K, Davies LC. MSCs-cells with many sides. *Cytotherapy.* 2018;20:273-8. doi: 10.1016/j.jcyt.2018.01.009
21. Zhao L, Chen S, Yang P, et al. The role of mesenchymal stem cells in hematopoietic stem cell transplantation: prevention and treatment of graft-versus-host disease. *Stem Cell Res Ther.* 2019;10:182. doi: 10.1186/s13287-019-1287-9
22. Fisher SA, Cutler A, Doree C, et al. Mesenchymal stromal cells as treatment or prophylaxis for acute or chronic graft-versus-host disease in haematopoietic stem cell transplant (HSCT) recipients with a haematological condition. *Cochrane Database Syst Rev.* 2019;1:CD009768. doi: 10.1002/14651858.CD009768.pub2
23. Galleu A, Milojkovic D, Deplano S, et al. Mesenchymal stromal cells for acute graft-versus-host disease: response at 1 week predicts probability of survival. *Br J Haematol.* 2019;185:89-92. doi: 10.1111/bjh.15749
24. Von Dalowski F, Kramer M, Wermke M, et al. Mesenchymal Stromal Cells for Treatment of Acute Steroid-Refractory Graft Versus Host Disease: Clinical Responses and Long-Term Outcome. *Stem Cells.* 2016;34:357-66. doi: 10.1002/stem.2224
25. Le Blanc K, Frassoni F, Ball L, et al. Mesenchymal stem cells for treatment of steroid-resistant, severe, acute graft-versus-host disease: a phase II study. *Lancet.* 2008;371:1579-86. doi: 10.1016/S0140-6736(08)60690-X
26. Glucksberg H, Storb R, Fefer A, et al. Clinical manifestations of graft-versus-host disease in human recipients of marrow from HLA-matched sibling donors. *Transplantation.* 1974;18:295-304. doi: 10.1097/00007890-197410000-00001
27. Kuzmina LA, Petinati NA, Parovichnikova EN, et al. Multipotent Mesenchymal Stromal Cells for the Prophylaxis of Acute Graft-versus-Host Disease-A Phase II Study. *Stem Cells Int.* 2012;2012:968213. doi: 10.1155/2012/968213
28. Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nat Protoc.* 2008;3:1101-8. doi: 10.1038/nprot.2008.73
29. Galipeau J, Sensébé L. Mesenchymal Stromal Cells: Clinical Challenges and Therapeutic Opportunities. *Cell Stem Cell.* 2018;22:824-33. doi: 10.1016/j.stem.2018.05.004
30. Krasowska-Kwiecien A, Gozdzik J, Jarocho D, et al. Mesenchymal Stem Cells as a Salvage Treatment for Severe Refractory Graft-versus-Host Disease in Children After Bone Marrow Transplantation. *Transplant Proc.* 2019;51:880-9. doi: 10.1016/j.transproceed.2019.01.023
31. Kurtzberg J, Prockop S, Teira P, et al. Allogeneic human mesenchymal stem cell therapy (remestemcel-L, Prochymal) as a rescue agent for severe refractory acute graft-versus-host disease in pediatric patients. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2014;20:229-35. doi: 10.1016/j.bbmt.2013.11.001
32. Lukomska B, Stanaszek L, Zuba-Surma E, et al. Challenges and Controversies in Human Mesenchymal Stem Cell Therapy. *Stem Cells Int.* 2019;2019:1-10. doi: 10.1155/2019/9628536
33. Resnick IB, Barkats C, Shapira MY, et al. Treatment of severe steroid resistant acute GVHD with mesenchymal stromal cells (MSC). *Am J Blood Res.* 2013;3:225-38.
34. Sánchez-Guijo F, Caballero-Velázquez T, López-Villar O, et al. Sequential third-party mesenchymal stromal cell therapy for refractory acute graft-versus-host disease. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2014;20:1580-5. doi: 10.1016/j.bbmt.2014.06.015
35. Chen X, Wang C, Yin J, et al. Efficacy of mesenchymal stem cell therapy for steroid-refractory acute graft-versus-host disease following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: A systematic review and meta-analysis. *PLoS One.* 2015;10. doi: 10.1371/journal.pone.0136991
36. Ball LM, Bernardo ME, Roelofs H, et al. Multiple infusions of mesenchymal stromal cells induce sustained remission in children with steroid-refractory, grade III-IV acute graft-versus-host disease. *Br J Haematol.* 2013;163:501-9. doi: 10.1111/bjh.12545
37. Le Blanc K, Tammik L, Sundberg B, et al. Mesenchymal stem cells inhibit and stimulate mixed lymphocyte cultures and mitogenic responses independently of the major histocompatibility complex. *Scand J Immunol.* 2003;57:11-20.
38. Deans RJ, Moseley AB. Mesenchymal stem cells: biology and potential clinical uses. *Exp Hematol.* 2000;28:875-84.
39. Kapranov NM, Davydova YO, Galtseva IV, et al. Effect of priming of multipotent mesenchymal stromal cells with interferon γ on their immunomodulating properties. *Biochem.* 2017;82. doi: 10.1134/S000629791710008X.
40. Freeman GJ, Long AJ, Iwai Y, et al. Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. *J Exp Med.* 2000;192:1027-34. doi: 10.1084/jem.192.7.1027
41. Zhironkina OA, Shipounova IN, Bigildeev AE, et al. Proliferative potential of multipotent mesenchymal stromal cells from human bone marrow. *Bull Exp Biol Med.* 2012;152:543-7. doi: 10.1007/s10517-012-1571-5
42. Sotiropoulou PA, Perez SA, Salagianni M, et al. Characterization of the Optimal Culture Conditions for Clinical Scale Production of Human Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells.* 2006;24:462-71. doi: 10.1634/stemcells.2004-0331
43. Kapranov NM, Davydova YO, Gal'tseva IV, et al. Individual Differences of Multipotent Mesenchymal Stromal Cells Manifesting in during Interaction with Lymphocytes. *Bull Exp Biol Med.* 2018;165:584-8. doi: 10.1007/s10517-018-4218-3

Поступила 13.04.2020

К статье Л.А. Кузьминой и соавт. «Применение мультипотентных мезенхимных стромальных клеток для лечения острой реакции «трансплантат против хозяина»» (с. 23)

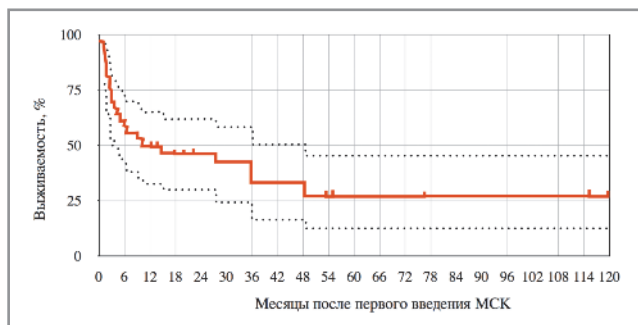


Рис. 1. ОВ пациентов с резистентной к терапии ОРТПХ, с использованием МСК.

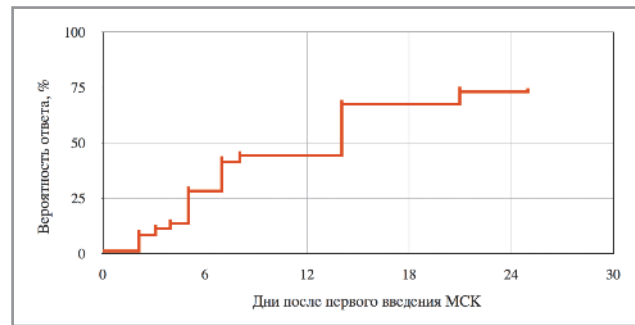


Рис. 2. Время до достижения ответа на терапию с использованием МСК.



Рис. 3. Вероятность ОВ в зависимости от ответа.

К статье В.В. Птушкина и соавт. «Результаты открытого многоцентрового клинического исследования Ib фазы по оценке безопасности, фармакокинетики и фармакодинамики первого биоаналога экулизумаба у нелеченых пациентов с пароксизмальной ночной гемоглобинурией в фазе индукции терапии» (с. 77)

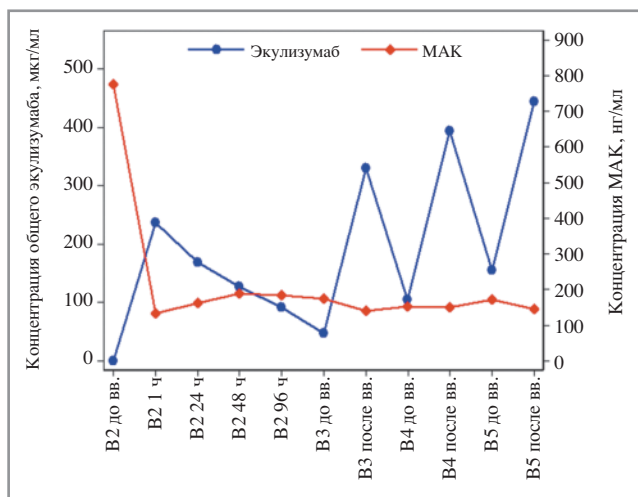


Рис. 2. Динамика концентрации общего экулизумаба и концентрации МАК.

Примечание. В – визит, вв. – введение.

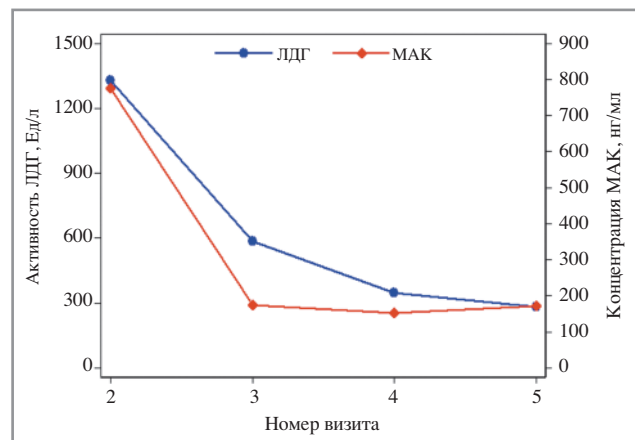


Рис. 3. Динамика концентрации МАК и активности ЛДГ в ходе исследования.