

Использование пуповинной крови при проведении аллогенной трансплантации гемопоэтических клеток у детей со злокачественными и незлокачественными заболеваниями системы крови

*П.Е. Трахтман, Д.Н. Балашов, И.П. Щипицына, О.Л. Благодирова,
З.М. Дышлевая, Е.В. Скоробогатова, Е.Е. Курникова, А.А. Масчан, А.Г. Румянцев
ФНКЦ детской гематологии, онкологии и иммунологии МЗиСР РФ, Москва*

Ключевые слова: пуповинная кровь, гемопоэтические стволовые клетки, трансплантация.

Введение

Аллогенная трансплантация гемопоэтических стволовых клеток (ТГСК) в настоящее время является общепринятым методом лечения значительного количества онкологических и незлокачественных заболеваний. С каждым годом число проводимых ТГСК увеличивается, также растет и перечень патологий, поддающихся излечению с помощью данной методики. К сожалению, вероятность обнаружения HLA-совместимого родственного донора в стандартной популяции не превышает 25–30%. Несмотря на то, что число потенциальных добровольных доноров костного мозга, включенных в международные регистры, в настоящее время превышает 9 млн человек, вероятность нахождения HLA-идентичного неродственного донора для пациента, принадлежащего к европеоидной расе, составляет 50–80%, при этом срок, необходимый для проведения неродственной трансплантации, нередко превышает 3–4 месяца [1]. До настоящего времени уровень ранней летальности у реципиентов аллогенной ТГСК неприемлемо высок, что связано как с висцеральной токсичностью терапии (идиопатический пневмонит, веноокклюзивная болезнь печени), так и с разнообразными инфекциями, развивающимися в результате тяжелой иммуносупрессии. Кроме того, проведение аллогенной трансплантации (в первую очередь – неродственной) ассоциировано со значительной вероятностью развития тяжелой острой «реакции трансплантат–против–хозяина» (оРТПХ), являющейся основной причиной гибели больных после проведения ТГСК.

Традиционным источником стволовых клеток, используемых при проведении аллогенной трансплантации, является костный мозг и/или G-КСФ–мобилизованные стволовые клетки периферической крови. В работах Knutson et al. [2] и Broxmeyer et al. [3] впервые было показано наличие большого числа примитивных и коммитированных предшественников гемопоэза в пуповинной крови (ПК), а также способность клеток, выделенных из пуповинной крови, репопулировать костный мозг и приводить к восстановлению гемопоэза после проведения трансплантации. Несмотря на невысокое абсолютное количество ядродержащих клеток, относительно большое количество CD34⁺ клеток в пуповинной крови в 10 раз превосходит их содержание в костном мозге здорового человека, более того, клетки–предшественники, выделенные из пуповинной крови, обладают повышенной пролиферативной способностью. Кроме повышенной пролиферативной активности, клетки пуповинной крови характеризуются уникальными иммунологическими характерис-

тиками. Большинство иммунокомпетентных клеток, содержащихся в ПК, имеют незрелый фенотип (сниженное абсолютное содержание CD4⁺, CD8⁺, CD3⁺ Т-клеток, повышенное содержание CD45RA⁺ клеток), характеризующий их низкую иммуногенную активность. Лимфоциты ПК характеризуются значительно меньшей пролиферативной и цитотоксической активностью в ответ на антигенную стимуляцию, а также значительно сниженной цитокин–продуцирующей активностью [4–8]. Немаловажно и то, что заготовка ПК является абсолютно безопасной манипуляцией для донора, а широкое развитие банков пуповинной крови во всем мире привело к накоплению значительного количества образцов, готовых к использованию в целях трансплантации. [9]

С момента выполнения первой аллогенной трансплантации ПК от HLA-идентичного сиблинга больному анемией Фанкони в 1988 году [10] число проведенных ТГСК с использованием пуповинной крови, полученной от родственных и неродственных доноров, превысило 3500 [11].

По сравнению с другими источниками ГСК, пуповинная кровь имеет ряд неоспоримых преимуществ:

- наличие значительного количества криопрезервированных образцов позволяет существенно снизить время ожидания больного перед проведением ТГСК;
- низкая иммуногенность ПК позволяет существенно расширить пул потенциальных доноров за счет использования ПК, несовпадающей по 1 или 2 антигенам главного комплекса гистосовместимости;
- сниженная вероятность развития оРТПХ
- сниженный риск трансмиссии инфекций, обусловленных латентными вирусами (в первую очередь, вирус Эпштейна–Барра, цитомегаловирус (ЦМВ));

К недостаткам, связанным с использованием ПК при проведении ТГСК, следует отнести небольшое абсолютное содержание клеток–предшественников, что во многом обуславливает более широкое использование этого источника ГСК в педиатрической практике. Сниженное количество клеток – предшественников обуславливает более позднее приживление трансплантата, приводя к увеличению сроков госпитализации и росту числа инфекционных осложнений. Кроме того, иммунологическая «наивность» лимфоцитов ПК значительно повышает риск реактивации вирусных инфекций, в частности ЦМВ. Наконец, использование ПК делает практически невозможным проведение инфузий донорских лимфоцитов в случае рецидива основного заболевания или нарастания смешанного химеризма.

Характеристика пациентов

С 1997 по 2005 годы в отделении Трансплантации костного мозга ФНКЦ детской гематологии, онкологии и иммунологии было выполнено шесть трансплантаций ПК детям в возрасте от 2 до 14 лет. Данные о больных, и характеристика проведенных трансплантаций представлены в таблице. Трое больных страдали врожденным синдромом недостаточности костномозгового кроветворения (анемия Фанкони), в двух случаях трансплантация была выполнена у больных хроническим миелолейкозом (ХМЛ), в одном случае – у больной с острым недифференцированным лейкозом. В пяти случаях трансплантация проводилась от HLA-идентичного родственного донора, в одном – от 4/6 HLA-идентичного неродственного донора. В качестве источника гемопоэтических стволовых клеток в 3 случаях использовалась только ПК, в 3 случаях – комбинация ПК и костного мозга (вследствие низкого абсолютного содержания ядросодержащих клеток в ПК). Все больные получали стандартную антимикробную профилактику, в период индуцированной аплазии кроветворения все пациенты находились в ламинарных боксах с принудительной подачей HEPA-фильтрованного воздуха. В качестве режима кондиционирования у больных с ХМЛ использовались комбинации бусульфана 16 мг/кг, Ara-C – 12000 мг/м² и мельфалана 120 мг/м² в одном и бусульфана 16 мг/кг + циклофосфамид 120 мг/кг в другом случае. Больная, получившая ТГСК от неродственного донора в качестве режима кондиционирования получала комбинацию бусульфана 10 мг/кг + тиофосфамид 750 мг/м² + циклофосфамид 150 мг/кг + АТГ (АТГАМ) 90 мг/кг. Учитывая повышенную чувствительность клеток у больных с анемией Фанкони к алкилирующим агентам, эта группа больных получала модифицированное кондиционирование со сниженной токсичностью. В качестве кондиционирования использовалась комбинация бусульфана 4–6 мг/кг и флударабина 150 мг/кг. Для усиления иммуносупрессивного эффекта эти пациенты также получали АТГ (АТГАМ, «Пфайзер») в суммарной дозе 90 мг/кг. Для профилактики развития оРТПХ все больные получали циклоспорин А (ЦсА) в дозе 1–3 мг/кг в/в. У 4 больных в комбинации с ЦсА использовался короткий курс метотрексата 5–10 мг/м², 2 больных также получали микофенолат мофетил (Селлсепт, «Ф. Хоффманн-Ля Рош») в дозе 30 мг/кг. Все больные получали заместительные трансфузии компонентов крови для поддержания уровней гемоглобина > 80 г/л и уровня тромбоцитов более 20×10⁹/мкл. В случае развития фебрильной нейтропении все больные получали комбинированную терапию антибактериальными и противогрибковыми препаратами широкого спектра действия.

Средний объем заготовленной ПК составлял 90 мл (50–160 мл). Среднее количество ядросодержащих клеток, трансплантированных больным, составляло 10⁸/кг массы тела (0,7–1,4), среднее содержание мононуклеаров составляло 10⁸/кг массы тела (0,3–0,6).

Результаты

Приживление трансплантата было зарегистрировано у всех больных. Средний срок восстановления гранулоцитопоза (гранулоциты периферической крови > 0,5×10⁹/л в течение 3 последовательных дней) составил 24 дня (13–38 дней). Восстановление тромбоцитопоза (тромбоциты > 50×10⁹/л без сопутствующих трансфузий) достигнуто у 4 пациентов в среднем к 28 дню (18–44 дней).

Развитие оРТПХ отмечено в 5 случаях, при этом тяжелая оРТПХ (>II степени) отмечена в 3 случаях. Все больные, у которых отмечено развитие оРТПХ, получали терапию стероидами (метилпреднизолон) в дозе 2–5 мг/кг. В двух случаях отмечено развитие стероид-рефрактерной оРТПХ

III–IV степени тяжести, послужившей основной причиной гибели двух больных на 52 и 130 дни после проведения ТГСК.

Развитие хронической РТПХ отмечено у 2 больных, в обоих случаях она носила локализованную форму и разрешилась в результате стандартного иммуносупрессивного лечения.

В настоящее время 4 из 6 больных, перенесших ТГСК живы и находятся в ремиссии основного заболевания. У всех больных отмечается нормальное функционирование трансплантата и восстановление функции иммунной системы.

Обсуждение

За последние 10 лет использование ПК в качестве нового источника ГСК при проведении аллогенной трансплантации нашло широкое применение как в педиатрической, так и во взрослой практике. Доступность и безопасность получения, низкая иммуногенность и достаточно высокая пролиферативная способность клеток, содержащихся в ПК, делают ее, на первый взгляд, идеальным источником ГСК. Однако, при оценке результатов проведения аллогенных трансплантаций ПК были выявлены значительные отличия в кинетике восстановления гемопоэза, оказавшие негативное влияние на общие результаты проведенного лечения. Невысокое абсолютное содержание стволовых клеток в ПК требует значительно большего времени для восстановления нормального гемопоэза после проведения ТГСК. Трансплантация ПК приводит к значительно более позднему приживлению трансплантата по сравнению со стандартными источниками ГСК (костный мозг, стволовые клетки периферической крови). Средний срок восстановления гранулоцитопоза при трансплантации ПК и стволовых клеток периферической крови составляет 28 и 15 дней соответственно. Еще более значительные отличия выявляются при сравнении сроков восстановления тромбоцитопоза (48 и 16 дней соответственно) [12, 13]. В группе пролеченных пациентов нами также было отмечено удлинение сроков аплазии, несмотря на комбинированное использование ПК и костного мозга в трех случаях. Отсроченное приживление трансплантата в большинстве случаев приводит к увеличению частоты развития инфекционных осложнений и не может не компромитировать окончательные результаты проведения трансплантации. По данным Barker et al. отдаленные результаты проведения трансплантации ПК не отличались в лучшую сторону от результатов ТГСК с использованием стандартных источников стволовых клеток, не смотря на снижение частоты развития оРТПХ [14]. При использовании ПК необходимо строго учитывать абсолютное количество содержащихся в образце клеток-предшественников. Критериями адекватности дозы переливаемых при проведении ТГСК клеток ПК служат: содержание ядросодержащих клеток не менее 3,7×10⁷/кг массы тела реципиента, содержание CD34⁺ клеток не менее 1,5×10⁵/кг массы реципиента [15, 16]. Стремление соответствовать данным критериям во многих случаях приводит к невозможности использования ПК при проведении трансплантации пациентам со значительной массой тела.

Еще одним существенным недостатком применения ПК в качестве субстрата при проведении ТГСК служит относительно высокий риск трансмиссии генетически детерминированных заболеваний.

Уникальная иммунологическая незрелость клеток, содержащихся в ПК, приводит к снижению частоты развития оРТПХ, основного фактора, влияющего на исход проведения ТГСК в настоящее время [17]. Однако у больных, перенесших ТГСК по поводу онкогематологических заболеваний, феномен оРТПХ неотделим от эффекта «трансплантат-против-лейкемии». Сниженная иммунная активность

клеток ПК в отношении иммунокомпетентных клеток реципиента приводит к увеличению частоты развития рецидивов основного заболевания. Другим важным недостатком использования ПК для проведения аллогенных неродственных трансплантаций служит невозможность проведения клеточной иммунотерапии для коррекции смешанного химеризма и раннего лечения развившегося рецидива.

В то же время необходимо отметить, что риск развития оРТПХ при проведении трансплантации ПК не является пренебрежимо низким. Из 6 наших больных, признаки оРТПХ отмечались у 4 пациентов, а в двух случаях рефрактерное

течение оРТПХ явилось непосредственной причиной гибели больных.

Использование ПК в качестве источника ГСК может служить разумной альтернативой другим источникам ГСК. В первую очередь, это касается пациентов раннего возраста, нуждающихся в проведении неродственной трансплантации и не имеющих потенциального донора, либо страдающих агрессивными заболеваниями, не позволяющими проводить длительный поиск совместимого органа [18]. Развитие новых методик, направленных на проведение экспансии клеток ПК, сможет еще более расширить спектр показаний к проведению таких трансплантаций.

Таблица. Характеристика пациентов, перенесших ТГСК

Пациент	1	2	3	4	5	6
Пол	ж	ж	ж	ж	м	ж
Возраст на момент ТГСК, лет	5	10	13	2	14	5
Диагноз	ХМЛ, II хроническая фаза	АФ	ХМЛ, II хроническая фаза	ОЛ, рефрактерное течение	АФ	АФ
Режим кондиционирования	Бу+Ara-C+L-Pam	Бу+Цф+АТГ	Бу+Цф	Бу+Тиот+Цф+АТГ	Бу+Флю+АТГ	Бу+Флю+АТГ
Профилактика острой РТПХ	ЦсА+Мтх	ЦсА	ЦсА+Мтх	ЦсА+Мтх	ЦсА+селлсепт+Мтх	ЦсА+селлсепт+Мтх
Тип донора	6/6 сибс	6/6 сибс	6/6 сибс	4/6 неродств	6/6 сибс	6/6 сибс
Трансплантат	ПК	ПК+КМ	ПК+КМ	ПК	ПК+КМ	ПК
Объем ПК, мл	50	130	85	50	90	140
НК, $\times 10^8/\text{кг}$	0,7	ПК – 0,2 КМ – 0,8	ПК – 0,3 КМ – 1,1	1,0	ПК – 0,5 КМ – 0,8	1,16
МНК, $\times 10^8/\text{кг}$	0,3	ПК – 0,16 КМ – 0,3	ПК – 0,1 КМ – 0,5	0,5	–	0,8
Приживление, дни	+35	+23	+16	+19	+13	+38
Острая РТПХ	III	IV	II	IV	–	II
Хроническая РТПХ	+	Н/а	–	Н/а	–	+
Исход	Жив	Умер +130 день оРТПХ IV ст	Жив	Умер +52 день оРТПХ IV ст	Жив	Жив

ЛИТЕРАТУРА:

1. Armitage J. Medical progress: bone marrow transplantation. N. Eng. J. Med. 1994; 330: 827–38.
2. Knudtzon S. In vitro growth of granulocytic colonies from circulating cells in human cord blood. Blood 1974; 43: 357–61.
3. Broxmeyer H.E., Douglas G.W., Hangoc G. et al. Human umbilical cord blood as a potential source of transplantable hematopoietic stem/progenitor cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1989; 86: 3828–32.
4. Christensen R.D., Harper T.E., Rothstein G. Granulocytemacrophage progenitor cells in term and preterm neonates. J. Pediatr. 1986; 109: 1047–51.
5. Nakahata T., Ogawa M. Hemopoietic colony-forming cells in umbilical cord blood with extensive capability to generate mono- and multipotential hemopoietic progenitors. J. Clin. Invest. 1982; 70: 1324–8.
6. Han P., Hodge G., Story C. et al. Phenotypic analysis of functional T-lymphocyte subtypes and natural killer cells in human cord blood: relevance to umbilical cord blood transplantation. Br. J. Haematol. 1995; 89: 733–40.

7. Cardoso A.A., Li M.L., Batard P. et al. Human umbilical cord blood CD34⁺ cell purification with high yield of early progenitors. J. Hematother. 1993; 2: 275–9.
8. Broxmeyer H.E., Hangoc G., Cooper S. et al. Growth characteristics and expansion of human umbilical cord blood and estimation of its potential for transplantation in adults. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1992; 89: 4109–13.
9. Rubinstein P., Dobrila L., Rosenfield R.E. et al. Processing and cryopreservation of placental/umbilical cord blood for unrelated bone marrow reconstitution. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1995; 92: 10119–22.
10. Gluckman E., Broxmeyer H.A., Auerbach A.D. 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: 1174–8.
11. Wernet P. The Netcord inventory and use [Netcord web site]. <https://www.netcord.org/inventory.gif>.
12. Wagner J.E., Kernan N.A., Steinbuch M. et al. Allogeneic sibling umbilical-cord-blood transplantation in children with malignant and non-malignant disease. Lancet 1995; 346: 214–9.

13. Gluckman E. Current status of umbilical cord blood hematopoietic stem cells transplantation. *Exp. Hematol.* 2000; 28: 1197–205.

14. Barker J.N., Davies S.M., DeFor T. et al. Survival after transplantation of unrelated donor umbilical cord blood is comparable to that of human leukocyte antigen-matched unrelated donor bone marrow: results of a matched-pair analysis. *Blood* 2001; 97: 2957–61.

15. Rocha V., Chastang C., Souillet G. et al. Related cord blood transplants: the Eurocord experience from 78 transplants. Eurocord Transplant Group. *Bone Marrow Transplant.* 1998; 21 (Suppl. 3): S59–S62.

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. Rocha V., Wagner J.E. Jr, Sobocinski K.A. et al. Graft-versus-host disease in children who have received a cord-blood or bone marrow transplant from an HLA-identical sibling. Eurocord and International Bone Marrow Transplant Registry Working Committee on Alternative Donor and Stem Cell Sources. *N. Engl. J. Med.* 2000; 342: 1846–54.

18. Gluckman E., Rocha V., Chevreton S. et al. Factors associated with outcome if unrelated cord blood transplant: guidelines for donor choice. An. Eurocord study. *Blood* 2002; 100 (Suppl. 1): 642a.