

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Системный подход к обеспечению качества гемопоэтических стволовых клеток пуповинной крови для клинического применения

И.В. Кобзева¹, Т.А. Астрелина^{1,2}, М.В. Яковлева¹, Э.А. Подколзина¹, Е.Э. Карпова¹, Л.Л. Лебедева¹, Е.В. Боякова^{1,2}, Я.А. Круглова¹, Н.К. Шахпазян¹, Е.В. Скоробогатова², О.В. Паина³

¹ Банк стволовых клеток Департамента Здравоохранения г. Москвы, Москва

² Федеральный научно-клинический центр детской гематологии, онкологии и иммунологии Росздрава, Москва

³ Институт детской гематологии и трансплантологии им. Р.М. Горбачевой Санкт-Петербургского Государственного медицинского университета МЗ и СР РФ им. академика И.П. Павлова

A Systemic Approach to Quality Assurance of Umbilical Cord Blood Hematopoietic Stem Cells Designed for Clinical Use

I.V. Kobzeva¹, T.A. Astrelina^{1,2}, M.V. Yakovleva¹, E.A. Podkolzina¹, E.E. Karpova¹, L.L. Lebedeva¹, E.V. Boyakova^{1,2}, Ya.A. Kruglova¹, N.K. Shakhpazyan¹, E.V. Skorobogatova², O.V. Paina³

¹ State health care Institution of Moscow Bank of Stem Cells of the Moscow Health Care Department»

² FSI Federal Research and Clinical Center of Children Hematology, Oncology and Immunology of Roszdrav, Moscow

³ Raisa Gorbacheva Memorial Institute of children Hematology and Transplantology, I. Pavlov Saint Petersburg State Medical University, Ministry of Health and Social Development of the Russian Federation

В статье рассмотрены предпосылки к созданию донорского банка клеток пуповинной крови. Показано, что за время деятельности Банка стволовых клеток Департамента здравоохранения г. Москвы в период с августа 2006 г. по октябрь 2010 г. из криохранилища было изъято 42 образца ПК для проведения аллотрансплантаций гемопоэтических стволовых клеток в отделениях Федерального научно-клинического центра детской гематологии, онкологии и иммунологии Росздрава г. Москвы и отделения трансплантации костного мозга Института детской гематологии и трансплантологии им. Р.М. Горбачевой Санкт-Петербургского Государственного медицинского университета МЗ и СР РФ им. академика И.П. Павлова. Всего за этот период было проведено 23 трансплантации ГСК ПК 22 больным.

Ключевые слова: Банк клеток пуповинной крови, гемопоэтические стволовые клетки, трансплантация.

История возникновения, развития и применения аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток крови (алло-ТСКК) насчитывает чуть более полувека. В 1959 г. появились первые сообщения о двух успешно выполненных трансплантациях донорского костного мозга 2 детям с врожденным иммунодефицитом для восстановления кроветворения после тотального облучения [1–3]. На сегодняшний день, даже несмотря на столь непродолжительный промежуток времени, алло-ТСКК прочно вошла в практическую медицину как эффективный метод лечения различных заболеваний крови, иммунной системы, нарушений обмена веществ и онкологических заболеваний [4]. Во всем мире ежегодно возрастает количество проведенных

The prerequisites necessary for establishing a bank of donor umbilical blood cells have been discussed. According to the article, 42 samples of umbilical blood were taken from the bank cryodepositary for allotransplantations of hematopoietic stem cells in departments of the Federal research and clinical center of pediatric hematology, oncology and immunology of the Moscow City Roszdrav and in the department of bone marrow transplantation of the Institute of Children Hematology and Transplantology n.a. R.M. Gorbacheva at the I.P. Pavlov State Medical Institute of Saint Petersburg for the functioning period of the Stem Cells Bank of the Moscow Health Care Department from August, 2006 to October, 2010. 23 transplantations to 22 patients have been carried out for this period.

Key words: bank of umbilical blood cells, hematopoietic stem cells, transplantation.

трансплантаций и расширяются показания к данному виду терапии. Основным условием для проведения алло-ТСКК является наличие HLA — совместимого донора. «Золотым» источником гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) считается костный мозг. В первую очередь подбор донора осуществляется среди близких родственников, но лишь в 25% удается найти генетически идентичных сиблингов. Поиск неродственного HLA-совместимого донора — это весьма трудоемкий и длительный процесс, связанный с существенными временными и финансовыми трудностями. Несмотря на наличие более 7 млн зарегистрированных добровольных доноров костного мозга во всем мире, из-за чрезвычайного многообразия HLA-системы, не более чем в половине

e-mail: t_astrelina@mail.ru

случаев удается выполнить неродственную алло-ТСКК. А для представителей некоторых этнических групп эта возможность еще меньше. В среднем подбор донора занимает около 3–4 мес., что может весьма негативно влиять на прогноз основного заболевания [4–12].

Перечисленные ограничения привели к поиску альтернативных источников ГСК, и одним из наиболее перспективных стала пуповинная кровь (ПК). В 80 годах XX столетия группой ученых было доказано, что ПК является богатым источником ГСК с высоким пролиферативным потенциалом [13]. В 1988 году была выполнена первая в мире успешная трансплантация ГСК ПК ребенку с анемией Фанкони от HLA-совместимого сиблинга, которая подтвердила способность ПК полностью восстановить гемопоэз после миелоаблативной терапии [14]. Последующие многочисленные исследования по изучению иммунологических свойств ПК выявили еще одну ее особенность: Т-клетки ПК имеют более юный иммунотип, по сравнению с аналогичными клетками костного мозга [15]. В дальнейшем это позволило проводить алло-ТСКК ПК при несовместимости образца по 1-2 HLA-антигенам и существенно расширить список доступных доноров. При этом не отмечалось увеличение частоты развития болезней «реакции трансплантат против хозяина» [16–19].

Огромный прогресс в области алло-ТСКК ПК привел к созданию целой сети банков ПК во всем мире. По данным мировой ассоциации доноров костного мозга WMDA (World Marrow Donor Association) в 2009 г. зарегистрировано более 130 банков ПК, в которых на долгосрочное хранение заложено более 400 000 тестированных образцов ПК, готовых к клиническому применению (<http://www.worldmarrow.org>). Все банки ПК разделяются на государственные, работающие по принципу безвозмездного донорства и создающие накопительный материал для неродственных алло-ТСКК, и частные (коммерческие), осуществляющие именное хранение для внутрисемейного использования. Учитывая небольшие объемы ПК и возможность лишь однократного забора материала, независимо от рода деятельности банка, главной задачей для всех является заготовка максимального количества ГСК с оценкой их функциональной полноценности и разработка эффективных методов криоконсервирования материала. Единого международного протокола по обработке ПК для подготовки к донорскому хранению до сих пор не существует. Во многом работа банков ПК регламентируется большим количеством нормативных документов о качестве и безопасности донорства, сбора, тестирования, обработки, хранения и распределения тканей и клеток человека:

- европейская директива [2004/23/EC];
- стандарт GMP («Good Manufacturing Practice», «Надлежащая производственная практика»);
- AABB («American Association of Blood Banks», «Американская ассоциация банков крови»);
- FACT-NetCord International Standards (www.factwebsite.org).

В России основным документом, которому подчинена деятельность банков ПК, является приказ МЗ РФ № 325 от 25 июля 2003 г. «О развитии клеточных технологий в Российской Федерации», который регламентирует ключевые этапы работы по заготовке пуповинной крови, выделению из нее стволовых клеток и их длительному хранению.

В настоящее время в России успешно функционирует 11 банков по заготовке ПК, из них 5 государственных (Государственное учреждение здравоохранения города Москвы «Банк стволовых клеток Департамента здравоохранения города Москвы»; банк пуповинной крови при ЦКБ № 20, г. Екатеринбург; банк пуповинной крови, г. Новосибирск; банк стволовых клеток Казанского Медицинского университета, г. Казань; Государственное учреждение здравоохранения Самарской области «Клинический центр клеточных технологий», г. Самара) и 6 частных («Гемабанк», г. Москва; банк стволовых клеток «Флора-МЕД», г. Москва, «Криомедика», г. Москва; «КриоЦентр», г. Москва; ООО «Покровский банк стволовых клеток», г. Санкт-Петербург; ООО «Транс-Технологии», г. Санкт-Петербург).

В 2003 г. по распоряжению Правительства Москвы был создан первый государственный банк — Государственное учреждение здравоохранения г. Москвы «Банк стволовых клеток департамента здравоохранения г. Москвы» (ГУЗ «БСК ДЗМ»). На все виды деятельности ГУЗ «БСК ДЗМ» имеет медицинскую лицензию, лицензию Федеральной службы по надзору в сфере здравоохранения и социального развития на осуществление высокотехнологичной медицинской помощи, 15 зарегистрированных в Росздравнадзоре медицинских технологий. ГУЗ «БСК ДЗМ» оснащен современным оборудованием для выделения и криохранения стволовых клеток, соответствующим мировым стандартам безопасности и качества, имеет собственные научно-исследовательские лаборатории. Основной целью ГУЗ «БСК ДЗМ» является обработка и заготовка ГСК ПК для клинического применения. Забор ПК осуществляется в 5 родильных домах г. Москвы (родильные дома № 17, 8 и 10, Центр планирования семьи и репродукции № 1 и ГБ № 8) с участием квалифицированного медицинского персонала. В случае наличия потенциального донора в семье, в которой болен ребенок, осуществляется индивидуальное (персонифицированное) хранения ПК.

За период с 2003 по 2010 г. в ГУЗ «БСК ДЗМ» было обработано 7010 единиц ПК и заложено на длительное хранение около 5000 образцов готовых к клиническому применению. Процедура заготовки ПК состояла из нескольких этапов: сбора, обработки, тестирования и криохранения. При отсутствии стандартных общемировых абсолютных противопоказаний и относительных противопоказаний, принятых в ГУЗ «БСК ДЗМ», наличии развернутого информированного согласия роженицы, полученного в родовом периоде, проводили эксфузию пуповинной крови при самопроизвольных или оперативных родах. Стандартными абсолютными противопоказаниями для сбора и обработки ПК являлись:

- отказ матери;
- наличие носительства и установленных инфекционных заболеваний, в том числе ВИЧ-инфекция, гепатиты, сифилис и заболевания, передающиеся половым и гемотрансмиссивным путем;
- генетические заболевания;
- наследственные и врожденные патологии, в том числе патологии кроветворной и иммунной систем;
- психические заболевания;
- онкологические заболевания, в том числе в стадии ремиссии;
- применение цитостатических и тератогенных средств во время беременности;

- наркомания и токсикомания;
- переливание крови и ее компонентов в течение последних 12 мес.;
- лечение иглоукалыванием, выполнение пирсинга и татуировок в последние 12 мес. перед родами;
- постоянное отстранение от донорства.

Сбор ПК осуществляли без вмешательства в процесс родов только после рождения ребенка до или после отделения его от последа, пережатия и пересечения пуповины. В асептических условиях выполняли пункцию сосудов пуповины с помощью готовой закрытой системы для сбора крови (Green Cross, Корея) объемом 250 мл, которая сводит риск бактериальной контаминации образца до минимальных значений (рис. 1). Система содержала стандартное количество антикоагулянта CPDA (цитрат + фосфат натрия + декстроза + аденин) с антикоагуляционными и протективными свойствами в отношении клеточных мембран. Эксфузию крови осуществляли в течение от 1 до 15 мин после родов (в среднем 5 мин).

После забора ПК в специальных термоконтейнерах доставлялась в ГУЗ «БСК ДЗМ» из родильных домов в течение 18 ч. после родов, длительность транспортировки составляла не более 2 ч. Краткосрочное хранение ПК в родильных домах осуществляли вне зоны доступа прямых солнечных лучей при температуре 20–24°C. Образцы, поступали в регистратуру отделения забора, доставки и регистрационных клеток (ОЗД и РСК) ГУЗ «БСК ДЗМ», где

проводилась регистрация в базе данных и первичная оценка качества материала. Образцы пуповинной крови с «чистым» весом меньше 65 г, нарушением герметичности мешка, неправильным заполнением документации, наличием тромбов и гемолиза, нарушением температурного режима в процессе хранения и транспортировки отбраковывались.

Обработку образцов проводили не позднее чем через 24 ч после процедуры сбора ПК. С целью уменьшения объема обрабатываемого материала и удаления эритроцитов в асептических условиях осуществляли сепарацию пуповинной крови двумя методами: методом двойного центрифугирования и аппаратным методом с помощью клеточного сепаратора «Sepax S1000» (Biosafe, Швейцария).

После выделения ядросодержащих клеток все обработанные образцы подвергали немедленной криоконсервации в автоматизированном криокомплексе «BioArchive®», ThermoGenesis, USA (рис. 2). Непосредственно перед процессом криоконсервации в каждый образец ПК вводили криопротектор диметилсульфоксид (DMSO) в сочетании с декстраном-40 в количестве 20% от объема конечного продукта.

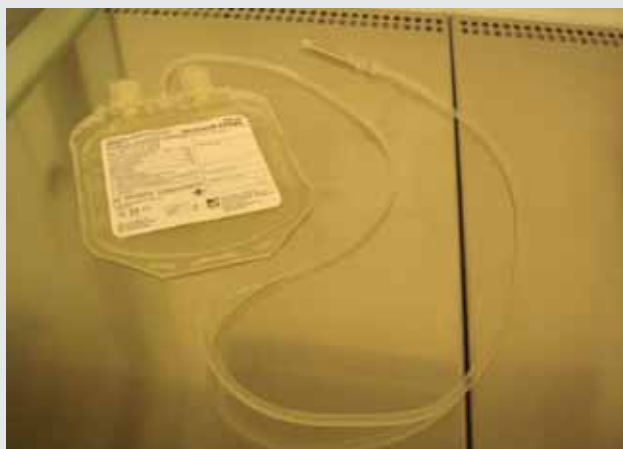


Рис. 1

А — мешок для сбора пуповинной крови;
Б — образец клеток пуповинной крови в криомешке в металлической канистре для криохранения



Рис. 2. Роботизированные криокомплексы «BioArchive®», ThermoGenesis, USA в ГУЗ «БСК ДЗМ»

В процессе обработки ПК определяли групповую принадлежность, клеточный состав исходной ПК и концентрата, оценивали колониеобразующую активность, проводили подсчет ядросодержащих клеток, клеток с иммунофенотипом CD34⁺, CD 133⁺, выполняли контроль бактериальной и вирусной контаминации, и определяли HLA-фенотип образцов.

В ГУЗ «БСК ДЗМ» за период с августа 2006 года по октябрь 2010 г. из криохранилища было изъято 42 образца ПК для проведения алло — ТСКК ГСК в отделениях Федерального научно-клинического центра детской гематологии, онкологии и иммунологии Росздрава г. Москвы и отделение трансплантации костного мозга Института детской гематологии и трансплантологии им. Р.М. Горбачевой Санкт-Петербургского Государственного медицинского университета МЗ и СР РФ им. академика И.П. Павлова. Было проведено 23 трансплантации ГСК ПК 22 больным. Средний возраст пациентов составил 5,8±0,42 (от 8 месяцев до 20 лет), из них мальчиков — 17, девочек — 5. В 15 случаях трансплантации

были проведены по поводу заболеваний системы крови (ОЛЛ-3, ОМЛ-5, ЮММЛ-2, МДС-4, апластическая анемия-1), в 8 случаях — по поводу мукополисахаридоза I типа, синдром Гулера (4) и тяжелого первичного иммунодефицита (4). Практически все пациенты с онкогематологическими заболеваниями имели рецидивирующее или рефрактерное течение болезни. До трансплантации ГСК больным проводились различные миелоаблативные режимы кондиционирования в зависимости от основного диагноза. 10 пациентов получили по одному образцу ПК, 3 — по два образца ПК от одного донора, 2 — по два образца от разных доноров, 4 больных — по три образца (2 от одного донора и 1 от другого), и 1 пациент получил 4 образца ПК (2 от одного и 2 от разных доноров). Выбор доноров проводили с учетом наибольшей совместимости по системе HLA и гемопоэтического потенциала трансплантата. В 3 случаях донорами ГСК явились родные братья/сестры, из них в 2 случаях выполнены родственные HLA идентичные трансплантации, 1 — трансплантирован по одному образцу ПК от родственного и неродственного доноров со степенью совпадения 8/10 по системе HLA. В 20 случаях проведены неродственные трансплантации ГСК ПК с различной степенью совместимости образцов по HLA-антигенам: 4/6 — 5 случаев, 5/6 — 3 случая, 8/10 — 6 случаев, 9/10 — 7 случаев, 10/10 — 3 случая, 11/12 — 2 случая, 10/11 — 2 случая. Двум детям дополнительно проведены гаплотрансплантация ГСК костного мозга и ко-трансплантация мезенхимальных клеток пуповинной крови. Средний объем трансплантата составил 38 мл. Среднее количество трансплантированных мононуклеаров 39×10^7 , CD34⁺/CD45⁺ клеток $22,7 \times 10^5$ на кг массы тела реципиента. Первичное приживление транс-

плантата достигнуто у 10 пациентов, в среднем приживление нейтрофилов отмечено на +21 день. Частичное приживление зафиксировано у 3 больных, у 7 — отсутствовало приживление донорских клеток. У 3 пациентов оценить эффективность трансплантации на данный момент не представляется возможным. Острая РТПХ I–II степени зафиксирована в 7 случаях развития. Развитие хронической РТПХ отмечено только в 1 случае. Трансплантационная смертность составила 47% (9 пациентов из 19), при этом у 4 пациентов смерть наступила в результате тяжелой сопутствующей патологии. 3 пациента находятся в раннем посттрансплантационном периоде.

В перспективном плане развития работа ГУЗ «БСК ДЗМ» направлена на оптимизацию методов сбора, транспортировки и криохранения ПК, разработку критериев качества заготавливаемого материала, оценки жизнеспособности и функциональной активности ГСК ПК.

Таким образом, ПК обладает рядом уникальных особенностей по сравнению с другими источниками ГСК: безопасность сбора ПК для матери и новорожденного; длительное хранение большого количества полностью тестированных и HLA-типированных образцов, готовых к немедленному использованию; возможность использовать частично совместимые образцы по системе HLA. Функционирование банков ПК позволяет существенно расширить количество доступных образцов ПК, минимизировать время до трансплантации, снизить финансовые затраты на поиск и доставку образцов в любой трансплантационный центр. Это позволяет найти подходящего донора практически для всех пациентов, в том числе и для представителей ряда этнических групп, нуждающихся в алло-ТСКК и отсутствии иных источников ГСК.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Armitage J.O. Bone marrow transplantation. *N. Engl. J. Med.* 1994; 330: 827–38.
2. Thomas E.D., Lochte H.L., Jr, Lu W.C., Ferrebee J.W. Intravenous infusion of bone marrow in patients receiving radiation and chemotherapy. *N. Engl. J. Med.* 1957; 257(11): 491–6.
3. Talbot T.R., Elson L.A. Protection of August Rats against Lethal Doses of a Dirre. Homologue of Myeleran by Isologous Bone Marrow. *Nature* 1958; 181: 684.
4. Coplan E.A. Hematopoietic stem cell transplantation. *N. Engl. J. Med.* 2006; 354: 1813–26.
5. Howe C.W., Radde-Stepaniak T. Hematopoietic cell donor registries. In Thomas E., Blume K.G., Forman S.J., eds. *Hematopoietic Cell transplantation*, 2nd. Malden, MA Blackwell Science 1999; 503–14.
6. Oudshoorn M., Foeken L., Wiegand T. Editors. *Stem cell donor registries annual report 2007*, 11th edition. WMDA: Netherlands, 2008.
7. Falkenburg J.H.F., Lim F.T.H. Использование пуповинной крови вместо костного мозга для аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток. *PMЖ* 1996; 3 (4): 24–31.
8. Абдулкадыров К.М., Романенко Н.А., Старков Н.Н. Получение и клиническое применение периферических гемопоэтических стволовых клеток из пуповинной крови. *Вопросы онкологии* 2000; 46(5): 513–20.
9. Gluckman E. Current status of umbilical cord blood hematopoietic stem cell transplantation. *Exp. Hematol.* 2000; 28(11): 1197–205.
10. Kollman C., Abella E., Baitty R. Assessment of optimal size and composition of US National Registry of Hematopoietic Stem Cell Donors. *Transplant.* 2004; 78: 89–95.

11. Rubinstein P. Why cord blood? *Hum. Immunol.* 2006; 67: 398–404.
12. Forte K.J. Alternative donor sources in pediatric bone marrow transplantation. *J. Pediatr. Oncol. Nurs.* 1997; 14(4): 213–24.
13. Broxmeyer H.E., Douglas G.W., Hangoc G. et al. Human umbilical cord blood as a potential source of transplantable hematopoietic stem/progenitor cells. *PNAS USA* 1989; 86(10): 3828–32.
14. Gluckman E., Broxmeyer H.A., Auerbach A.D., Friedman H.S., et al. Hematopoietic reconstitution in a patient with Fanconi's anemia by means of umbilical-cord blood from an HLA-identical sibling. *N. Engl. J. Med.* 1989; 321(17): 1174–8.
15. Szabolcs P., Park K.D., Reese M. et al. Coexistent naive phenotype and higher cycling rate of cord blood T cells as compared to adult peripheral blood. *Exp. Hematol.* 2003; 31: 708–14.
16. Gluckman E., Rocha V., Boyer-Chamard A. et al. Outcome of cord-blood transplantation from related and unrelated donors: Eurocord Transplant Group and the European Blood and Marrow Transplantation Group. *N. Engl. J. Med.* 1997; 337: 373–81.
17. Wagner J.E., Barker J.N., DeFor T.E. et al. Transplantation of unrelated donor umbilical cord blood in 102 patients with malignant and nonmalignant diseases: influence of CD34 cell dose and HLA disparity on treatment-related mortality and survival. *Blood* 2002; 100: 1611–8.
18. Kernan N.A., Bartsch G., Ash R.C. et al. Analysis of 462 transplantations from unrelated donors facilitated by the National Marrow Donor Program. *N. Engl. J. Med.* 1993; 328: 593–602.
19. Hongeng S., Krance R.A., Bowman L.C. et al. Outcomes of transplantation with matched-sibling and unrelated-donor bone marrow in children with leukaemia. *Lancet* 1997; 350: 767–71.

Поступила 25.01.2011