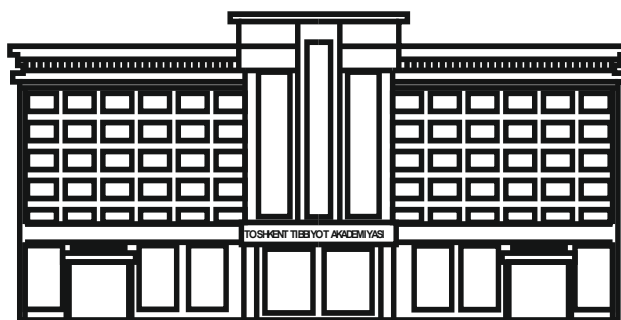


ЎЗБЕКИСТОН РЕСПУБЛИКАСИ СОҒЛИҚНИ САҚЛАШ ВАЗИРЛИГИ
ТОШКЕНТ ТИББИЁТ АКАДЕМИЯСИ

2021 №2

2011 йилдан чиқа бошлаган

TOSHKENT TIBBIYOT AKADEMIYASI
AХВОРОТНОМАСИ



ВЕСТНИК
ТАШКЕНТСКОЙ МЕДИЦИНСКОЙ АКАДЕМИИ

Тошкент

НЕОБХОДИМОСТЬ И ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ТРАНСПЛАНТАЦИИ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК В УЗБЕКИСТАНЕ

Эргашев У. Ю., Курязов А. М., Мустафакулов Г.И., Якубов Д.Р., Минавархуджаев Р.Р.

ЎЗБЕКИСТОНДА ЎЗАК ҲУЖАЙРА ТРАНСПЛАНТАЦИЯСИНИНГ ЗАРУРИЯТИ ВА ИСТИҚБОЛИ

Эргашев У.Ю., Курязов А.М., Мустафакулов Г.И., Якубов Д.Р., Минавархуджаев Р.Р.

THE NEED AND PROSPECTS FOR THE USE OF STEM CELL TRANSPLANTATION IN UZBEKISTAN

Ergashev U.Yu., Kuryazov A.M., Mustafakulov G.I., Yakubov D.R., Minavarkhudjayev P.P.

Ташкентская медицинская академия

Кейинги йилларда ўзак ҳужайраларни ўрганиш бўйича кенг қўламли ишлар олиб борилмоқда. Бу ишларда ўзак ҳужайраларнинг хусусиятлари, турлари, олиш ва сақлаш усуллари, уларни амалда қўллаш назарий ва амалий жихатдан ёритиб берилмоқда. Ўзак ҳужайраларни амалда қўллаш кўп касалликларни даволашда катта самара бермоқда. Ушбу мавзуда ўзак ҳужайраларнинг амалиётда қўлланилишининг ҳозирги ҳолати ва Ўзбекистон шароитида қўллаш истиқболлари тўғрисидаги фикрлар юритилган.

Калит сўзлар: киндик қони, йўлдош, трансплантация, истиқболи.

In recent years, tremendous work has been done on stem cell research. In an accessible form, data on the properties of stem cells, on their varieties both in the embryonic period and in the adult organism are disclosed. The use of stem cells isolated from umbilical cord blood of a human fetus has led to significant success in the treatment of cancer of the blood and a number of somatic diseases. The review presents the basics of the study of stem cells, methods of obtaining, storage, use in practical medicine and the prospects for their use in Uzbekistan.

Key words: umbilical cord blood, hematopoietic stem cells, transplantation, possibility.

В организме стволовые клетки служат основой для восстановления поврежденных клеток и тканей. В настоящее время эти возможности стволовых клеток используются в практической медицине при лечении многих тяжелых заболеваний. Основное место среди них занимают заболевания системы крови, различные онкологические заболевания, наследственные, нервно-мышечные, сердечные и аутоиммунные болезни [4,5,7-9]. В нашей республике этот способ лечения пока не нашел широкого применения. Больные, которым жизненно необходимо проведение процедуры трансплантации стволовых клеток, вынуждены лечиться в других странах.

Источники стволовых клеток. Основными источниками гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) являются костный мозг (КМ), периферическая кровь и плацентарная (пуповинная) кровь (ПК). Большинство ГСК находится в костном мозге, поэтому костный мозг является традиционным источником этих клеток для целей трансплантации. В Европе и Америке созданы регистры доноров костного мозга, которые добровольно готовы пожертвовать своим КМ для лечения больных, нуждающихся в замещении или восстановлении гемопоэтической ткани [16,24].

Получают костный мозг донора под наркозом, путём множественных пункций костей таза, грудины. При этом заготавливают около 1000 мл костного мозга. Этот метод используется более 30 лет. Его недостатками являются необходимость наркоза и возможность развития послеоперационных осложнений, хотя встречаются они редко. Из-за большой полиморфности системы HLA вероятность того, что неродственный донор костного мозга является HLA-совместимым, очень мала. Поиск подходящего донора КМ – дорогой и длительный путь, иногда пациент не доживает до трансплантации [24]. Важно отме-

тить, что у реципиентов по-прежнему сохраняется высокая частота развития тяжелых реакций трансплантат против хозяина (РТПХ), а при неродственных ТКМ данное осложнение может развиваться у 60-90% больных [25].

Гемопоэтические предшественники циркулируют и в периферической крови обычных людей в нормальном состоянии, хотя в очень небольшом количестве (около 0,5-5,0 СД 34+клеток на мл с очень большим стандартным отклонением). Для получения достаточного количества ГСК от донора проводится процедура для мобилизации стволовых клеток путем введения человеку специальных лекарств (факторов роста). Выделение ГСК осуществляется путем фракционирования клеток крови. Для этого фракционный аппарат подсоединяется к венам больного или донора и за 1-2 операции через них пропускают 10-20 л крови. Получение ГСК из периферической крови – также дорогой метод, так как он требует использования дорогостоящей аппаратуры и факторов роста [8,13,19,28]. Кроме того, использование аутологичного костного мозга и стволовых клеток периферической крови несет в себе потенциальную опасность – возможную контаминацию опухольными клетками при трансфузии [3,4].

В последние годы к наиболее важным потенциальным источникам ГСК относят пуповинную кровь [6,15,19]. Хотя среднее количество пуповинной крови, остающейся в плаценте после родов, относительно мало (50-150 мл), концентрация клеток предшественников является достаточной для успешного приживления трансплантата у детей и у некоторых взрослых [7]. Стволовые клетки из ПК заготавливают в момент рождения ребенка, подвергают тщательному обследованию, замораживанию, и в случаях их совместимости с каким-либо пациентом по-

антигенам главного комплекса совместимости-системе HLA, трансплантируют.

Особенности пуповинной крови как источника ГСК. В последние годы многочисленные исследования показали, что в пупочной вене новорожденного концентрация стволовых клеток относительно велика. Это связано с тем, что у новорожденных сохраняются элементы эмбрионального кроветворения, и сама плацента выделяет мощные стимуляторы этого процесса [10,12,17,20,33,37,38]. Общая концентрация ГСК в пуповинной крови сравнима с таковыми в костном мозге, но количество ранних клеток-предшественников статически значимо выше, чем в костном мозге [14,12,30,34].

ГСК дают начало зрелым клеткам крови гранулоцитам, моноцитам, мегакариоцитам и эритроцитам, поэтому они также называются колониеобразующими единицами (КОЕ) [15]. Количество КОЕ-ГМ и их пролиферативный потенциал в ПК значительно превосходят периферическую кровь взрослых даже после введения ростовых факторов [18]. В долгосрочных культурах клеток *in vitro* отмечается большая пролиферативная активность и жизнеспособность клеток ПК, чем костного мозга [4,22,27,29,39,41]. Известно также, что в ПК находятся предшественники мегакариоцитов [35,36].

Установлено, что лимфоидные клетки ПК менее иммунореактивны. Поэтому частичная несовместимость по антигенам HLA-системы при трансплантации ГСК допустима, а тяжелая РТПХ встречается реже, чем при ТКМ [11,31,42]. При этом приживляемость трансплантата ПК не ниже, чем КМ, даже при использовании меньшего количества вводимых гемопоэтических клеток из расчета на 1 кг массы тела больного. Стволовые клетки пуповинной крови могут использоваться для ауто- и аллогенной трансплантации.

Технология сбора и тестирование пуповинной крови. Сбор пуповинной крови осуществляется после рождения ребенка и пережатия пуповины: пуповина перерезается, кровь путем пункции пуповинной вены собирается в стерильный контейнер, содержащий антикоагулянт – раствор, предотвращающий свертывание крови. Это можно сделать, когда плацента еще находится в матке или даже уже рождена, поскольку в первые 30 минут после рождения кровь в плаценте и пуповине не свертывается.

В зависимости от времени перерезания пуповины и от других факторов, таких как масса тела новорожденного, срок беременности и длина пуповины, объем пуповинной крови может составлять в среднем 50-120 мл. Выделяют закрытый и открытый способы заготовки ПК [2,23]. При первом способе после рождения ребенка и пересечения пуповины, когда плацента находится еще в полости матки, иглой производят дренирование пупочной вены, кровь самотеком оттекает в трансфузионную систему. Пупочный канатик предварительно обрабатывают раствором йода или этилового спирта. При открытом способе забора пуповинной крови после рождения ребенка и отделения и рождения после-

да плаценту укладывают на специальную рамку с отверстием для пуповины плодовой поверхностью вниз. После обработки пупочного канатика пупочную вену также дренируют, и собирают кровь в систему с антикоагулянтом.

При закрытом способе сбора средний объем получаемой крови составляет 70-80 мл [2], при открытом – несколько меньше – 60-70 мл, при закрытом способе вероятность микробной контаминации несколько ниже [32]. Ряд авторов (Абдулкадыров К.М., Романенко Н.А., Старков Н.Н., 2000) предлагают использовать активную инфузию крови из вены пуповины шприцами, что, по их данным, позволяет увеличить объем получаемой крови до 90-95 мл.

А. Nadler и соавт. [36] сравнили три метода сбора ПК: 1) при помощи эксфузии крови непосредственно в контейнер (закрытый способ); 2) путем активной эксфузии крови шприцами с дальнейшим промыванием вен плаценты и одновременным дренированием крови в контейнер (открытый способ); 3) посредством активного извлечения крови шприцами и промывания через артерию пуповины с одновременной эксфузией в контейнер (полукрытый способ).

В первом случае они получали ПК в объеме $76,4 \pm 32,1$ мл, с содержанием лейкоцитов $0,5 \pm 3,6 \times 10^6$ /мл; во втором – $174,4 \pm 42,8$ мл и $8,8 \pm 3,4 \times 10$ лейкоцитов в мл; в третьем – $173,7 \pm 41,3$ мл и $9,3 \pm 3,8 \times 10$ лейкоцитов в мл крови. При использовании второго метода сбора имело место более частое инфицирование образцов ПК, чем при первом или третьем. Кроме этого, авторами установлена зависимость между массой плаценты и объемом извлекаемой крови, то есть при большей массе плаценты количество собираемой ПК, как правило, возрастает.

При заборе ПК для предотвращения свертывания необходимо использовать антикоагулянты. Хотя гепарин добавляется в контейнер для забора, предпочтительнее использовать антикоагулянты на основе цитрата [7].

Каждый образец ПК тестируется на количество ядросодержащих клеток, СД 34+, КОЕ-ГМ. Проводится также HLA-типирование, определение группы крови АВО и резус-фактора. Кроме того, осуществляется бактериологический посев, проводят полимеразную цепную реакцию (ПЦР) на WVD и ВИЧ-инфекцию. Некоторые авторы [2,23] рекомендуют исследовать ПК на выявление некоторых генетических заболеваний.

Тестирование компонентов ГСК имеет двойную цель – определение пригодности (безопасность и эффективность) клеток для трансплантации конкретному пациенту и мониторинг лабораторной практики забора, обработки и переливания этих клеток. Каждая лаборатория должна иметь программы контроля качества, предназначенные для достижения этих двух целей [7].

Хранение пуповинной крови. Хранение ПК осуществляется в два этапа: краткосрочное и долгосрочное. В срок от сбора ПК до её криоконсервирования, условно называют краткосрочное хранение, и при этом ПК хранится при $+4^{\circ}\text{C}$, то есть в обычных

холодильниках. С.В. Юрасов и соавт. (2000) показали, что при хранении ПК при комнатной температуре (+22°C) или +4°C в течение 24-48 часов жизнеспособность клеток ПК принципиально не снижалась и составляла соответственно 92 и 88%. Однако при хранении образцов крови в течение трёх суток отмечалось значительное снижение жизнеспособности ядросодержащих клеток. По данным R. Scott (2001), ПК не следует хранить без специальных криоконсервантов более 36 часов [2].

Перед долгосрочным хранением ПК проводят её сепарацию для выделения ядросодержащих клеток. При сепарации удаляют эритроциты и гранулоциты, так как эти клетки при замораживании и размораживании лизируются, и продукты лизиса могут вызвать неблагоприятные реакции у реципиента. Длительное хранение ПК осуществляется в специальных банках пуповинной крови. Клетки подвергаются тщательному обследованию, замораживаются по специальной программе и хранятся в жидком азоте при температуре -196°C в состоянии полного анабиоза и могут быть использованы для лечения самого ребёнка или его ближайших родственников, а также других реципиентов.

При замораживании гемопоэтических клеток значительная часть их может разрушаться. Для уменьшения процента гибели клеток используют специальные вещества – криопротекторы. Многие центры используют кратковременное хранение при температуре -80°C ввиду его простоты для пациентов, которым трансплантация будет выполнена в течение нескольких недель или месяцев после забора клеток. Наиболее часто эта температура хранения используется в сочетании с DMSO/HeS криопротектором [7]. Размораживание стволовых клеток ПК осуществляется непосредственно перед инфузией при температуре +37-41°C. Размороженные клетки вводят на инфузионной среде, например, декстране или альбумин [2,32].

Показания к трансплантации ГСК. Количество проводимых в мире трансплантаций постоянно возрастает, достигая в последние годы 40 тыс. процедур в год. Несмотря на значительный опыт, трансплантация ГСК и по сей день остается не только дорогостоящим, но и весьма сложным методом лечения, подчас преподносящим неприятные сюрпризы даже многоопытным практикам [11].

В связи с этим вопрос о проведении ТГКС может стоять либо когда она является вообще единственным методом лечения смертельного заболевания, либо когда результаты долгосрочной выживаемости и качество жизни при проведении консервативного лечения существенно хуже.

Токсичность процедуры аллогенной трансплантации повышается с возрастом реципиента. В связи с этим многие центры установили верхний возрастной ценз для ТГКС, равный 45 годам; некоторые повышают этот возраст до 55 лет и очень редко, при несомненных показаниях и хорошем клиническом состоянии пациента трансплантация может быть проведена больным в 55-65 лет. Технология немие-

лобластных трансплантаций, которая бурно развивается в последние 5-6 лет, применима даже у пожилых пациентов.

Успешный исход трансплантации гемопоэтических клеток ПК зависит от количества ядросодержащих клеток на 1 кг массы тела реципиента и от степени совместимости по HLA-системе.

По данным P. Rubinstein (1998), благоприятные исходы при аллогенной неродственной инфузии стволовых клеток ПК отличались у пациентов, получивших не менее $3,7 \times 10^7$ ядросодержащих клеток из расчёта на 1 кг массы тела [43]. А количество получаемой пуповинной крови от одного донора в среднем составляет $10 \times 10^8 \pm 5 \times 10^8$ ядросодержащих клеток. Поэтому, по данным Дюссельдорфского банка ПК [26], из 2100 образцов ПК для взрослых пациентов с массой 50-70 кг потенциальными трансплантатами могут считаться лишь 25%, при 35 кг – 67%, а для больных с массой тела 10 кг – 100%.

Вторым фактором, определяющим благоприятный исход трансплантации, является степень совместимости по системе HLA. Установлено, что лимфоидные клетки ПК менее иммунореактивны. Поэтому частичная несовместимость по антигенам HLA-системы при трансплантации гемопоэтических клеток допустима, а частота тяжёлой РТПХ встречается реже, чем при ТКМ [11,43].

Осложнения при трансплантации ГКС пуповинной крови. Осложнения, связанные с трансплантацией ГКС, могут быть обусловлены общим состоянием больного, основным заболеванием, процедурой кондиционирования, подготовительными мероприятиями и с трансплантацией и делятся на ближайшие и отдалённые осложнения. Несмотря на профилактические мероприятия, инфекции остаются серьёзной проблемой раннего посттрансплантационного периода [21,40].

Следующим видом осложнения являются инфузионные реакции – реакция больного на криопротектор, продукты распада эритроцитов, неполностью удалённых при сепарации, а также возможные реакции при переливании любых препаратов крови.

Одним из грозных осложнений в ближайшем посттрансплантационном периоде является острая реакция «трансплантат против хозяина». РТПХ вызвана агрессией иммунокомпетентных Т-лимфоцитов (CD3+) донора против клеток реципиента. Чем больше несовместимость по HLA-системе донора и реципиента, тем чаще развиваются и тяжелее протекают реакции «трансплантат против хозяина».

В отдалённом периоде из осложнений могут наблюдаться неприживляемость трансплантата, хронические реакции «трансплантат против хозяина» и рецидивы заболевания. Исследованиями некоторых крупных центров [43] показано, что рецидивы лейкемии через 100 дней после трансплантации гемопоэтических клеток ПК наблюдались у 9% больных, а через 1 год – у 26%.

Долгосрочное хранение ГСК путём создания банков пуповинной крови. В ведущих центрах мира специально разработано и создано хранилище

стволовых клеток для их долгосрочного хранения. Это даёт возможность подбора идентичного донора для осуществления неродственных трансплантаций. В банке могут храниться индивидуальные образцы для самих доноров или для их близких родственников.

Банки для хранения ГСК представляют собой резервуар с жидким азотом объёмом 500 л, оснащённый внутренней системой для размещения криобоксов с пробирками. Они оборудованы сигнализацией и компьютерной системой, позволяющей круглосуточно следить за уровнем жидкого азота и за температурой в хранилище. После размораживания клетки сохраняют все свои свойства. Размораживают образцы в водяной бане при температуре 40-41°C в течение 3-5 минут. Размороженные клетки должны быть сразу перелиты реципиенту.

При организации такой системы банков ПК потребуется разработать этические и юридические положения, которые позволят работать на международном уровне. Примерный перечень положений и документов, которые следует проработать [1]:

- стандартизация способов сбора, фракционирования и замораживания ПК;

- отбор «здоровых» образцов ПК из роддомов в достаточных объёмах для осуществления успешных трансплантаций;

- сравнение и стандартизация различных критериев качества и количества гемопоэтических предшественников, а также выявление генетических и инфекционных заболеваний, которые могут передаваться при инфузии клеток ПК;

- установление критериев отбора доноров и методов HLA-типирования;

- создание хранилища для сыворотки, клеток и ДНК, полученных из ПК;

- организация компьютерной сети данных о ПК для осуществления взаимосвязи с регистрами доноров костного мозга;

- разработка специальных протоколов для сравнения исходов трансплантации ПК и КМ от HLA-идентичных родственных и неродственных доноров;

- создание этических и юридических критериев использования ПК, включающих, в том числе, согласие родителей, а также информирование матери или родственников при выявлении у ребёнка генетических и/или инфекционных болезней;

- международное сотрудничество с другими донорскими ассоциациями и иными регистрами.

Преимущества трансплантации ГСК пуповинной крови. Многочисленными исследованиями доказано, что использование пуповинной крови для трансплантации стволовых клеток имеет ряд преимуществ перед другими источниками гемопоэтических клеток:

1. Процедура сбора пуповинной крови технически легко выполнима, безопасна для здоровья матери и новорожденного ребёнка (донора), не требует общей анестезии при сборе.

2. Образцы ПК, находящихся в банках крови, тестируемые и типированные по HLA-системе, сра-

зу могут быть использованы для трансплантации. Это исключает задержки, возникающие при поиске, сборе и типировании костного мозга донора, которые могут быть фатальными для больных со злокачественными заболеваниями крови.

3. Увеличивается вероятность нахождения редких HLA-типов трансплантатов для этнических меньшинств.

4. Снижается риск передачи некоторых латентных инфекций, передаваемых трансмиссивным путём, поскольку вероятность их носительства значительно ниже, чем у взрослых.

5. Установлена большая возможность, по сравнению с костным мозгом, использования не полностью совместимых по HLA-системе трансплантатов.

6. Частота развития и тяжесть течения реакции «трансплантат против хозяина» при трансплантации ГСК ниже, чем при трансплантации костного мозга.

7. Хранение стволовых клеток пуповинной крови позволяет в какой-то степени обезопасить жизнь ребёнка и, возможно, других членов семьи.

8. Появляется недорогая форма биологического страхования жизни в связи с возможностью использовать клетки пуповинной крови в качестве аутологичного трансплантата.

Заключение

Обобщая представленные в обзоре данные, можно констатировать, что ПК, являясь «отброшенной» тканью ребёнка, может стать доступным источником ГСК, получение которых не приводит к риску для жизни и здоровья ни матери, ни ребёнка и достойным альтернативным источником гемопоэтических клеток для трансплантации при многих тяжёлых заболеваниях крови, включая онкологические. Учитывая возможность длительного хранения образцов ПК в жидком азоте, появляются условия для создания банков ПК, для которых потребуются относительно недорогие и эффективные способы тестирования и выделения ядродержащих клеток. Однако собственно создание банка возможно только при появлении источников финансирования.

Ученые, занимающиеся исследованием стволовых клеток, уверены, что в ближайшем будущем сфера их возможного использования значительно увеличится, так как научные исследования в этой области развиваются чрезвычайно динамично, и работа по созданию специальных банков пуповинной крови во многих странах идёт интенсивно. Научный и кадровый потенциал Узбекистана всегда занимал достойное место в научном сообществе медицины, здесь воспитывались и работали многие ученые с мировым именем, проводились работы по сбору трупного и донорского костного мозга, успешно проводились трансплантации костного мозга при некоторых гематологических заболеваниях.

В настоящее время медицина в Узбекистане укрепляет свои позиции по всем направлениям. Широкомасштабно проводится обновление материально-технической базы, идёт строительство новых больниц. Приобретается передовое оборудование

для внедрения новых технологий, целенаправленно проводится реформа в системе здравоохранения.

Несколько специалистов прошли подготовку по трансплантации ГСК на базе крупных центров мира, занимающихся трансплантацией ГСК (в Германии, Чехии, России, Турции).

Таким образом, необходимо направлять интеллектуальные и финансовые возможности МЗ РУз на внедрение инновационных технологий и методов лечения. Организация отделения трансплантации ГСК и банка ПК в Республике Узбекистан при содействии МЗ РУз поможет в решении проблемы лечения многих тяжёлых заболеваний в республике, в распространении знаний и технологий для всех специалистов, в разработке стандартов и программ лечения этих заболеваний.

Со списком литературы можно ознакомиться в редакции

НЕОБХОДИМОСТЬ И ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ТРАНСПЛАНТАЦИИ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК В УЗБЕКИСТАНЕ

Эргашев У.Ю., Курязов А.М., Мустафакулов Г.И., Якубов Д.Р., Минавархуджаев Р.Р.

В последние годы проводится огромная работа по исследованию стволовых клеток. В статье подробно описаны свойства стволовых клеток, разновидности их как в эмбриональном периоде, так и во взрослом организме. Применение стволовых клеток, выделенных из пуповинной крови плода человека, привело к значительному успеху в лечении онкологических заболеваний крови и ряда соматических болезней. Представлены основы учения о стволовых клетках, описаны способы получения, хранения, использования в практической медицине и перспективы применения их в условиях Узбекистана.

Ключевые слова: *стволовые клетки, пуповинная кровь плода человека, онкологические заболевания крови, трансплантация.*

