

На правах рукописи

Пирожков Иван Александрович

**НАУЧНО-ОРГАНИЗАЦИОННЫЕ И МЕДИКО-ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ
АСПЕКТЫ СОЗДАНИЯ БАНКА СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК
ПУПОВИННОЙ КРОВИ С ГЕНОТИПОМ *CCR5 DELTA 32/DELTA 32***

14.01.21 – гематология и переливание крови

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Санкт-Петербург – 2016

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении «Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии Федерального медико-биологического агентства» (ФГБУ РосНИИГТ ФМБА России)

Научные руководители:

доктор медицинских наук, профессор **Чечеткин Александр Викторович**

доктор медицинских наук

Смолянинов Александр Борисович

Официальные оппоненты:

доктор медицинских наук, профессор **Зубаровская Людмила Степановна**, руководитель отдела детской онкологии, гематологии и трансплантологии НИИ детской онкологии, гематологии и трансплантологии им. Р.М. Горбачёвой, ГБОУ ВПО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

доктор медицинских наук, профессор **Калинина Наталья Михайловна**, главный научный сотрудник отдела лабораторной диагностики ФГБУ «Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины им. А.М. Никифорова» МЧС России

Ведущая организация:

ФГБУ «Национальный медико-хирургический центр имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита состоится « 27 » июня 2016 г. в _____ часов на заседании диссертационного Совета Д 208.074.01 при ФГБУ РосНИИГТ ФМБА России по адресу 191024, г. Санкт-Петербург, ул. 2-я Советская, д.16.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБУ РосНИИГТ ФМБА России.

Автореферат разослан « ____ » _____ 2016 г.

Ученый секретарь диссертационного совета

доктор медицинских наук

Глазанова Татьяна Валентиновна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Трансплантация гемопоэтических стволовых клеток (ТГСК) в настоящее время широко используется в клинической практике для лечения ряда гематологических [Румянцев А.Г. и соавт., 2003; Абдулкадыров К.М. и соавт., 2004; Burt R.K. et al., 2008; Brunstein C.G. et al., 2010] и некоторых других заболеваний [Burt R.K. et al., 2003; Moore J.J. et al., 2003; Marmont A.M. et al., 2008; Karussis D. et al., 2013]. Применяется как родственная (аутологичная), так и неродственная (аллогенная) ТГСК [Савченко В.Г., 2010; Афанасьев Б.В., 2011; Грицаев С.В. и соавт., 2015].

Эффективность проведения неродственной ТГСК во многом зависит от адекватного подбора пары донор – реципиент по системе HLA (human leucocyte antigen) [Бубнова Л.Н. и соавт., 2001; Bray R.A. et al., 2008; Афанасьев Б.В. и соавт., 2015].

Для подбора HLA-совместимых доноров гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) используются данные отечественных и международных регистров [Бубнова Л.Н. и соавт., 2008; Тюмина О.В. и соавт., 2013; Логинова М.А. и соавт., 2014]. Увеличить вероятность нахождения соответствующего по HLA-системе образца ГСК может создание хранилищ стволовых клеток, получаемых из плацентарной крови [Абдулкадыров К.М. и соавт., 2004; Румянцев С.А. и соавт., 2010].

В настоящее время ГСК для трансплантации выделяют из костного мозга, периферической крови и пуповинной крови. Установлено, что ГСК пуповинной крови имеют большую способность к пролиферации и более короткий клеточный цикл, чем взрослые клетки [Румянцев С.А. и соавт., 2011; Broxmeyer H.E., 2011]. Также для этих клеток характерна пониженная экспрессия HLA-антигенов, при этом сокращается риск развития реакции «трансплантат против хозяина» (РТПХ). Эта особенность клеток пуповинной крови создаёт возможность для проведения ТГСК с большим количеством несовпадений по HLA-антигенам [Мамаев Н.Н. и соавт., 2008].

Кроме соблюдения условий гистосовместимости большое значение имеет качество заготовленных образцов. Одним из методов определения пролиферативного потенциала ГСК может служить измерение длины теломер [Карпова Н.С. и соавт., 2011; Карпова Н.С. и соавт., 2012].

Наряду с применением ТГСК при лечении онкогематологических заболеваний и других состояний, существует возможность использования в клинической практике ГСК с генотипом *CCR5 delta 32/delta 32* [Hutter G. et al., 2009]. Установлено, что гомозиготные носители мутации *CCR5 delta 32* обладают практически полной резистентностью к инфицированию ВИЧ-1 [Dragic T. et al., 1996]. При наличии аллеля *CCR5 delta 32* в гетерозиготном состоянии значительно уменьшается риск инфицирования ВИЧ-1 [Боринская С.А. и соавт., 2012]. Кроме того, к настоящему времени известны положительные эффекты наличия аллельного полиморфизма *CCR5 delta 32* при различных патологических состояниях. Так, у обладателей делеционного

аллеля *CCR5 delta 32* отмечена меньшая вероятность развития и более доброкачественное течение иммунопатологических процессов. Исследователи сообщают о благоприятном клиническом течении и лучшем прогнозе заболевания у пациентов с ревматоидным артритом и рассеянным склерозом при наличии мутации *CCR5 delta 32* [Garred P. et al., 1998; Kantor R. et al., 2003]. Российские учёные обнаружили, что снижение экспрессии белка *CCR5* на мембранах опухолевых и стромальных клеток у гематологических пациентов с генотипом *CCR5 delta 32/delta 32* вызывает снижение их ответа на провоспалительные хемокины, что может являться положительным фактором, ограничивающим распространение опухоли при лимфопролиферативных заболеваниях [Воропаева Е.Н. и соавт., 2011]. Реципиенты солидных органов, гомозиготные по мутации *CCR5 delta 32*, демонстрируют лучшую функцию и более длительную выживаемость трансплантата почки и печени [Fischereder M. et al., 2001; Heidenhain C. et al., 2009]. Вследствие блокады рецептора *CCR5* также подавляется аллоантиген-специфичная пролиферация Т-лимфоцитов, что снижает риск развития РТПХ и реакции отторжения после аллогенной ТГСК [Bogunia-Kubik K. et al., 2006; Schnickel G.T. et al., 2008]. Имеется положительный опыт применения ГСК пуповинной крови с генотипом *CCR5 delta 32/delta 32* при трансплантации онкогематологическим пациентам с сопутствующей ВИЧ-инфекцией [Petz L. et al, 2013]. Показана перспективность создания национального регистра доноров ГСК с генотипом *CCR5 delta 32/delta 32* [Зубов В.В. и соавт., 2014].

Степень разработанности темы

В настоящее время нет данных о распространённости аллельного полиморфизма *CCR5 delta 32* среди образцов пуповинной крови в Северо-Западном регионе Российской Федерации. Методы обследования криоконсервированных образцов, находящихся на хранении в банках пуповинной крови, на наличие аллеля *CCR5 delta 32* не разработаны. Отсутствуют сведения о распределении HLA-аллелей в клетках образцов пуповинной крови с генотипом *CCR5 delta 32* в Северо-Западном регионе Российской Федерации. Недостаточно данных о качестве образцов пуповинной крови с генотипом *CCR5 delta 32* как источника ГСК.

Учитывая современное развитие клеточных технологий в медицине представляется актуальным проведение отдельного исследования, посвящённого научно-организационным аспектам создания банка пуповинной крови с *CCR5 delta 32/delta 32* генотипом.

Цель работы – исследовать организационные, медицинские и технологические особенности выявления образцов пуповинной крови с генотипом *CCR5 delta 32* и разработать требования к созданию банка стволовых клеток пуповинной крови с генотипом *CCR5 delta 32/delta 32*.

Задачи исследования:

1. Разработать методику выявления образцов пуповинной крови с генотипом *CCR5 delta 32/delta 32* и провести ее апробацию при обследовании банка стволовых клеток пуповинной крови.

2. Изучить распространенность аллеля *CCR5 delta 32* в банке пуповинной крови в Северо-Западном регионе Российской Федерации в гомозиготном и гетерозиготном состоянии.

3. Установить особенности распределения HLA-фенотипа клеток пуповинной крови с мутацией *CCR5 delta 32* в гомозиготном состоянии.

4. Исследовать показатели качества и биологической полноценности клеточных концентратов пуповинной крови с генотипом *CCR5 delta 32/delta 32*.

5. Разработать требования к организации банка стволовых клеток пуповинной крови с генотипом *CCR5 delta 32/delta 32*.

Научная новизна работы

Впервые проведено комплексное научное исследование по созданию банка стволовых клеток пуповинной крови с генотипом *CCR5 delta 32/delta 32*. Впервые установлено, что частота встречаемости аллельного полиморфизма *CCR5 delta 32* среди образцов пуповинной крови в Северо-Западном регионе Российской Федерации в гомозиготном состоянии составляет 1,0%, в гетерозиготном состоянии – 18%. Получены новые данные о распределении HLA-фенотипа среди клеток образцов пуповинной крови с аллельным полиморфизмом *CCR5 delta 32* в гомозиготном состоянии. Проанализирован пролиферативный потенциал клеток пуповинной крови с генотипом *CCR5 delta 32/delta 32* с помощью исследования длины теломер. Выполнено научное обоснование организационно-технологических аспектов создания регионального банка пуповинной крови с генотипом *CCR5 delta 32/delta 32*.

Теоретическая и практическая значимость

Разработана, апробирована и внедрена в клиническую практику методика определения полиморфизма *CCR5 delta 32* в образцах криоконсервированной пуповинной крови, находящейся на хранении в банке стволовых клеток. Установлена встречаемость аллеля *CCR5 delta 32* среди образцов пуповинной крови в Северо-Западном регионе Российской Федерации в гомозиготном и гетерозиготном состоянии. В процессе работы было показано, что частота встречаемости HLA-фенотипа *CCR5 delta 32/delta 32* клеток пуповинной крови коррелирует с данными по распределению HLA-аллелей в Северо-Западном регионе Российской Федерации. Выявлено, что пролиферативный потенциал и качество концентрата стволовых клеток пуповинной крови с генотипом *CCR5 delta 32/delta 32* соответствует требованиям национальных и международных стандартов. В результате проведенного исследования создан банк стволовых клеток пуповинной крови с аллельным полиморфизмом *CCR5 delta 32*, включающий 761 концентрат стволовых клеток, пригодных для клинического использования.

Методология и методы исследования

Методология исследования основывается на системном подходе к изучаемой проблеме, комплексном анализе особенностей создания банка стволовых клеток пуповинной крови с генотипом *CCR5 delta 32/delta 32*. В работе использованы молекулярно-биологические, иммуногенетические, гематологические, иммунологические, статистические методы исследования.

Положения, выносимые на защиту

1. Разработанная методика детекции полиморфизма гена *CCR5* в клетках пуповинной крови позволяет выявлять наличие мутации *CCR5 delta 32* в гомозиготном и гетерозиготном состоянии и сформировать банк криоконсервированных стволовых клеток пуповинной крови с генотипом *CCR5 delta 32/delta 32*.

2. Частота встречаемости аллельного полиморфизма *CCR5 delta 32* среди образцов пуповинной крови в Северо-Западном регионе Российской Федерации в гомозиготном состоянии составляет 1,0%, в гетерозиготном состоянии – 18%. Клетки образцов пуповинной крови с генотипом *CCR5 delta 32/delta 32* характеризуются наличием наиболее распространённых на Северо-Западе России HLA-аллелей локусов A, B и DRB1.

3. Пролиферативный потенциал, определенный на основании длины теломера, и качество концентрата стволовых клеток пуповинной крови с генотипом *CCR5 delta 32/delta 32* не отличаются от аналогичных показателей концентрата клеток с нормальным вариантом гена *CCR5* и соответствуют требованиям национальных и международных стандартов.

4. Основными требованиями к созданию банка стволовых клеток пуповинной крови с генотипом *CCR5 delta 32/delta 32* являются: выявление в образцах с помощью молекулярно-биологических методов аллельного полиморфизма гена *CCR5 delta 32*, обеспечение инфекционной безопасности образцов крови, иммуногенетическое типирование HLA-аллелей в локусах A, B и DRB1, определение пролиферативного потенциала и качества образцов пуповинной крови, использование информационных технологий учета результатов тестирования.

Внедрение результатов исследования в практику

Результаты исследования внедрены в научно-исследовательскую работу НИЛ клеточных технологий ГБОУ ВПО «Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова». Практические рекомендации используются в деятельности Покровского банка стволовых клеток (Санкт-Петербург). Положения диссертации применяются в образовательной деятельности ФГБУ «Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии Федерального медико-биологического агентства».

Степень достоверности и апробация работы

Степень достоверности проведенного исследования определяется объемом обследованных образцов пуповинной крови, адекватным задачам набором оцениваемых показателей, применением современных иммуногенетических, молекулярно-биологических, гематологических и статистических методов.

Результаты диссертационной работы представлены на научно-практической конференции с международным участием «Здоровье – основа человеческого потенциала: проблемы и пути их решения» (Санкт-Петербург, 2012), международной научно-практической конференции «Регенеративная

терапия и клеточные технологии. Трансплантация стволовых клеток в онкогематологии. Биотехнологии и бактериофаги в современной медицине» (Санкт-Петербург, 2013), Всероссийской научно-практической конференции «Клиническая лабораторная диагностика в гематологии и службе крови» (Санкт-Петербург, 2014), Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Современные высокотехнологичные методы лечения и реабилитации на всех этапах медицинской помощи» (Санкт-Петербург, 2014), Третьем Российском Конгрессе с международным участием «Молекулярные основы клинической медицины – возможное и реальное» (Санкт-Петербург, 2015), III Национальном Конгрессе «Дискуссионные вопросы современного акушерства» (Санкт-Петербург, 2015), Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Актуальные вопросы иммуногенетики и тканевого типирования» (Санкт-Петербург, 2015).

Материалы диссертации изложены в 13 научных публикациях, в том числе в 7 статьях, опубликованных в рецензируемых научных журналах, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией Министерства образования и науки Российской Федерации для публикации основных научных результатов диссертационных исследований.

На основании выполнения работы получен патент № 2563172 Российская Федерация, МПК G 01 N 33/68. Способ определения аллельного полиморфизма *CCR5 delta 32*/ Пирожков И.А., Смолянинов А.Б., Котелевская А.А.; заявитель и патентообладатель общество с ограниченной ответственностью «Покровский банк стволовых клеток» и гос. бюджетное образовательное учреждение высшего проф. образования «Северо-Западный гос. мед. университет им. И.И. Мечникова» Министерства здравоохранения РФ. – № 2014145497/15; заявл. 12.11.14; опубл. 20.09.15, Бюл. № 26. – 6 с.: ил.

Личный вклад автора

Личное участие соискателя в выполнении диссертационного исследования состояло в формулировании цели и задач исследования, систематизации данных отечественной и зарубежной литературы по проблематике создания банка стволовых клеток пуповинной крови с генотипом *CCR5 delta 32/delta 32*. Автор непосредственно участвовал в отборе образцов пуповинной крови, осуществлял проведение лабораторных исследований образцов пуповинной крови, анализ и обобщение результатов, проводил статистический анализ полученных данных, подготавливал материалы к публикациям.

Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на 122 страницах машинописного текста и содержит введение, обзор литературы, описание материалов и методов исследования, 3 главы собственных исследований, заключение, выводы, практические рекомендации и список литературы, который включает 48 отечественных и 161 зарубежных источников. Диссертация иллюстрирована 16 таблицами и 20 рисунками.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Были обследованы 4000 образцов пуповинной крови, собранных в учреждениях здравоохранения Санкт-Петербурга, Ленинградской области, а также других субъектов Северо-Западного федерального округа Российской Федерации в период с 2009 по 2015 гг. Образцы пуповинной крови находились на хранении в Покровском банке стволовых клеток. Образцы пуповинной крови были заготовлены после срочных родов естественным путём или после операции кесарева сечения при наличии информированного согласия роженицы. Пуповинную кровь собирали в стерильные закрытые донорские системы однократного применения для сбора крови объёмом до 350 мл с гемоконсервантом ЦФДА-1 (Green Cross Medical Science Corporation, Южная Корея). Длительность хранения образцов пуповинной крови составила от 2 до 6 лет.

Образцы доставляли в Покровский банк стволовых клеток, где осуществлялась предварительная обработка – образцы взвешивали, определяли концентрацию эритроцитов, общее количество ядросодержащих клеток (ОЯК), гематокрит, проводили тестирование образцов на инфекционные агенты. Выделение лейкоцитарной фракции выполняли с применением автоматического клеточного сепаратора Sepax S100 (Biosafe, Швейцария) или методом двойного центрифугирования на центрифуге Rotanta 460 RS (Hettich, Германия).

Замораживание концентрата клеток выполняли в программируемом замораживателе Cryo 560-16 (Planer, Великобритания) с применением криопротектора ДМСО/Декстран 40 (Pall, Великобритания) в конечной концентрации 10%. Далее криокоробку с образцом клеточного концентрата помещали на длительное хранение в криохранилище с жидким азотом LS6000 (Taylor Wharton, США).

Скрининговое исследование образцов на наличие *CCR5 delta 32* аллеля проводили методом полимеразной цепной реакции (ПЦР). Геномная ДНК была выделена из образцов пуповинной крови с использованием наборов Protrans DNA BOX 500 (Protrans, Германия) или AxyPrep Blood Genomic DNA Miniprep Kit (Axygen, США). Концентрация и чистота ДНК в растворе измерены на микропланшетном автоматическом анализаторе Infiniti F2000 (Tecan, Австрия).

HLA-типирование образцов пуповинной крови осуществляли методом SSP (sequence-specific priming). Амплификацию с использованием циклерплатных систем Protrans HLA-A*, -B*, -DRB1* (Protrans, Германия) проводили с использованием амплификатора My Cycler Version 1.065 (Bio-Rad, США). Детекцию продуктов амплификации производили с помощью системы документации геля Gel Doc 2000 XR (Bio-Rad, США).

Измерение длины теломер клеток пуповинной крови с генотипом *CCR5 delta 32/delta 32* проведено методом ПЦР в реальном времени с помощью амплификатора для ПЦР в реальном времени Bio-Rad CFX96 (США).

Детекцию ОЯК выполняли на гематологическом анализаторе Coulter AcT diff 2 (Beckman Coulter, США).

Жизнеспособность клеток концентрата пуповинной крови и количество CD34+ клеток определяли с использованием проточного цитофлуориметра Cytomics FC500 (Beckman Coulter, США) с программным обеспечением СХР и длиной волны лазерного излучения 488 нм. Применяли набор реагентов Stem-Kit (Beckman Coulter, США).

Частоту встречаемости аллеля *CCR5 delta 32* подсчитывали по итогам генотипирования образцов пуповинной крови. Определение абсолютного и относительного количества аллелей генов HLA в локусах HLA-A, -B, -DRB1 выполнено путем прямого подсчета полученных результатов. Фенотипическая частота встречаемости HLA-антигена (A) была рассчитана по формуле $A = n / N$ (n – число образцов, в фенотипе которых есть данный антиген, N – общее число образцов). Достоверность различий по частоте встречаемости HLA-аллелей оценена с применением критерия Пирсона (χ^2). Абсолютная длина теломерных повторов определена с помощью стандартной кривой для каждого образца после проведения ПЦР в реальном времени и нормирования полученных данных на референсный образец (ген 36B4). Результаты обработаны с применением описательной статистики – были определены среднее значение M , стандартное отклонение σ , медиана, максимальное и минимальное значения, нижний квартиль, верхний квартиль. Нормальность распределения была проанализирована с помощью критерия Шапиро-Уилка. Для данных, не подчиняющихся закону нормального распределения, достоверность различий была определена с применением непараметрического U-критерия Манна-Уитни при уровне значимости $p < 0,05$. Для значений, отвечающих нормальному распределению, достоверность различий была определена с использованием параметрического t-критерия Стьюдента при уровне значимости $p < 0,05$. Степень близости аппроксимации экспериментальных данных выбранной функцией была оценена с помощью коэффициента детерминации (R^2). Корреляционный анализ проведён с использованием линейного коэффициента корреляции Пирсона (R). Статистическая обработка данных проведена с использованием программы EXCEL 2010 и программного обеспечения для статистического анализа данных StatPlus Pro 5.9.8.5.

Результаты исследования

На первом этапе выполнения исследования была разработана и апробирована методика определения аллельного полиморфизма *CCR5 delta 32* (патент № 2563172, Российская Федерация, МПК G 01 N 33/68 «Способ определения аллельного полиморфизма *CCR5 delta 32*»).

Геномная ДНК была выделена из образцов пуповинной крови, хранящихся в Покровском банке стволовых клеток при температуре -70°C . Значения концентрации ДНК в образцах составляли в пределах 50 – 180 нг/мкл.

Существенными отличительными признаками определения аллельного полиморфизма *CCR5 delta 32* являлись:

1) Использовали прямой (F – forward) и обратный (R – reverse) праймеры:

F: TGTGTTTGCGTCTCTCCCA

R: CTCTTCTTCTCATTTTCGACACCG

2) ПЦР проводили при 94°C в течение 5 минут, затем проводили 35 циклов, каждый из которых состоял из 3-х этапов: 94°C – 30 секунд, 56°C – 40 секунд, 72°C – 40 секунд; далее следовали 2 цикла продолжительностью 10 минут при 72°C и 5 минут при 15°C.

3) Длина ПЦР фрагментов составляла 224 п.н. при нормальном варианте гена и 192 п.н. при наличии генотипа *CCR5 delta 32/delta 32*.

Результаты молекулярно-генетического исследования наличия аллеля *CCR5 delta 32* были подтверждены с помощью прямого секвенирования с использованием автоматического секвенатора SEQ8000 (Beckman Coulter, США).

В результате исследования были выявлены 40 образцов с генотипом *CCR5 delta 32/delta 32*, что составило 1% от общего числа обследованных образцов пуповинной крови. В 721 образцах выявлено наличие полиморфизма *CCR5 delta 32* в гетерозиготном состоянии или 18 от общего числа образцов (табл. 1).

Таблица 1 – Частота выявления аллеля *CCR5 delta 32* в обследованных образцах пуповинной крови

Генотип	Число образцов	
	Абсолютное количество	%
<i>CCR5/CCR5</i>	3239	81,0
<i>CCR5/CCR5 delta 32</i>	721	18,0
<i>CCR5 delta 32/delta 32</i>	40	1,0
Всего	4000	100

Следовательно, частота выявления аллеля *CCR5 delta 32* в образцах пуповинной крови, полученных от жителей Северо-Западного региона Российской Федерации, составила в гомозиготном состоянии – 1,0%, в гетерозиготном состоянии – 18,0%.

Было выполнено HLA-типирование пуповинной крови с генотипом *CCR5 delta 32/delta 32* в трёх локусах – HLA-A, HLA-B, HLA-DRB1. Проведён сравнительный анализ распределения HLA-аллелей среди 40 образцов пуповинной крови с генотипом *CCR5 delta 32/delta 32* и среди 920 образцов пуповинной крови с нормальным вариантом гена *CCR5*. Было определено, что наиболее распространёнными аллелями среди образцов пуповинной крови, имеющих генотип *CCR5 delta 32/delta 32*, и с нормальным вариантом гена *CCR5* были: HLA-A*01, HLA-A*02, HLA-A*03, HLA-B*07, HLA-B*35, HLA-B*44, HLA-DRB1*07, HLA-DRB1*13, HLA-DRB1*15 (табл. 2, 3). Полученные в процессе типирования данные совпадают с информацией о частоте

встречаемости HLA-аллелей в Северо-Западном регионе Российской Федерации [<http://www.allelefreqencies.net>].

Таблица 2 – Частота встречаемости наиболее распространённых HLA-аллелей среди клеток пуповинной крови с генотипом *CCR5 delta 32/delta 32*

Локус	Наиболее распространённый аллель	Частота встречаемости аллеля, %
HLA-A	*01	22,50
	*02	47,50
	*03	45,00
HLA-B	*07	30,00
	*35	20,00
	*44	20,00
HLA-DRB1	*07	15,00
	*13	30,00
	*15	25,00

Таблица 3 – Частота встречаемости наиболее распространённых HLA-аллелей среди клеток пуповинной крови с нормальным вариантом гена *CCR5*

Локус	Наиболее распространённый аллель	Частота встречаемости аллеля, %
HLA-A	*01	26,20
	*02	59,35
	*03	31,63
HLA-B	*07	24,78
	*35	24,02
	*44	17,39
HLA-DRB1	*07	29,57
	*13	27,39
	*15	28,59

Однако при анализе локуса HLA-DRB1 выявлена достоверно большая частота встречаемости аллеля HLA-DRB1*07 в группе с нормальным вариантом гена *CCR5* по сравнению с группой с генотипом *CCR5 delta 32/delta 32* ($\chi^2 = 4,69$; $p < 0,05$) (табл. 4).

Таблица 4 – Достоверность различий частоты встречаемости HLA-аллелей в образцах пуповинной крови с генотипом *CCR5 delta 32/delta 32* и с нормальным вариантом гена *CCR5*

Локус	Наиболее распространённый аллель	χ^2
HLA-A	*01	0,50
	*02	2,21
	*03	3,45
HLA-B	*07	0,31
	*35	0,60
	*44	0,001
HLA-DRB1	*07	4,69
	*13	0,08
	*15	0,24

Примечание: критическое значение χ^2 Пирсона – 3,841

Для оценки качества образцов пуповинной крови с генотипом *CCR5 delta 32/delta 32* и его пригодности для трансплантации был изучен клеточный состав и наиболее важные для трансплантации характеристики клеточного концентрата пуповинной крови. Были исследованы 40 образцов пуповинной крови с генотипом *CCR5 delta 32/delta 32* и 920 HLA-типированных образцов пуповинной крови с нормальным вариантом гена *CCR5*.

ОЯК в образцах пуповинной крови с генотипом *CCR5 delta 32/delta 32* не превышало значение аналогичного показателя образцов пуповинной крови с нормальным вариантом гена *CCR5* (табл. 5).

Таблица 5 – ОЯК в клеточных концентратах пуповинной крови, $\times 10^6$

Генотип	<i>CCR5/CCR5</i>	<i>CCR5 delta 32/delta 32</i>
Среднее	1693,42	1758,82
Медиана	1577,23	1636,33
Нижн. квартиль	1314,16	1542,99
Верхн. квартиль	1889,33	1725,13
Минимум	491,46	1501,85
Максимум	5113,77	3759,20
Стандартное отклонение	552,85	410,31

Расчёт U-критерия Манна-Уитни не показал достоверность различий для значения ОЯК в обеих группах сравнения (U критерий = 21867; $p > 0,05$).

Содержание CD34+ клеток в образцах пуповинной крови с генотипом *CCR5 delta 32/delta 32* по сравнению с образцами с нормальным вариантом гена *CCR5* достоверных различий не имело (табл. 6). Статистический анализ по Манну-Уитни не выявил статистически значимых различий между группами сравнения (U критерий = 13264; $p > 0,05$).

Таблица 6 – Общее количество CD 34+ клеток в образцах пуповинной крови, $\times 10^6$

Генотип	<i>CCR5/CCR5</i>	<i>CCR5 delta 32/delta 32</i>
Среднее	4,37	3,45
Медиана	4,08	2,88
Нижн. квартиль	2,90	1,98
Верхн. квартиль	5,70	5,16
Минимум	0,77	0,22
Максимум	12,87	9,78
Стандартное отклонение	1,95	2,24

При оценке жизнеспособности концентратов пуповинной крови с генотипом *CCR5 delta 32/delta 32* по сравнению с образцами с нормальным вариантом гена *CCR5* не было выявлено достоверных различий (табл. 7). Оценка достоверности различий двух выборок по Манну-Уитни показала, что полученное эмпирическое значение находится в зоне незначимости (U критерий = 25145; $p > 0,05$).

Таблица 7 – Жизнеспособность клеток пуповинной крови, %

Генотип	<i>CCR5/CCR5</i>	<i>CCR5 delta 32/delta 32</i>
Среднее	93,38	96,27
Медиана	95,30	97,35
Нижн. квартиль	90,75	93,90
Верхн. квартиль	97,42	98,83
Минимум	44,95	85,8
Максимум	99,2	99,85
Стандартное отклонение	5,75	3,30

Полученные результаты значений клеточных характеристик концентратов пуповинной крови соответствуют имеющимся данным исследований показателей качества пуповинной крови [Абдулкадыров К.М. и соавт., 2006; Иволгин Д.А. и соавт., 2012; Meyer T.P. et al., 2006; Rocha V. et al., 2009; Querol S. et al., 2010]. По данным рабочей группы Eurocord, рекомендованное значение ОЯК составляет $> 3 \times 10^7/\text{кг}$ при сборе пуповинной крови и $> 2 \times 10^7/\text{кг}$ при инфузии, рекомендованная концентрация CD34+ клеток составляет от 1,2 до $1,7 \times 10^5/\text{кг}$ [Gluckman E. et al., 2006].

Для оценки пролиферативного потенциала ГСК была использована методика измерения длины теломер методом ПЦР в реальном времени. Были исследованы 40 образцов пуповинной крови с генотипом *CCR5 delta 32/delta 32* и 283 образца пуповинной крови с нормальным вариантом гена *CCR5* (табл. 8). Установлено, что средняя длина теломер *CCR5 delta 32/delta 32* клеток пуповинной крови не отличалась от этого значения клеток с нормальным вариантом гена *CCR5* ($p > 0,05$). По литературным данным в норме средняя длина теломер клеток пуповинной крови составляет $10,4 \pm 1,9$ т.п.н. [Engelhardt M., 1997].

Таблица 8 – Длина теломер клеток пуповинной крови с нормальным вариантом гена *CCR5* и *CCR5 delta 32/delta 32* клеток пуповинной крови, т.п.н.

Генотип	<i>CCR5/CCR5</i>	<i>CCR5 delta 32/delta 32</i>
Среднее	10,58	10,11
Медиана	10,49	8,58
Нижн. квартиль	9,49	8,53
Верхн. квартиль	11,38	11,02
Минимум	5,60	8,26
Максимум	19,10	16,58
Стандартное отклонение	1,90	2,43

В процессе работы был проведен анализ возможностей использования различных организационных форм для создания банка стволовых клеток пуповинной крови с генотипом *CCR5 delta 32*: общественного банка, банка персонального хранения и гибридного банка стволовых клеток. Показано предпочтительное создание общественных и гибридных моделей банков стволовых клеток пуповинной крови с генотипом *CCR5 delta 32*. Качество образцов пуповинной крови в банке стволовых клеток с таким генотипом должно соответствовать национальным стандартам, определяемым Приказом МЗ РФ № 325 от 25 июля 2003 г. «О развитии клеточных технологий в Российской Федерации», и требованиям международных стандартов Eurocord

[Gluckman E. et al., 2004] и CIBMTR (Центр по международным исследованиям трансплантации крови и костного мозга) [Eapen M. et al., 2007].

В результате внедрения разработанного алгоритма и программы оценки качества на базе Покровского банка стволовых клеток был создан банк стволовых клеток пуповинной крови, содержащий 721 образец с генотипом *CCR5/CCR5 delta 32* и 40 образцов с генотипом *CCR5 delta 32/delta 32*, годных для клинического использования. Идентифицированные образцы были внесены в регистр стволовых клеток пуповинной крови с аллельным полиморфизмом *CCR5 delta 32* и доступны для трансплантационных центров. Существующая технология позволяет хранить такие образцы в течение длительного времени в замороженном состоянии и размораживать их по унифицированным программам без существенной потери качества и пролиферативного потенциала.

В процессе работы был предложен и внедрен алгоритм создания регистра *CCR5 delta 32/delta 32* образцов пуповинной крови (рис. 1).



Рисунок 1 – Алгоритм организации банка пуповинной крови с генотипом *CCR5 delta 32/delta 32*

При этом были разработаны требования к организации банка стволовых клеток пуповинной крови с генотипом *CCR5 delta 32/delta 32*.

Основные медицинские аспекты требований включали в себя вопросы выявления образцов пуповинной крови с генотипом *CCR5 delta 32/delta 32*, HLA-типирования и оценки качества концентратов стволовых клеток. Выявление образцов пуповинной крови с исследуемым генотипом целесообразно осуществлять в виде скрининговых исследований с использованием разработанной в данной работе и запатентованной методики. Основными требованиями к образцам пуповинной крови для их включения в регистр *CCR5 delta 32/delta 32* образцов пуповинной крови явились:

1. Наличие заполненной сопроводительной документации (акушерский анамнез, информированное согласие роженицы).

2. Время от момента сбора пуповинной крови до начала обработки не более 24 часов.

3. Отсутствие контаминации инфекционными агентами (в соответствии с Приказом Министерства здравоохранения Российской Федерации от 25 июля 2003 г. № 325 «О развитии клеточных технологий в Российской Федерации»).

4. Выявление мутации *CCR5 delta 32/delta 32* с помощью молекулярно-генетического метода.

Особенностями технологического обеспечения деятельности банка пуповинной крови с генотипом *CCR5 delta 32/delta 32* является внедрение современного медицинского оборудования и расходных материалов, позволяющих, прежде всего, осуществлять скрининговое исследование образцов на наличие мутации *CCR5 delta 32*. Подобное исследование возможно проводить на базе стандартно оснащённой молекулярно-генетической лаборатории.

Особенностью информационного обеспечения деятельности банка пуповинной крови с генотипом *CCR5 delta 32/delta 32* является возможность выделения электронной базы данных образцов с наличием такой мутации. Это достигается подключением к автоматизированной информационной системе рабочего места для проведения молекулярно-биологических исследований для выявления мутации гена *CCR5*, а также внесением в информационную систему сведений о результатах таких исследований. Это позволяет не только автоматизировать процесс поиска образцов пуповинной крови, снизить затраты времени на ведение медицинской документации, но и сформировать электронный регистр образцов пуповинной крови, имеющих генотип *CCR5 delta 32/delta 32*. Доступ к такому регистру осуществляется в соответствии с требованиями законодательства о защите персональных данных только авторизованными пользователями сети. При поступлении заявки на образец пуповинной крови, необходимый для трансплантации, информационная система позволяет в ранние сроки выбрать подходящий концентрат стволовых клеток, не только типированный по локусам HLA, но и на наличие мутации в гене *CCR5*. В течение выполнения работы в такую информационную систему были внесены данные о результатах исследования 4000 образцов пуповинной

крови. К моменту завершения исследования в информационной системе находились данные о 721 образцах с генотипом *CCR5/CCR5 delta 32* и 40 образцах с генотипом *CCR5 delta 32/CCR5 delta 32*.

По всем этапам скринингового исследования разработаны стандартные операционные процедуры и протоколы.

Таким образом, в результате выполнения работы была разработана методика выявления образцов пуповинной крови с генотипом *CCR5 delta 32/delta 32*, изучена распространенность аллеля *CCR5 delta 32* в банке пуповинной крови в Северо-Западном регионе Российской Федерации в гомозиготном и гетерозиготном состоянии, выявлены особенности распределения HLA-фенотипа клеток пуповинной крови с такой мутацией в гомозиготном состоянии и исследованы показатели их качества и биологической полноценности, а также обоснованы требования к организации банка стволовых клеток пуповинной крови с генотипом *CCR5 delta 32/delta 32*.

ВЫВОДЫ

1. Разработана, апробирована и запатентована методика для детекции аллельного полиморфизма гена *CCR5 delta 32*, позволяющая проводить скрининговое обследование образцов пуповинной крови банка стволовых клеток.

2. Мутация гена *CCR5 delta 32* в гомозиготном состоянии определяется в клетках 1,0% образцов пуповинной крови, в гетерозиготном состоянии – в 18% клеток образцов пуповинной крови, находящихся на хранении в банке стволовых клеток Северо-Западного региона Российской Федерации.

3. В образцах пуповинной крови с генотипом *CCR5 delta 32/delta 32* наиболее часто встречаются аллели HLA-A*01, HLA-A*02, HLA-A*03, HLA-B*07, HLA-B*35, HLA-B*44, HLA-DRB1*13, HLA-DRB1*15. При этом аллель HLA-DRB1*07 в группе с нормальным вариантом гена *CCR5* выявлялся чаще по сравнению с группой с генотипом *CCR5 delta 32/delta 32*.

4. В концентратах стволовых клеток пуповинной крови с генотипом *CCR5 delta 32/delta 32* среднее значение содержания ядродержащих клеток составило $1758,82 \times 10^6$, содержания CD34+ клеток – $3,45 \times 10^6$, жизнеспособность – 96,27%. При сопоставлении результатов исследования качественных характеристик клеточных концентратов пуповинной крови с генотипом *CCR5 delta 32/delta 32* и с нормальным вариантом гена *CCR5* статистически значимых различий не выявлено.

5. Сравнительное исследование длины теломер клеток пуповинной крови с нормальным вариантом гена *CCR5* и гомозигот с мутацией *CCR5 delta 32* показало нормальный пролиферативный потенциал клеток *CCR5 delta 32/delta 32* образцов пуповинной крови.

6. Разработанные алгоритмы обследования и обеспечения качества концентратов стволовых клеток позволили создать банк пуповинной крови,

доступный для проведения трансплантации гемопоэтических стволовых клеток с генотипом *CCR5 delta 32/delta 32*.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. При формировании банка стволовых клеток пуповинной крови следует предусмотреть обследование образцов крови на наличие мутации гена *CCR5 delta 32* для формирования банка хранения таких образцов.

2. Для детекции аллельного полиморфизма *CCR5 delta 32* в образцах пуповинной крови целесообразно использовать разработанную методику, заключающуюся в выделении ДНК из криоконсервированной пуповинной крови, проведении ПЦР с использованием праймеров F: TGTGTTTGC GTCTCTCCCA, R: CTCTTCTTCTCATTTTCGACACCG, соблюдения условий проведения реакции, детекции продукта реакции с использованием электрофореза.

3. При подборе совместимых по системе HLA образцов стволовых клеток пуповинной крови с генотипом *CCR5 delta 32* целесообразно учитывать региональные иммуногенетические особенности распределения HLA-фенотипов, в частности наиболее часто встречающиеся аллели локусов HLA-A, HLA-B, HLA-DRB1.

4. В качестве дополнительного контроля пролиферативного потенциала клеток концентрата пуповинной крови рекомендуется использовать метод определения длины теломера с помощью ПЦР в реальном времени.

СПИСОК НАУЧНЫХ РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Пирожков И.А. Полиморфизм *CCR5del32* и резистентность к инфицированию ВИЧ. Результаты молекулярно-генетического обследования образцов пуповинной крови общественного регистра доноров / И.А. Пирожков, Е.А. Котелевская, А.Б. Смолянинов // Здоровье – основа человеческого потенциала: проблемы и пути их решения. – 2012. – Т. 7, № 2. – С. 832 – 833.

2. Пирожков И.А. Выявление *CCR5-Δ32* гемопоэтических стволовых клеток пуповинной крови: возможности и перспективы для лечения пациентов с ВИЧ-инфекцией / И.А. Пирожков, М.А. Глебова, М.Д. Канаева, А.С. Хрупина, С.А. Смирнова, Д.А. Иволгин, А.Б. Смолянинов, Л. Петц // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия – 2013. – Т. 8, № 1. – С. 24 – 28.

3. Смолянинов А.Б. Перспективы трансплантации гемопоэтических стволовых клеток пуповинной крови для лечения ВИЧ-инфекции / А.Б. Смолянинов, А.В. Чечеткин, И.А. Пирожков, Д.А. Иволгин, А.С. Хрупина // Вестник Северо-Западного государственного медицинского университета им. И. И. Мечникова. – 2013. – Т. 5, № 3. – С. 7 – 13.

4. Пирожков И.А. Трансплантация стволовых клеток пуповинной крови и лечение ВИЧ-инфекции – новая возможность? / И.А. Пирожков, М.А. Глебова, М.Д. Канаева, А.С. Хрупина, С.А. Смирнова, Д.А. Иволгин, А.Б.

Смолянинов, Л. Петц // Вестник Санкт-Петербургского университета. – 2013. – Серия 11, № 4. – С. 194 – 201.

5. Пирожков И.А. Организация общественного регистра доноров пуповинной крови с генотипом CCR5 DELTA 32/DELTA 32 для лечения ВИЧ-инфекции / И.А. Пирожков, А.Б. Смолянинов, А.В. Чечеткин, Д.А. Иволгин, А.С. Хрупина // Здоровье – основа человеческого потенциала: проблемы и пути их решения. – 2013. – Т. 8, № 2. – С. 687 – 689.

6. Смолянинов А.Б. Терапевтические возможности трансплантации гемопоэтических стволовых клеток пуповинной крови при ВИЧ инфекции / А.Б. Смолянинов, А.В. Чечеткин, Е.В. Жаров, И.А. Пирожков, Д.А. Иволгин, А.С. Хрупина // АГ-инфо. – 2013. – Т. 4. – С. 3 – 7.

7. Смолянинов А.Б. Научно-организационные аспекты создания регистра доноров пуповинной крови с генотипом CCR5 DELTA32/DELTA32 для лечения ВИЧ-инфекции / А.Б. Смолянинов, А.В. Чечеткин, И.А. Пирожков, Д.А. Иволгин // Клеточная и органная трансплантология. – 2014. – Т. 2, № 1. – С. 34 – 38.

8. Смолянинов А.Б. Длина теломер хромосом у детей с муковисцидозом в различных возрастных группах / А.Б. Смолянинов, Ф.П. Романюк, Н.Д. Саймуродова, И.А. Пирожков // Вестник Северо-Западного государственного медицинского университета им. И.И. Мечникова. – 2014. – Т. 6. № 1. – С. 49 – 54.

9. Пирожков И.А. Организация общественного регистра доноров пуповинной крови с генотипом CCR5 delta 32/delta 32 для лечения ВИЧ-инфекции / И.А. Пирожков, А.Б. Смолянинов, А.В. Чечеткин, Д.А. Иволгин, А.С. Хрупина, Л. Петц // Вестник Санкт-Петербургского университета. – 2014. – Серия 11, № 2. – С. 207 – 215.

10. Пирожков И.А. Возможности применения гемопоэтических стволовых клеток пуповинной крови с генотипом CCR5 delta 32/delta 32 для лечения ВИЧ-инфекции / И.А. Пирожков, А.Б. Смолянинов, А.В. Чечеткин, Д.А. Иволгин // Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии. – 2014. – Т. 13, № 3. – С. 28 – 32.

11. Смолянинов А.Б. Маркеры инфекционных агентов в образцах пуповинной крови общественного регистра доноров / А.Б. Смолянинов, Д.А. Иволгин, И.И. Масленникова, О.В. Супильникова, И.А. Пирожков, А.Д. Крючкова // Журнал инфектологии. – 2014. – Т. 6, № 3. – С. 39 – 43.

12. Пирожков И.А. Научно-организационные аспекты создания регистра пуповинной крови с генотипом CCR5 delta 32/delta 32 для трансплантации гемопоэтических стволовых клеток / И.А. Пирожков, А.Б. Смолянинов, А.В. Чечеткин, Д.А. Иволгин // Трансфузиология. – 2014. – Т. 15, № 1. – С. 55 – 56.

13. Пирожков И.А. Полиморфизм гена CCR5 и резистентность к инфицированию ВИЧ. Молекулярно-генетическое обследование общественного регистра пуповинной крови / И.А. Пирожков, А.Б. Смолянинов,

А.В. Четкин, Д.А. Иволгин / Вестник гематологии. – 2015. – Т. 11, № 2. – С. 23 – 24.

ПАТЕНТ

Патент № 2563172 Российская Федерация, МПК G 01 N 33/68. Способ определения аллельного полиморфизма CCR5 delta 32/ Пирожков И.А., Смолянинов А.Б., Котелевская А.А.; заявитель и патентообладатель общество с ограниченной ответственностью «Покровский банк стволовых клеток» и гос. бюджетное образовательное учреждение высшего проф. образования «Северо-Западный гос. мед. университет им. И.И. Мечникова» Министерства здравоохранения РФ. – № 2014145497/15; заявл. 12.11.14; опубл. 20.09.15, Бюл. № 26. – 6 с.: ил.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

ВИЧ – вирус иммунодефицита человека

ГСК – гемопоэтическая стволовая клетка

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ДМСО – диметилсульфоксид

ОЯК – общее количество ядродержащих клеток

ПЦР – полимеразная цепная реакция

РТПХ – реакция «трансплантат против хозяина»

ТГСК – трансплантация гемопоэтических стволовых клеток

HLA – human leucocyte antigen (система лейкоцитарных антигенов)

ЦФДА – цитрат-фосфат-декстроза-аденин

CIBMTR – Center for International Blood and Marrow Transplant Research (Центр по международным исследованиям трансплантации крови и костного мозга)

SSP – sequence specific primer (сиквенс-специфичный праймер)