

Опыт работы Самарского регистра доноров кроветворных клеток

О.В. Тюмина, Д.Ю. Ключников, С.Е. Волчков, Л.М. Трусова
Клинический центр клеточных технологий, Самара

Experience of Samara hematopoietic cells donor registry
O.V. Tyumina, D.Y. Klyuchnikov, S.E. Volchkov, L.M. Trusova
Clinical Centre of Cell Technologies, Samara

Трансплантация аллогенных гемопоэтических стволовых клеток костного мозга и пуповинной крови применяется для лечения онкологических и иммунных заболеваний в мировой практике со второй половины прошлого века, но, несмотря на это, по-прежнему главной проблемой остается поиск совместимого донора. Для решения этой проблемы по всему миру были созданы регистры потенциальных доноров кроветворных клеток, включающие в свой состав банки пуповинной крови. В 2010 г. в Самаре на базе ГБУЗСО «Клинический центр клеточных технологий» был организован регистр потенциальных доноров кроветворных клеток. В его состав вошли единицы пуповинной крови из Самарского банка пуповинной крови и доноры кроветворных клеток из нескольких областей Российской Федерации. На сегодняшний день в составе регистра насчитывается более 5000 единиц пуповинной крови и 5000 потенциальных доноров кроветворных клеток. За время работы регистра из Самарского банка 44 единицы пуповинной крови были переданы в Российские и международные трансплантационные центры для проведения неродственных трансплантаций. По полученным результатам общая выживаемость пациентов после трансплантации кроветворных клеток пуповинной крови составила 65%. В связи с ростом онкогематологических заболеваний в РФ очень остро стоит вопрос о создании единого национального регистра доноров кроветворных клеток.

Ключевые слова: гемопоэтические стволовые клетки, трансплантация, регистры доноров костного мозга.

Первая успешная неродственная трансплантация костного мозга была проведена в 1973 г. в Нью-Йорке ребенку, страдающему иммунодефицитом. В 1979 году была проведена первая успешная трансплантация кроветворных клеток костного мозга пациенту с острым лимфолейкозом. С тех пор прошло более 30 лет и трансплантация аллогенных гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) костного мозга и пуповинной крови стала мировой практикой [1, 2]. По данным некоммерческой организации Международной сети трансплантаций костного мозга (WBMТ) в 2012 г. был зафиксирован 1 миллион трансплантаций ГСК по всему миру [3]. В России количество трансплантаций ГСК не соответствует потребностям, что связано не только с недостаточностью финансирования, но и с отсутствием возможности эффективного поиска неродственных доноров. Нужно отметить, что, несмотря на острую потребность в донорах кроветворных клеток, в России нет единого национального регистра, в отличие от многих других стран. Отсутствие законодательной регуляции деятельности регистров, невозможность в государ-

Transplantation of allogenic hematopoietic stem cells used for treatment of oncological and immune diseases during the late 1970s. Despite of that the matched donor search is the main problem in this field as before. To resolve this problem the bone marrow donor registries were established around the world. In 2010 Bone marrow donor registry (BMDR) was established in Clinical Centre of Cell Technologies. BMDR includes adult donors from many regions of Russia and cord blood units (CBUs) from Samara cord blood bank. At the present day, there are more than 5000 CBUs and 5000 donors. During the work of the registry 44 CBUs were handed to Russian and international transplant centers. In according with received results, the survival rate was about 65%. In relation with increase of oncohematological diseases in Russia the development of national bone marrow donor registry is extremely important.

Key words: hematopoietic stem cells, transplantation, bone marrow donor registry.

ственных учреждениях создавать отделения по набору доноров кроветворных клеток со штатными местами и бюджетным финансированием ограничивает развитие регистров в РФ. Существующие регистры либо частные, либо организованы на внебюджетные средства, и, соответственно, ведущие локальную деятельность, т.е. только в рамках своих медицинских учреждений, городов или областей. Развитие таких регистров сильно ограничено, в связи с чем среди них едва ли можно найти хоть один регистр с количеством А-В-DRB1 типированных доноров кроветворных клеток более 5000. Невысокое количество доноров, отсутствие координации между отдельными регистрами значительно снижают эффективность поиска. Несколько лучше обстоят дела с регистрами, в состав которых входят образцы пуповинной крови, увеличивая общее количество кроветворных клеток до более приемлемых цифр. С другой стороны, вопрос не только в количестве потенциальных доноров кроветворных клеток в регистрах по всей России, но и в использовании донорского материала. Возможным решением проблемы стала бы организация

e-mail: dir@cordbank.ru

единого национального регистра, который бы взял на себя функцию консолидации отдельных регистров в единую информационную сеть с целью обеспечения эффективного поиска совместимых доноров кроветворных клеток.

В 2010 г. ГБУЗ Самарской области «Клинический центр клеточных технологий» и Самарская областная общественная организация помощи детям, страдающим онкогематологическими заболеваниями «Виктория», учредили Некоммерческое партнерство «Регистр доноров кроветворных клеток и публичных банков пуповинной крови» (далее Регистр), который размещается на площадях Клинического центра клеточных технологий. Основная задача, которая была поставлена перед Регистром – обеспечение эффективного поиска совместимых доноров ГСК костного мозга и единиц пуповинной крови (ЕПК) для нужд онкогематологической службы. В настоящее время Регистр имеет в своем составе единственный в России банк пуповинной крови, вошедший в международную ассоциацию банков пуповинной крови Net Cord. Регистр доноров активно сотрудничает с Покровским банком стволовых клеток (Санкт-Петербург), ГБУЗ «Оренбургская станция переливания крови» (Оренбург), благотворительным фондом «Карельский регистр неродственных доноров гемопоэтических стволовых клеток» (Петрозаводск) и многими трансплантационными центрами в России и за рубежом. Регистр входит в международную систему по поиску доноров Bone Marrow Donors Worldwide (BMDW) и является полноправным членом всемирной ассоциации по донорству костного мозга World Marrow Donor Association (WMDA).

Материал и методы

Согласно рекомендации всемирной ассоциации по донорству костного мозга в состав Регистра входят доноры в возрасте от 18 до 50 лет, не страдающие гемотрансмиссивными, тяжелыми соматическими и психическими заболеваниями [4]. Основными принципами донорства кроветворных клеток костного мозга являются: добровольность, безвозмездность и анонимность. Все доноры на момент вступления в регистр заполняют форму информированного согласия. Сейчас Регистр включает в себя более 5000 доноров кроветворных клеток костного мозга из Самарской, Оренбургской, Саратовской, Московской областей и Карельского регистра.

Заготовка пуповинной крови проводилась в родильных домах г. Самары после подписания добровольного информированного согласия беременными женщинами. Было заготовлено 10648 донорских образцов ПК и проведены исследования на наличие следующих серологических маркеров: HIV-1 и -2Ag/Ab, Anti-HBcor, HBs-Ag, Anti-HCV, Anti-CMV, Anti-Toxoplasma gondii, Anti-HSV-1 и -2, RW. Исследования проводили на иммуноферментных анализаторах AxSym (Abbott, США) и Architect 1000i (Abbott, США). Бактериологические исследования осуществлялись в аккредитованной лаборатории на оборудовании BACTEC™ (BD, США). Гематологические исследования проводились на гематологическом анализаторе Pentra 60C+ (ABX, Франция), анализ ГСК и оценка их жизнеспособности на проточном цитофлюориметре FACS Canto (BD, США). Обработка крови осуществлялась в чистых помещениях класса Б или ISO 5, согласно OCT 42-510-98 и ISO 14644-1,

соответственно. Выделение клеток осуществляли двумя методами: двойным центрифугированием с гидроксипроцеллозагелем и автоматизированным методом на сепараторе клеток Serax (Biosafe, Швеция). Замораживание и хранение ЕПК проводили на автоматизированном комплексе Bioarchive® (Thermogenesis, США). Транспортировка образцов осуществлялась в Сосуде Дьюара сухого типа Cryoshipper XC (MVE, США) согласно требованиям IATA № A152.

Определение антигенов тканевой совместимости (HLA) доноров костного мозга и ЕПК осуществлялось в аккредитованной Европейской федерацией иммуногенетики (EFI) лаборатории молекулярно-генетическими методами SSO (Sequence Specific Oligonucleotides) и SSP (Sequence Specific Primers) на проточном флюориметре Luminex X100 (Luminex, США).

В работе банка пуповинной крови и Регистра доноров использованы стандарты и рекомендации следующих международных ассоциаций и обществ: World Marrow Donor Association (WMDA), Bone Marrow Donors Worldwide (BMDW), Net Cord, Foundation for the Accreditation of Cellular Therapy (FACT), European Federation for Immunogenetics.

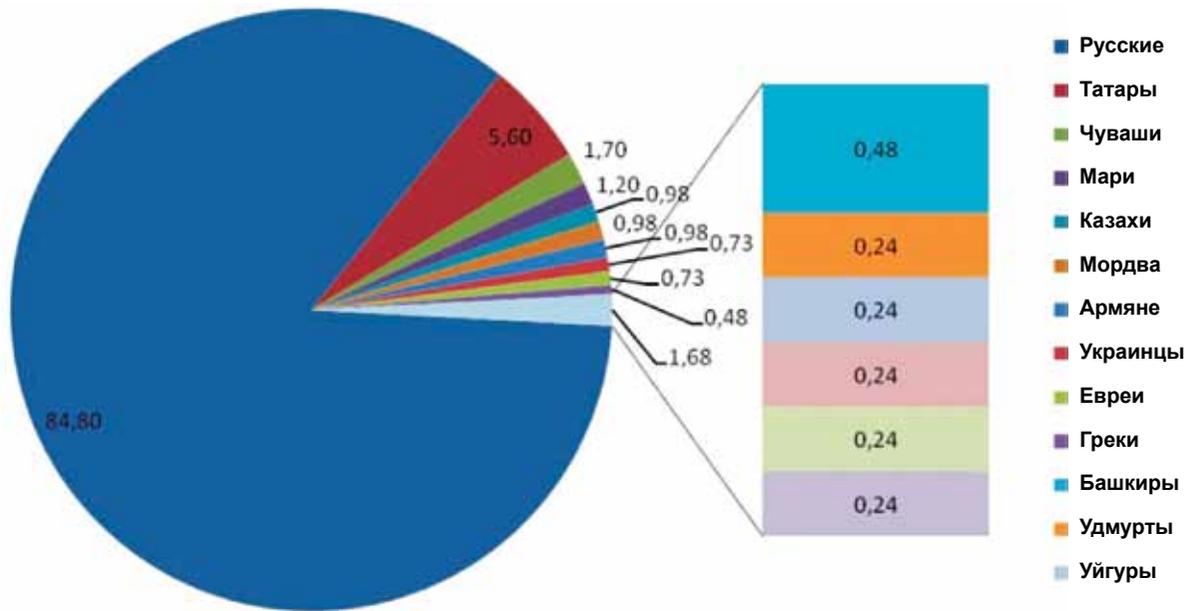
Результаты исследований частоты встречаемости HLA-типов были подвергнуты статистической обработке методами параметрической и непараметрической статистики с использованием программ Statistica 6.0 и MS Office Excel 2003. Выявленные закономерности и связи изучаемых параметров между группами и признаками были значимыми при вероятности безошибочного прогноза $p = 95\%$ и более ($p < 0,05$).

Результаты и обсуждение

По причине высокой полиморфности генов главного комплекса гистосовместимости существует чрезвычайно большое количество HLA-типов. На сегодняшний день по HLA-A насчитывается 1571 антиген, по HLA-B – 2156, по HLA-C – 1252, по HLA-DRB1 – 1030, по HLA-DQB1 – 137 [5]. В нашей стране с ее богатой историей проживает более 200 национальностей [6], в связи с этим население России характеризуется очень большим разнообразием по HLA-типам. На сегодняшний день Регистр включает в себя доноров многих национальностей (рис.).

Соотношение мужчин/женщин составляет 49% и 51%, а средний возраст потенциального донора в Регистре составляет 32,9 лет.

Для банка пуповинной крови на основании нормативных документов РФ и стандартов международных сообществ Net Cord и FACT нами были установлены следующие характеристики ЕПК для клинического применения: негативные маркеры на HIV-1 и -2 Ag/Ab, Anti-HBcor, HBs-Ag, Anti-HCV, Anti-CMV, Anti-Toxoplasma gondii, Anti-HSV-1 и -2, RW, стерильность по отношению к гемокультурам, анаэробной флоре и грибам рода кандиды. Кроме того, чистый объем пуповинной крови до выделения ядродержащих клеток – не менее 80 мл, количество живых CD34⁺-клеток не менее $1,6 \times 10^8$, количество живых CD34⁺-клеток не менее $1,6 \times 10^6$. Средние показатели клеточности готовых для клинического применения образцов пуповинной крови, находящихся на хранении в Самарском банке, составляют: Le – $15,7 \pm 2,5 \times 10^8$, Lym – $5,0 \pm 1,5 \times 10^8$, CD34⁺-клетки – $4,9 \times 10^6 \pm 2,8$.



Национальный состав Регистра (n = 409)

На базе Клинического центра было проведено исследование HLA-типов образцов пуповинной крови и доноров костного мозга, по результатам которого были выявлены наиболее часто встречающиеся HLA-

аллели и A-B-DRB1 гаплотипы на высоком уровне разрешения (табл. 1 и 2). Наиболее распространенные HLA-типы доноров Регистра и ЕПК Самарского банка пуповинной крови совпадают.

Таблица 1. Наиболее частые HLA аллели пуповинной крови и доноров кроветворных клеток (n = 3971)

№	HLA-A, (% встречаемости)	HLA-B, (% встречаемости)	HLA-DRB1, (% встречаемости)
1	02:01 (24,0)	07:02 (10,6)	07:01 (13,2)
2	03:01 (14,0)	18:01 (8,4)	15:01 (11,0)
3	01:01 (11,2)	35:01 (7,1)	01:01 (10,8)
4	24:02 (10,3)	08:01 (6,6)	03:01 (7,9)
5	26:01 (5,3)	44:02 (5,8)	13:01 (7,8)
6	11:01 (5,3)	13:02 (5,6)	11:01 (6,3)
7	25:01 (5,1)	51:01 (4,4)	11:04 (5,0)
8	68:01 (3,2)	15:01 (4,3)	16:01 (4,2)
9	32:01 (3,1)	38:01 (4,0)	04:01 (3,2)
10	23:01 (2,6)	27:05 (3,9)	13:03 (2,9)

Таблица 2. Наиболее часто встречающиеся гаплотипы (n = 3971)

№	Гаплотип	Частота встречаемости, %
1	A*01:01~B*08:01~DRB1*03:01	3,6
2	A*03:01~B*07:02~DRB1*15:01	2,5
3	A*03:01~B*35:01~DRB1*01:01	2,4
4	A*02:01~B*13:02~DRB1*07:01	1,4
5	A*02:01~B*07:02~DRB1*15:01	1,3
6	A*25:01~B*18:01~DRB1*15:01	1,2
7	A*30:01~B*13:02~DRB1*07:01	1,0
8	A*02:01~B*18:01~DRB1*11:04	1,0
9	A*33:01~B*14:02~DRB1*01:02	0,9
10	A*23:01~B*44:03~DRB1*07:01	0,8

При обработке данных было выявлено 63 аллельных варианта локуса А, 107 — локуса В и 100 — локуса DRB1. Среди наиболее частых аллелей локуса А были 02:01, 03:01, 01:01; локуса В — 07:02, 18:01, 35:01; локуса DRB1 — 07:01, 15:01, 01:01.

Самые распространенные гаплотипы, выявленные среди ЕПК Самарского банка и доноров идентичны таковым среди северо-американской популяции доноров регистра Be The Match-USA (США) [7].

Анализ медицинской технологии, мета-анализ, рандомизированные контролируемые клинические исследования убедительно доказали более высокую клиническую эффективность метода трансплантации кроветворных клеток по сравнению с химиотерапией у пациентов с острыми лейкозами [8–12]. В зависимости от типа лейкоза, от возраста пациента, от группы риска 5-летняя общая выживаемость после трансплантации аллогенных ГСК колеблется, по данным этих исследований, от 48% до 53%, а при проведении стандартной химиотерапии — от 28% до 45%.

С 2008 года регистр передал из Самарского банка 44 единицы пуповинной крови. 8 ЕПК были переданы в иностранные трансплантационные центры. Возраст пациентов, получивших клеточный трансплантат, находился в пределах от 6 мес. до 69 лет. География распространения образцов включала Россию (Екатеринбург, Санкт-Петербург, Москва), Европу (Австрия, Норвегия, Дания, Польша, Великобритания, Голландия, Белоруссия) и Юго-Западную Азию (Израиль). За время работы Регистра пока не было задействовано взрослых доноров, что вероятнее всего связано с небольшим количеством имеющих типированных доноров, высокой сложностью синхронизации по времени процедуры сбора кроветворных клеток у донора с началом химиотерапии реципиента и сложностью в транспортировке костного мозга на большие расстояния.

Заболевания, при которых проводились трансплантации ПК: острые лейкозы (11), хронический миелолейкоз (1), миелодиспластический синдром (1), лимфома (1), первичный X-сцепленный лим-

фопротиферативный синдром (1), первичный семейный гемофагоцитарный лимфогистиоцитоз (1), первичный иммунодефицит (1) синдром Вискотта — Олдриджа (1), синдром «голых» лимфоцитов (2); все пациенты — высокой группы риска.

По результатам 20 трансплантаций ЕПК приживление трансплантата было зарегистрировано у 18 пациентов (90%). Острая реакция «трансплантат против хозяина» (РТПХ) I-II степени развилась у 2 (10%) пациентов, случаев развития тяжелой РТПХ отмечено не было. Проявления хронической РТПХ выявлены у 1 (5%) пациента. Смертность к 100 сут. после трансплантации составила 35% (7 пациентов погибли от инфекционных осложнений). Рецидив заболевания был отмечен в 2 (10%) случаях, неприживление трансплантата — в 2 (10%) случаях. Общая выживаемость после трансплантаций пуповинной крови по оценке результатов составила 65%, с медианой наблюдения 150 сут.

Заключение

Главным источником получения ГСК является костный мозг, дополнительным — пуповинная кровь. Сегодня пуповинная кровь применяется для нужд трансплантологии ГСК в экстренных, срочных случаях, когда время не позволяет провести дополнительное обследование и сбор костного мозга у взрослого донора. Поэтому очень важным является момент наличия в составе регистров неродственных доноров ГСК банков пуповинной крови.

Разнообразие HLA-типов свидетельствует в пользу развития регистров, донорских центров и банков пуповинной крови по всей территории РФ. Многонациональный состав регистра многократно увеличивает эффективность поиска донора для минорных национальностей, проживающих в Российской Федерации. На сегодняшний момент в составе Регистра имеется около 10 000 потенциальных доноров костного мозга и ЕПК.

Развитие донорства пуповинной крови и костного мозга в России активно движется по пути создания национального регистра.

ЛИТЕРАТУРА:

1. 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. *New Eng. J. Med.* 1989; 321(17): 1174–78.
2. Donnal T.E. Bone Marrow Transplantation — past, present and future. Nobel Lecture 1990.
3. http://bmdw.org/fileadmin/Press_Releases/Press_release_final.pdf
4. http://www.worldmarrow.org/fileadmin/Committees/STDC/20120101-STDC-WMDA_Standards.pdf
5. <http://hla.alleles.org/nomenclature/stats.html>
6. http://www.perepis-2010.ru/results_of_the_census/tab5.xls
7. Maiers M., Gragert L., Klitz W. High-resolution HLA alleles and haplotypes in the United States population. *Hum. Immunol.* 2007; 68(9): 779–88.
8. Ashfaq K., Yahaya I., Hyde C. et al. Clinical effectiveness and cost-effectiveness of stem cell transplantation in the management of acute leukaemia: a systematic review. *Health Technol. Assess* 2010; 14(54): 11–30.
9. Cornelissen J.J., van Putten W.L., Verdonck L.F. et al. Results of a HOVON/SAKK donor versus no-donor analysis of

myeloablative HLA-identical sibling stem cell transplantation in first remission acute myeloid leukemia in young and middle-aged adults: benefits for whom? *Blood* 2007; 109(9): 3658–66.

10. Yanada M., Matsuo K., Suzuki T. et al. Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation as part of postremission therapy improves survival for adult patients with high-risk acute lymphoblastic leukemia: a metaanalysis. *Cancer* 2006; 106(12): 2657–63.

11. Goldstone A.H., Richards S.M., Lazarus H.M. et al. In adults with standard-risk acute lymphoblastic leukemia, the greatest benefit is achieved from a matched sibling allogeneic transplantation in first complete remission, and an autologous transplantation is less effective than conventional consolidation/maintenance chemotherapy in all patients: final results of the International ALL Trial. *Blood*; 111(4): 1827–33.

12. Vey N., Thomas X., Picard C., Kovascovic T. et al. Allogeneic stem cell transplantation improves the outcome of adults with t(1;19)/E2A-PBX1 and t(4;11)/MLL-AF4 positive B-cell acute lymphoblastic leukemia: results of the prospective multicenter LALA-94 study. *Leukemia* 2006; 20(12): 2155–61.

Поступила 08.05.2013