



ПЕРСПЕКТИВЫ СОЗДАНИЯ РЕГИСТРА ВИЧ-РЕЗИСТЕНТНЫХ ДОНОРОВ

В.В. Зубов¹, Ю.Г. Иоффе², Д.Ю. Ключников³

¹ ФГБУН «Институт теоретической и экспериментальной биофизики Российской академии наук», Пущино

² Благотворительный фонд «Карельский Регистр неродственных доноров гемопоэтических стволовых клеток», Петрозаводск

³ ГБУЗ «Самарский областной центр планирования семьи и репродукции», Самара

Резюме

В последние годы большой интерес вызывает трансплантационное лечение ВИЧ/СПИДа, основанное на пересадке ВИЧ-резистентных гемопоэтических стволовых клеток с мутацией Δ32 в гене CCR5. Необходимые для такого лечения гомозиготные носители данной мутации составляют 1...2% населения России. Для их подбора необходимо создание специализированного регистра потенциальных доноров ВИЧ-резистентных кроветворных клеток и единиц пуповинной крови на базе уже существующих регистров и банков пуповинной крови.

В обзоре рассматривается история первой удачной попытки трансплантационного лечения ВИЧ/СПИДа («Берлинский пациент») и развитие данного направления в США и в Германии. Описаны риски, препятствующие широкому внедрению данного подхода в России. Представлена информация о численности потенциальных доноров гемопоэтических клеток в отечественных регистрах и о количестве препаратов клеток в банках пуповинной крови. Оценена примерная стоимость поиска носителей мутации Δ32 и их HLA-типирования. Рассмотрены перспективы удешевления HLA-типирования при помощи современных методов высокопроизводительного секвенирования ДНК.

Ключевые слова: ВИЧ, СПИД, ВИЧ-резистентность, CCR5Δ32, трансплантация ГСК, NGS, высокопроизводительное секвенирование, HLA-типирование, донорство кроветворных клеток, регистры доноров костного мозга

Введение

К концу 2013 года в России было зарегистрировано более 833 тысяч случаев заражения вирусом иммунодефицита человека. Общее количество инфицированных в 2012 году увеличилось примерно на 50 тысяч (~70 тысяч новых ВИЧ-инфицированных минус ~20 тысяч умерших от СПИДа) [1]. В 2013 году – на 55 тысяч (~78 тысяч новых минус ~23 тысячи умерших) [2].

Летальность при заражении ВИЧ превышает 95%. Сравнительно долго живут ВИЧ-контроллеры (~1,4%) [3], у которых латентная (субклиническая) инфекция в любой момент может перейти в клиническую стадию, т.е. в СПИД. Достаточно защищёнными могут чувствовать себя только немногочисленные (1:300) элитные контроллеры [4]. Остальные избежавшие смерти от СПИДа погибают по другим причинам - от передозировки наркотиков, суицида и т.п.. Поэтому

диагноз «ВИЧ+» многими воспринимается как смертный приговор с отсрочкой исполнения. Антиретровирусная терапия позволяет увеличить продолжительность отсрочки, но это продление стоит от нескольких тысяч до нескольких десятков тысяч долларов в год [5].

Притормозить развитие эпидемии могла бы вакцинация, но многочисленные попытки разработать вакцину оказались безуспешными [6]. Не опасен ВИЧ только для носителей мутации Δ32 в гене CCR5. У них нарушен синтез хемокиновых рецепторов, через которые вирионы обычно проникают в Т-хелперные лимфоциты. Частота встречаемости гетерозиготных носителей мутации Δ32 в России обычно превышает 10% [7], но невосприимчивы к вирусу только гомозиготные мутанты, которых намного меньше (1-2%). Люди с таким генотипом могут служить донорами гемопоэтических стволовых клеток,

трансплантация которых способна вылечить ВИЧ/СПИД [8].

Для проведения трансплантационного лечения ВИЧ-инфицированных реципиентов необходим регистр ВИЧ-резистентных доноров гемопоэтических стволовых клеток (ГСК). Целью настоящего обзора является обоснование необходимости организации такого регистра и рассмотрение возможности его создания в России.

Берлинский пациент

Первым ВИЧ-инфицированным пациентом, вылеченным стволовыми клетками с генотипом CCR5 Δ 32/ Δ 32, стал Тимоти Браун (Timothy Brown), названный журналистами “берлинским пациентом”. Умереть от СПИДа ему помешала острая лейкемия, для лечения которой потребовалась пересадка гемопоэтических стволовых клеток. Делать эту пересадку было практически бесполезно, поэтому доктор Геро Хюттер (Gero Hütter) из клиники “Charité Berlin” решил рискнуть и пересадить не обычные гистосовместимые клетки, а ВИЧ-резистентные. Подобрать такие донорские клетки очень трудно, но Брауну крупно повезло. В криобанке нашёлся препарат подходящих клеток. Их введение, проведённое после курса химиотерапии в начале 2007 года, оказалось безуспешным. Источником клеток для повторной трансплантации стал донор, специально прилетевший из США в Германию. Со второй попытки пациент избавился не только от лейкемии, но и от ВИЧ [9, 10]. С тех пор прошло больше семи лет. Американец Тимоти Браун, подрабатывавший в Берлине ночным барменом, вполне здоров и принимает деятельное участие в мероприятиях, посвящённых борьбе со СПИДом.

Аналогичная попытка лечения ВИЧ-инфекции была предпринята 23 апреля 2013 года в США. Точная дата известна, поскольку в тот же день на сайте Медицинского центра университета Миннесоты появился пресс-релиз с описанием подробностей и высказываниями нескольких участников данного мероприятия [11]. ВИЧ-инфицированному 12-летнему Эрику Блу (Eric Blue) с острой лимфобластной лейкемией после семидневного курса химиотерапии и облучения был введён препарат клеток с генотипом CCR5 Δ 32/ Δ 32, полученный из пуповинной крови. Такие клетки даже при неполном совпадении лейкоцитарных антигенов А-В-DRB1 (4/6) с антигенами реципиента реже вызывают реакцию «трансплантат против хозяина» (РТПХ), чем полностью совпадающие (6/6) гемопоэтические клетки взрослых доноров [12]. Примерно через два

месяца после трансплантации у пациента развилась острая РТПХ и он умер [13].

Проблема гистосовместимости

Обязательным условием успешной пересадки клеток иммунной системы (клеток костного мозга, или гемопоэтических стволовых клеток периферической или пуповинной крови) является идентичность антигенных эпитопов, находящихся на поверхности клеток донора и реципиента. Химиотерапия предотвращает отторжение трансплантированных клеток, но эти клетки способны распознавать чужеродные для них антигены, и их реакция часто бывает смертельной для реципиента.

При полном совпадении лейкоцитарных антигенов А-В-С-DRB1-DQB1 риск тяжелых острых РТПХ снижается, тем не менее, после аллогенной трансплантации ГСК гибнет примерно 40% реципиентов. При неполном совпадении этих антигенов через 2-3 года после трансплантации умирает более половины пациентов [14,15].

При подборе пар доноров и реципиентов для трансплантации гемопоэтических клеток необходимо принимать во внимание ещё множество параметров - совместимость антигенных систем крови (ABO, Rh, MNSs, P, Lu, Kk, Le, Fy, Jk), иммуноглобулин-подобных рецепторов киллерных клеток (KIRs), MICA/B и т.п.. Следует учитывать и то, что вызвать РТПХ способны нуль-аллели и другие редкие генетические нарушения, для которых характерно отсутствие экспрессии антигенов, имеющих у реципиента. Например, дефицит иммуноглобулина А в европейской популяции встречается с частотой 1:600. Введение препаратов крови, содержащих IgA, способно вызвать у таких пациентов анафилактический шок [16]. Соответственно, трансплантация IgA-дефицитных донорских клеток, дающих иммунный ответ на имеющийся у реципиентов иммуноглобулин А, может оказаться смертельной.

Из-за высокой летальности трансплантацию ГСК проводят только при неизбежности смертельного исхода и чаще применяют при острых лейкозах. Не удивительно, что и Тимоти Брауна, и Эрика Блу лечили именно от лейкозов, а ВИЧ был всего лишь сопутствующей инфекцией. Неудивительно и то, что пересадка ГСК ВИЧ-резистентных (CCR5 Δ 32/ Δ 32) доноров, часто обсуждаемая и в прессе, и в научных публикациях, не стала действенным средством лечения ВИЧ-инфекции [17].

Точный подбор совместимых пар для трансплантации («антигенных близнецов») мог бы

решить эту проблему, но серологические методы HLA-типирования не обладают достаточно высоким разрешением. Применение методов гибридизации ДНК и электрофоретического (Сэнгеровского) секвенирования повысило не только разрешение гистотипирования. Повысились также сложность, трудоёмкость и стоимость проведения таких анализов [18, 19].

Кардинально изменить ситуацию способны появившиеся недавно технологии NGS (Next Generation Sequencing) – технологии высокопроизводительного секвенирования ДНК [20]. Их применение для HLA-генотипирования будет способствовать развитию регистров доноров кроветворных клеток, что многократно увеличит шансы на поиск совместимых пар доноров и реципиентов.

«Золотой стандарт» HLA-типирования

Секвенирование ДНК считается “золотым стандартом”, позволяющим наиболее точно типировать HLA-антигены, но расшифровка результатов Сэнгеровского (электрофоретического) секвенирования осложняется диплоидностью генома человека [19]. Для технологий нового поколения это не является проблемой, поскольку они построены на чтении индивидуальных молекул ДНК или их клонов, состоящих из десятков или сотен тысяч точных копий отдельных фрагментов ДНК, причём количество таких клонов может измеряться десятками или сотнями миллионов.

Первый секвенатор нового поколения (GS20) компания 454 Life Science выпустила в 2005 году. В нём использовалась разработанная в Швеции технология пиросеквенирования. Вскоре эту компанию приобрела корпорация Roche, и одним из наиболее популярных приложений выпускаемых ей пиросеквенаторов GS FLX и GS Junior стало ДНК-гистотипирование [21, 22, 23].

Разработанные коллабораторами Roche наборы для ДНК-гистотипирования содержат праймеры, позволяющие амплифицировать наиболее важные участки основных генов HLA. Их таргетное (целевое) секвенирование повышает точность HLA-типирования и позволяет уменьшить вероятность гибели реципиентов гемопоэтических клеток из-за несовпадения основных лейкоцитарных антигенов, но у РТПХ могут быть и другие причины. И разбираться с подобными причинами желательно до, а не после трансплантации.

Сейчас пиросеквенирование уже не способно конкурировать с более производительными флуоресцентными и полупроводниковыми технологиями NGS, и

корпорация Roche заявила о прекращении выпуска своих секвенаторов, хотя поставки необходимых для их работы реагентов и наборов будут продолжаться до середины 2016 года.

Лидером рынка NGS является компания Illumina. Заказное секвенирование генома человека на разработанном ей флуоресцентном секвенаторе HiSeq 2000 стоит меньше 10 тысяч долларов. Экзоны (участки генов, кодирующие белки) занимают только небольшую часть генома, поэтому для выявления генетических нарушений и ДНК-гистотипирования предпочтительнее экзомное секвенирование, стоимость которого почти на порядок ниже. Например, в преискуранте компании Gene by Gene DNA DTC стоимость полногеномного секвенирования (с 30-кратным покрытием) равна \$7595 [24], а экзомного (с 70-кратным покрытием) – \$1095 [25].

Перечень провайдеров экзомного флуоресцентного секвенирования, перечисленных на сайте Science Exchange Inc. в апреле 2014 года, включал 18 компаний, предоставляющих данную услугу. Цены зависят от качества секвенирования и начинаются со ста долларов [26]. Примерно столько же компаний (19) предоставляют услуги полногеномного секвенирования на HiSeq 2000. При низкой кратности чтения генома стоимость начинается с \$1500 [27]. Для получения удовлетворительного качества обычно требуется 30-кратное чтение генома человека, но специальные алгоритмы обработки генетической информации позволяют использовать результаты секвенирования с экстремально низким (0,1...0,5x) покрытием генома [28].

В 2014 году компания Illumina планирует начать продажи десятков секвенаторов HiSeq X, способных оцифровывать за рабочий цикл до триллиона оснований ДНК. В результате стоимость геномного секвенирования может приблизиться к 1000\$. Тем не менее, флуоресцентные технологии NGS в основном исчерпали свой потенциал, и надежды на дальнейшее снижение стоимости секвенирования генома человека многие связывают с полупроводниковыми технологиями [29].

Первый полупроводниковый секвенатор PGM (Personal Genome Machine), разработанный компанией Ion Torrent, появился в продаже в 2011 году [30]. Его начальные характеристики были сравнительно скромными (10...15 миллионов пар нуклеотидов за рабочий цикл), но к 2013 году производительность выросла примерно на два порядка и превысила 1 миллиард пар нуклеотидов (млрд.п.н.) [31]. Продажи следующей модели (Ion Proton) начались в сентябре 2012 года. Производительность рабочего цикла у неё выше

(~10 млрд.п.н.), но качество секвенирования (длина ридов и точность чтения) заметно ухудшилось.

Если обещания разработчиков сбудутся, то в 2014 году производительность Ion Proton достигнет 32 млрд.п.н. (за рабочий цикл) и станет возможным полупроводниковое секвенирование индивидуальных геномов. Пока же этот прибор справляется только с экзoмами, причём на порядок быстрее флуоресцентных секвенаторов.

Заказным секвенированием экзoмов на Ion Proton занимаются уже около сорока сертифицированных под эту задачу компаний [32] (апрель 2014 г.). Что касается PGM, то благодаря короткому рабочему циклу (~4 часа) и низкой стоимости запуска прибора он быстро потеснил конкурентов в области таргетного секвенирования и может стать наиболее востребованным прибором, пригодным для массового ДНК-гистотипирования.

В России в начале 2014 года насчитывалось около тридцати секвенаторов MiSeq, более тридцати PGM и четыре Ion Proton (ИЦиГ, МФТИ, РДКБ, ИВНДиНФ). Флуоресцентные секвенаторы HiSeq 2000/2500 можно пересчитать по пальцам одной руки. Четыре из них находятся в Москве (ИОГен РАН, МГУ, ЦНИИЭ, РНИМУ). Один – в Красноярске (Центр геномных исследований СФУ).

На HiSeq 2000 и Ion Proton можно секвенировать по два экзoма в день. Скрининг сотен тысяч экзoмов при такой производительности

невозможен, но для проведения клинических испытаний требуется несколько десятков, а не десятков тысяч «антигенных близнецов». Для их подбора достаточно и имеющихся в России мощностей, позволяющих за год секвенировать тысячи экзoмов потенциальных ВИЧ-резистентных дoноров и ВИЧ-инфицированных реципиентов.

Регистр ВИЧ-резистентных дoноров

Вероятность совпадения (MP - Matching Probabilities) HLA-антигенов зависит от национального состава населения, его генетических особенностей и от количества дoноров в национальных регистрах. Оценка MP для разных стран, основанная на данных BMDW (Bone Marrow Donors Worldwide), была опубликована в начале 2014 года [33].

Наиболее высока вероятность подбора совместимого дoнора в национальных регистрах для жителей Великобритании (~0,9) и Германии (~0,85). В США эти показатели не ниже, но только для выходцев из Европы (~90%) и Испании (~85%). Для афроамериканцев MP не превышает 0,55. И это несмотря на наличие в регистрах США почти миллиона афроамериканских дoноров. Для представленных в BMDW российских регистров, несмотря на малочисленность их дoноров (< 10000), MP близка к 0,7.

Таблица 1

Российские регистры дoноров гемопоэтических клеток (март 2014 г.)

№ п/п	Регистр	Количество дoноров, типированных по A-B-DRB1	Общее количество дoноров
1	Российский медицинский НПЦ «Росплазма» ФМБА (Киров)	~ 22 000	~ 22 000
2	ОГУП «Челябинская областная станция переливания крови»	2 687	5 082
3	НП «Регистр дoноров» (Самара)*	2 289	2 289
4	НИИ ДОГиТ им. Р.М.Горбачёвой (Санкт-Петербург)	1 275	1 275
5	Российский НИИ гематологии и трансфузиологии ФМБА (Санкт-Петербург)	1153	4 186
6	Карельский Регистр неродственных дoноров (Петрозаводск)*	377	2 793
7	ГУЗ «Станция переливания крови» Ростовской области (г. Ростов-на-Дону)	375	1 127
8	Кировский НИИ гематологии и переливания крови ФМБА	310	3 150
9	Южно-Уральский институт биофизики ФМБА (г. Озерск)	250	3 852
Итого		~ 30 000	~ 45 000

* По данным BMDW [34].

При отсутствии подходящего донора в национальных регистрах вероятность подбора донора в международной поисковой системе не превышает 0,5 (48,1 % в 2011 году) [33]. Отсюда следует, что даже малочисленный (< 5 000) российский регистр ВИЧ-резистентных доноров сможет обеспечить трансплантационное лечение каждого второго ВИЧ-инфицированного реципиента. Для создания такого регистра можно использовать уже имеющиеся российские регистры, в которых на учёте состоят более 30 тысяч потенциальных доноров, типированных по антигенам HLA A-B-DRB1 (Табл. 1).

Проще всего было бы протестировать все имеющиеся регистры на наличие доноров-носителей CCR5 Δ32/Δ32, но даже в самом крупном из них (ФГБУ «Росплазма») можно обнаружить не больше трёхсот таких мутантов. Примерно столько же потенциальных доноров можно найти во всех остальных региональных регистрах. Их количество может увеличиться за счёт анализа частично гистотипированных доноров, но и в этом случае общее число потенциальных ВИЧ-резистентных доноров в ближайшем будущем вряд ли перевалит за тысячу.

Международная поисковая система BMDW (Bone Marrow Donors Worldwide) включает примерно 23 миллиона потенциальных доноров и препаратов клеток из регистров доноров костного мозга и банков пуповинной крови всего мира [34]. Стоимость поиска и получения трансплантата от донора из зарубежных регистров составляет от 18 до 30 тысяч евро. Для российских реципиентов данная система подходит далеко не всегда. Дело не только в высокой стоимости (хотя и это немаловажно), но и в генетических особенностях многонационального населения России. Поэтому национальный регистр с несколькими десятками тысяч потенциальных доноров смог бы существенно дополнить международную поисковую систему и заметно повысить оперативность и доступность донорской помощи для онкогематологических больных.

В России предпринималось около двадцати попыток объединения локальных регистров доноров, но делалось это в большинстве случаев на голом энтузиазме и без государственной

поддержки. Один из последних примеров – соглашение между Санкт-Петербургским государственным медицинским университетом и «Русфондом» о создании национального регистра доноров костного мозга [35].

Отсюда следует, что на основе разрозненных отечественных регистров доноров костного мозга можно создать специализированный регистр из нескольких сотен ВИЧ-резистентных доноров, но только теоретически. Практически же потребуются господдержка, предоставление которой весьма проблематично. Кроме того, нескольких сотен доноров явно не хватит для развития трансплантационного лечения ВИЧ-инфицированных. Увеличение их числа потребует значительного расширения поисковой базы за счёт расширения отечественных донорских регистров, привлечения к данной работе регистров ближнего зарубежья и целенаправленного поиска новых потенциальных доноров с генотипом CCR5 Δ32/Δ32.

В Германии поиск таких доноров был инициирован автором метода трансплантационного лечения ВИЧ/СПИДа - доктором Хюттером. В 2013 году его группой было протестировано 8 тысяч доноров из 40 тысяч, состоящих на учёте в “German Red Cross Donor Registry” (Мангейм, Германия) [36]. По-видимому, в Германии скоро появится специализированный регистр, включающий несколько сотен ВИЧ-резистентных доноров, но вряд ли это поможет сотням тысяч российских носителей ВИЧ.

Банки пуповинной крови

Альтернативным источником тысяч препаратов ВИЧ-резистентных стволовых клеток может служить пуповинная кровь (ПК). Количество клеток в таких препаратах сравнительно невелико, но они обладают рядом преимуществ – доступностью источников, пониженной вероятностью развития РТПХ, меньшей опасностью переноса вирусных инфекций, компактностью содержащих их ёмкостей, возможностью длительного централизованного хранения и быстрого получения препаратов из криобанков. Поэтому доля трансплантаций с использованием клеток пуповинной крови в последние годы быстро увеличивается (Рис. 1).

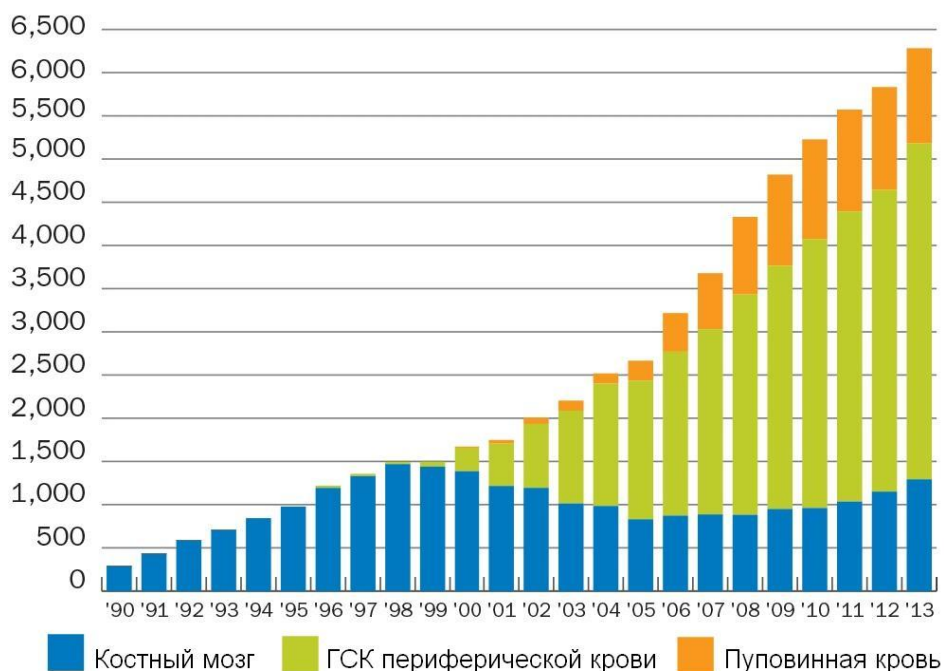


Рис. 1 Источники стволовых клеток при трансплантациях в США [37, модифицировано]

Банки ПК подразделяются на общественные (публичные), персонального хранения и смешанные. В России имеется несколько крупных банков персонального хранения, но собранные в них препараты предназначены в основном для аутологичной или родственной трансплантации и для сторонних реципиентов недоступны.

Публичные банки пуповинной крови имеются в Самаре (ГБУЗ «Самарский областной центр планирования семьи и репродукции», 5244 ЕПК), в Санкт-Петербурге («Покровский банк стволовых клеток», ~4000 ЕПК) и в Москве (ГБУЗ БСК ДЗМ, ~3800 ЕПК). В международной поисковой системе BMDW зарегистрировано более 600 тысяч единиц пуповинной крови, находящейся на хранении в 160 банках [38].

В общественном регистре Покровского банка стволовых клеток в 2013 году было обнаружено 18 образцов ПК с генотипом CCR5 Δ32/Δ32 [39]. Это можно считать первым шагом к созданию российского регистра препаратов ВИЧ-резистентных клеток пуповинной крови. В банке пуповинной крови компании StemCyte (США) в начале 2013 года насчитывалось больше трёхсот таких препаратов [40]. Один из них был использован в схеме трансплантационного лечения лейкоза у ВИЧ-инфицированного 53-летнего пациента из Нидерландов, умершего от побочной лёгочной инфекции [41].

Главный недостаток единиц пуповинной крови при гемопоэтической трансплантации - низкое содержание в них стволовых клеток - компенсируется пониженной вероятностью развития РТПХ. Последнее связано не столько с запоздалым формированием у таких клеток иммунотолерантности, сколько с наличием иммунной памяти о ненаследуемых материнских антигенах, обозначаемых обычно аббревиатурой NIMA (Non-Inherited Maternal Antigens) [42]. Это обстоятельство позволяет значительно повысить вероятность подбора гистосовместимых донорских препаратов, поэтому количество трансплантаций, проводимых с учётом NIMA, в последние годы быстро увеличивается [43].

Влияние материнских антигенов на спектр иммунотолерантности детей прослеживается на протяжении многих лет. Например, ещё в середине прошлого века было замечено, что у многих Rh⁻ женщин, рождённых Rh⁺ матерями, не образуются антитела к резус-фактору при рождении Rh⁺ детей [44]. По-видимому, длительное сохранение привилегированного статуса характерно и для других ненаследуемых материнских антигенов, но этот тип иммунотолерантности у взрослых доноров проявляется далеко не всегда. Что касается клеток пуповинной крови, то их толерантность к NIMA не вызывает особых сомнений и может служить хорошим подспорьем при подборе донорских препаратов.

Цена вопроса

При проведении аллогенной (неродственной) трансплантации в некоммерческих медицинских учреждениях ведущим ценообразующим фактором будет стоимость ВИЧ-резистентных клеток. В случае бесплатного донорства в первую очередь необходимо учитывать затраты на поиск и гистотипирование ВИЧ-резистентных доноров. Если считать, что такие доноры встречаются с частотой 1:100, то для внесения в регистр тысячи ВИЧ-резистентных доноров нужно протестировать сто тысяч образцов крови.

Наборы для определения делеции $\Delta 32$ в гене CCR5 пока производят только три российские компании (на март 2014 года):

- ООО НПФ «Генлаб» - «Мультиген CMV/CCR5d32» (Регистрационное удостоверение № ФСР 2007/00350 - 2060 руб./120 тестов);
- ООО «ТестГен» - «Набор реагентов для генотипирования полиморфного маркера Delta32» (20000 руб./600 тестов);
- ООО «ИтерЛабСервис» - «АмплиСенс Пироскрин», «CCR5del32-скрин» (Регистрационное удостоверение № ФСР 2012/13246, Форма 22 - 1450 руб./55 тестов).

Исходя из этих расценок расходы на скрининг 100 тысяч образцов крови для выявления тысячи ВИЧ-резистентных доноров могут составить около трёх миллионов рублей. Если учитывать также стоимость пробоподготовки, расходных материалов, накладные расходы лабораторий и т.п., то эта сумма может увеличиться до 10 миллионов рублей.

Гистотипирование одного донора по четырём локусам HLA с высоким разрешением (SBT по HLA A-B-C-DRB1) сейчас стоит 10 тысяч рублей (по прейскуранту РДКБ [45]), т.е. на типирование тысячи ВИЧ-резистентных потенциальных доноров потребуется порядка 10 миллионов рублей. Таким образом, расходы на гистотипирование и расходы на поиск гомозиготных носителей мутации $\Delta 32$ примерно равны и в сумме составляют около 20 миллионов рублей на каждую тысячу ВИЧ-резистентных доноров.

Ежегодная потребность в таких донорах примерно соответствует количеству умирающих от СПИДа. Сейчас это около 25 тысяч человек. Следовательно, ежегодные расходы на создание и пополнение Национального регистра ВИЧ-резистентных доноров можно оценить в 500 миллионов рублей. Это меньше 2,5 % от 23

миллиардов рублей, потраченных в России на безуспешную борьбу с эпидемией ВИЧ в 2013 году [46].

Применение технологий секвенирования нового поколения должно значительно уменьшить расходы на ДНК-гистотипирование и повысить его разрешение. Компания Illumina уже получила разрешение FDA (Food and Drug Administration, США) на применение секвенатора MiSeqDx в диагностических целях. Продажа наборов реагентов для анализа восьми HLA-генов должна начаться в ближайшие месяцы, но и без этих фирменных наборов некоторые лаборатории начали использовать MiSeq для HLA-типирования [47, 48]. Специалисты компании Ion Torrent также планируют в ближайшем будущем выпустить наборы AmpliSeq для таргетного секвенирования HLA-генов на PGM [49, 50].

Один запуск секвенатора MiSeqDx обходится в полторы тысячи долларов. Пробоподготовка может удвоить эту цифру, но высокая производительность прибора (15 млрд.п.о.) позволяет одновременно секвенировать более 100 проб и понизить расходы на каждую пробу до 25-30\$. У PGM стоимость запуска прибора меньше, но и производительность ниже. В результате расчётная стоимость таргетного секвенирования HLA-генов на обоих приборах получается примерно одинаковой (~1000 руб.).

Информацию о полном спектре HLA-антигенов, группах крови, ВИЧ-резистентности и практически всех прочих генетических характеристиках доноров и реципиентов может дать секвенирование их экзотов. Стоимость такого секвенирования (650-900\$) вполне сопоставима с расходами на общий анализ крови и ДНК-гистотипирование пяти локусов HLA обычными методами (~400\$) [45].

Секвенирование геномов и экзотов человека, которое уже в обозримом будущем должно привести к персонализации медицины, развивается очень быстрыми темпами. Количество секвенированных геномов человека сейчас измеряется десятками тысяч. Экзотов, как минимум, на порядок больше. Появляются программы, направленные на секвенирование сотен тысяч геномов.

В 2011 году китайская компания BGI объявила о начале работ по проекту “3-Million Genomes Project”, нацеленному на полногеномное секвенирование миллиона человек, миллиона микроорганизмов и миллиона растений и животных. В конце 2012 года Правительство Её Величества (Великобритания) приняло решение о выделении ста миллионов фунтов стерлингов на

секвенирование ста тысяч больных раком. Саудовская Аравия приступила к созданию национальной сети центров секвенирования, которая позволит провести геномное секвенирование ста тысяч жителей страны [51]. В начале этого года «стотысячные» геномные проекты стартовали и в США [52, 53].

Развитие технологий геномного секвенирования в будущем сделает ненужным специальное HLA-генотипирование доноров и реципиентов, но дожить до этого будущего

нынешнему поколению носителей ВИЧ вряд ли удастся.

Фактор времени

Продолжительность жизни после инфицирования ВИЧ без антиретровирусной терапии в России составляет в среднем 11,8 лет. Средняя продолжительность периода от постановки диагноза «СПИД» до смерти – 1,9 месяца [54]. Причины смерти могут быть самыми различными, но в России превалирует туберкулёз лёгких (Рис. 2).

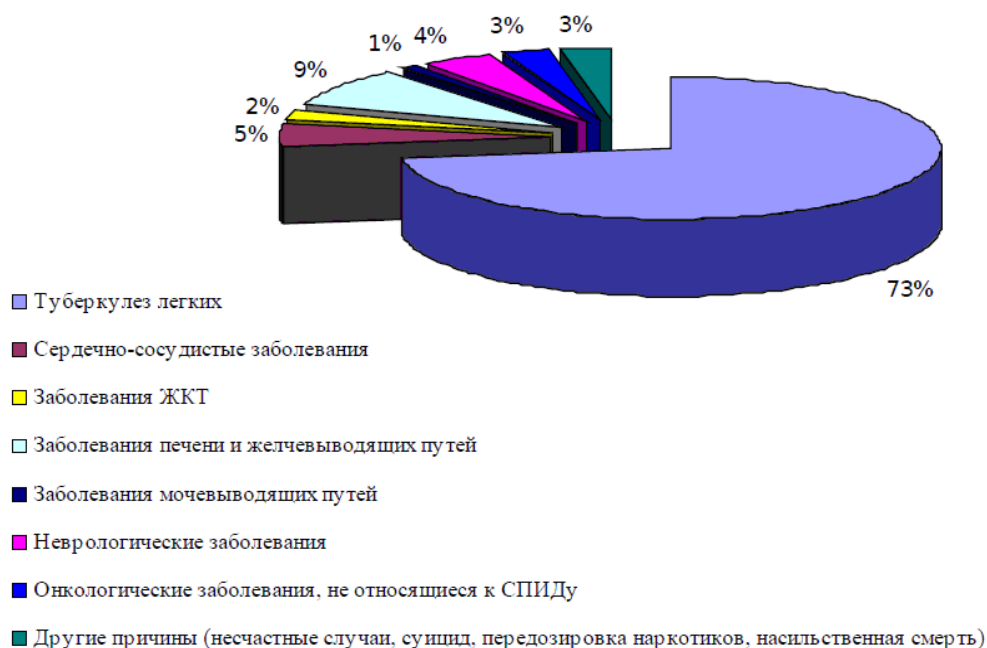


Рис. 2 Структура заболеваний, приведших к смерти пациентов с диагнозом «СПИД» [54] (приводится с разрешения А.В. Покровской)

Данные по продолжительности жизни ВИЧ-инфицированных в России примерно соответствуют статистике развитых стран, но преобладающее сочетание СПИДа с туберкулёзом более характерно для стран африканского континента. В некоторых больницах уже созданы специализированные отделения, основной задачей которых является интенсивное (но непродолжительное) лечение туберкулёза, сочетающегося с ВИЧ-инфекцией. Шансы на выздоровление у таких пациентов крайне невелики, что позволяет не принимать во внимание высокий риск осложнений при трансплантации им ВИЧ-резистентных гемопоэтических стволовых клеток.

В США благодаря высокому уровню развития здравоохранения в качестве потенциальных реципиентов для трансплантационного лечения ВИЧ-инфекции рассматриваются только пациенты с лейкомиями или лимфомами. Именно их сейчас рекрутируют для проведения клинических испытаний, которые начались 30 ноября 2013 года и продлятся два года – до 30 ноября 2015 года [55].

За это время в России от СПИДа умрут примерно 50 тысяч человек. При наличии нескольких тысяч ВИЧ-резистентных доноров несколько тысяч из них можно было бы спасти. Или хотя бы попытаться спасти.

Таблица 2

Статистические показатели эпидемии ВИЧ в России [1, 2]

Показатели	Год		
	2011	2012	2013
Кумулятивное количество зарегистрированных ВИЧ-положительных лиц (на 31 декабря)	677956	755677	833573
Число новых зарегистрированных случаев ВИЧ-инфекции (за год)	62387	70453	77896
Годовой прирост новых случаев ВИЧ-инфекции, %	12,9	10,8	10,1

Говорить о стабилизации эпидемии ВИЧ в России можно будет только после прекращения прироста регистрируемых случаев и после того, как количество умирающих больных сравняется с количеством регистрируемых носителей ВИЧ (за вычетом ~3% случаев суицида, передозировки наркотиков и т.п.). Если исходить из показателей 2013 года, то смертность должна превысить 75 тысяч человек в год. Сейчас этот уровень примерно в 3 раза ниже, что обусловлено особенностями национальной статистики и молодостью эпидемии.

Заключение

Летальность при трансплантации гемопоэтических стволовых клеток превышает 40%, поэтому исцеление Берлинского пациента можно считать простым везением. Но дело может быть не только в везении. У ВИЧ-резистентных мутантов блокирована активация Т-хелперных лимфоцитов хемокинами. В результате они тяжелее переносят некоторые вирусные заболевания (лихорадку Западного Нила [56], клещевой энцефалит [57], грипп [58] и др.), но их гемопоэтические клетки при пересадке дают меньше осложнений, чем обычные [59]. Возможно, это обстоятельство и сделало Тимоти Брауна «везунчиком».

Данное свойство носителей мутации $\Delta 32$ послужило основанием для анализа возможности применения антиретровирусного препарата Maraviroc (блокатора CCR5) для лечения РТПХ [60, 61] и проведения клинических испытаний “Maraviroc for GVHD Prevention” [62]. Благодаря этому блокаторы CCR5, разрабатываемые для лечения ВИЧ-инфицированных больных, могут стать новым поколением лекарственных средств, применяемых для лечения РТПХ. За подобное лечение придётся платить столько же, сколько и за антиретровирусную терапию. Но если донор будет ВИЧ-резистентным, то платить не придётся.

Благодаря такой особенности мутации $\Delta 32$ всех её гомозиготных носителей можно считать элитными донорами, требующимися не только для трансплантационного лечения сотен тысяч ВИЧ-инфицированных, но и для лечения тысяч онкогематологических больных. Это удваивает актуальность создания Национального регистра ВИЧ-резистентных доноров.

Авторы выражают благодарность А.В. Покровской, А.В. Рылову, Т.А. Сусловой, А.В. Чемерису и А.К. Шевченко за просмотр рукописи и многочисленные полезные советы, а также А.Л. Алянскому, Л.Н. Бубновой, Н.И. Воронцовой, Г.А. Зайцевой, Е.Э. Кудиновой, И.А. Кофиади, М.А. Логиновой, А.Г. Никитину и А.Н. Тороповскому за предоставление информации, использованной при подготовке данного обзора.

Литература

1. Покровский В.В., Ладная Н.Н., Соколова Е.В., Буравцова Е.В.. ВИЧ-инфекция. Информационный бюллетень №38 Федерального научно-методического центра по профилактике и борьбе со СПИДом. - 2013. Доступен по адресу: http://www.hivrussia.org/files/bul_38.pdf
2. Справка «ВИЧ-инфекция в Российской Федерации в 2013 г.». Федеральный научно-методический центр по профилактике и борьбе со СПИДом. Доступна по адресу: <http://www.hivrussia.org/files/spravka311213.doc>
3. Madec Y., Boufassa F., Porter K., et al. Collaboration in Eurocoord. Natural history of HIV-control since seroconversion // AIDS. - 2013; 27(15): 2451-60.
4. Walker B.D. Elite control of HIV Infection: implications for vaccines and treatment // Top HIV Med. - 2007; 15(4): 134-6.

5. Колбин А.С., Курылев А.А., Богун С.В. и соавт. Международные данные фармакоэкономических исследований при ВИЧ-инфекции и СПИД // Оценка медицинских технологий. – 2010; 2: 16-21.
6. Voronin Y., Snow W. Organizing the HIV vaccine development effort // Curr. Opin. HIV AIDS. - 2013; 8(5): 369-75.
7. Кофиади И.А., Ребриков Д.В., Трофимов Д.Ю., Алексеев Л.П., Хаитов Р.М. Анализ распространения ВИЧ-протективных аллелей среди этнических групп, проживающих на территории России и сопредельных государств // Российский аллергологический журнал. – 2007; 3(1): 10-1.
8. Lai Y. CCR5-targeted hematopoietic stem cell gene approaches for HIV disease: current progress and future prospects // Curr. Stem Cell Res. Ther. - 2012. 7(11): 310-7.
9. Hütter G., Nowak D., Mossner M., et al. Long-term control of HIV by CCR5 Delta32/Delta32 stem-cell transplantation // N. Engl. J. Med.- 2009; 360: 692–8.
10. Allers K., Hütter G., Hofmann J., et al. Evidence for the cure of HIV infection by CCR5D32/D32 stem cell transplantation // Blood. - 2011; 117(10): 2791–9.
11. U of M researchers conduct world's first cord blood transplant aimed at curing leukemia and HIV/AIDS. Пресс-релиз доступен по адресу: <http://www.healthtalk.umn.edu/2013/04/23/u-of-m-researchers-conduct-worlds-first-cord-blood-transplant-aimed-at-curing-leukemia-and-hiv/AIDS/>
12. Robinett P., Hildebrand S., Rall G., et al. A gift for life. WMDA handbook for blood stem cell donation. World Marrow Donor Association, 2013. – P.26-7.
13. Pediatric patient dies after undergoing historic transplant at U of M. Пресс-релиз доступен по адресу: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/gv/mhc/ihw.g.cgi>
14. Petersdorf E.W. Optimal HLA matching in hematopoietic cell transplantation // Curr. Opin. Immunol. - 2008; 20(5): 588-93.
15. Fürst D., Müller C., Vucinic V., et al. High-resolution HLA matching in hematopoietic stem cell transplantation: a retrospective collaborative analysis // Blood. – 2013; 122(18): 3220-9.
16. Wang N., Hammarström L. IgA deficiency: what is new? // Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol. - 2012; 12(6): 602-8.
17. Hütter G., Ganepola S. Eradication of HIV by transplantation of CCR5-deficient hematopoietic stem cells // The ScientificWorld Journal. - 2011; 11: 1068–76.
18. Shankarkumar U., Pawar A., Ghosh K. Implications of HLA sequence-based typing in transplantation // J. Postgrad. Med. - 2008; 54(1): 41-4.
19. Smith L.K . HLA typing by direct DNA sequencing // Methods Mol. Biol. - 2012; 882: 67-86.
20. Gabriel C., Fürst D., Faé I., et al. HLA typing by next-generation sequencing - getting closer to reality // Tissue Antigens. - 2014; 83(2): 65-75.
21. Lu Y., Boehm J., Nichol L., et al. Multiplex HLA-typing by pyrosequencing // Methods Mol. Biol. - 2009; 496: 89-114.
22. Niklas N., Pröll J., Danzer M., et al. Routine performance and errors of 454 HLA exon sequencing in diagnostics // BMC Bioinformatics. - 2013; 14: 176.
23. Danzer M., Niklas N., Stabentheiner S., et al. Rapid, scalable and highly automated HLA genotyping using next-generation sequencing: a transition from research to diagnostics // BMC Genomics. - 2013; 14: 221.
24. Gene By Gene, LTD. Whole genome sequencing. Информация доступна по адресу: <https://www.genebygene.com/#>
25. Gene By Gene, LTD. Whole exome sequencing. Информация доступна по адресу: <http://www.dnadt.com/products.aspx>
26. Science Exchange Inc. Whole exome sequencing. Информация доступна по адресу: <https://www.scienceexchange.com/services/whole-exome-seq>
27. Science Exchange Inc. Whole genome sequencing. Информация доступна по адресу: <https://www.scienceexchange.com/services/whole-genome-sequencing>
28. Pasaniuc B., Rohland N., McLaren P.J., et al. Extremely low-coverage sequencing and imputation increases power for genome-wide association studies // Nat. Genet. - 2012; 44(6): 631-5.
29. Зубов В.В. Секвенирование по Ротбергу (потенциал полупроводникового секвенирования) // Биомика. - 2013; 5(1): 48-61.
30. Rothberg J.M., Hinz W., Rearick T.M., et al. An integrated semiconductor device enabling non-optical genome sequencing // Nature. - 2011; 475(7356): 348-52.

31. Merriman B., Ion Torrent R&D Team, Rothberg J.M. Progress in Ion Torrent semiconductor chip based sequencing // *Electrophoresis*. - 2012; 33(23): 3397-417.
32. Ion AmpliSeq Exome Certified Service Provider Program. Информация доступна по адресу: <http://www.lifetechnologies.com/europe/en/home/life-science/sequencing/next-generation-sequencing/certified-service-providers-program.html>
33. Schmidt A.H., Sauter J., Pingel J., Ehninger G. Toward an optimal global stem cell donor recruitment strategy // *PLoS ONE*. - 2014; 9(1): e86605.
34. Bone Marrow Donors Worldwide (BMDW). Информация доступна по адресу: https://www.bmdw.org/numberofdonors/number_donors.php
35. Договор Русфонда и СПбГМУ №37 от 05.08.2013. Информация доступна по адресу: <http://www.rusfond.ru/registr/004>
36. Burke V.P., Boyd M.P., Imrey H., et al. CCR5 as a natural and modulated target for inhibition of HIV // *Viruses*. - 2013; 6(1): 54-68.
37. Marrow Donor Program / Be The Match. Информация доступна по адресу: <https://bethematchclinical.org/WorkArea/DownloadAsset.aspx?id=4442>
38. Кобзева И.В. Комплексная оценка качества криоконсервированных гемопоэтических стволовых клеток пуповинной крови для клинического применения/ Дисс. ... канд. мед. наук., - СПб., 2014. – 124 с.
39. Помогут ли стволовые клетки победить онкологические заболевания крови. 812'ONLINE, - 2013. Информация доступна по адресу: <http://www.online812.ru/2013/04/15/015/>
40. Petz L.D., Redei I., Bryson Y., et al. Hematopoietic cell transplantation with cord blood for cure of HIV infections // *Biol. Blood Marrow Transplant*. - 2013; 19(3): 393-7.
41. Kwon M., Kuball J.H., Ellerbroek P., et al. Single cord blood transplantation combined with an HLA mismatched third party donor for high-risk hematological patients with HIV infection // *Abstracts of 55th ASH Annual Meeting and Exposition, 2013*. Информация доступна по адресу: <https://ash.confex.com/ash/2013/webprogram/Paper64016.html>
42. Scaradavou A. HLA-mismatched, noninherited maternal antigen-matched unrelated cord blood transplantations have superior survival: how HLA typing the cord blood donor's mother can move the field forward // *Biol. Blood Marrow Transplant*. - 2012; 18(12): 1771-5.
43. Rocha V., Spellman S., Zhang M.J., et al. Effect of HLA-matching recipients to donor noninherited maternal antigens on outcomes after mismatched umbilical cord blood transplantation for hematologic malignancy // *Biol. Blood Marrow Transplant*. - 2012; 18(12): 1890-6.
44. Owen R.D., Wood H.R., Foord A.G., et al. Evidence for actively acquired tolerance to Rh antigens // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. - 1954; 40(6): 420-4.
45. Услуги лаборатории клинической иммунологии РДКБ. HLA-генотипирование методом секвенирования (SBT) одного человека по 4 локусам (п. 522). Информация доступна по адресу: <http://rdkb.ru/files/file2082.xls>
46. Отчёт Института экономики здравоохранения НИУ ВШЭ о НИР по теме «ВИЧ-инфекция и СПИД в России – оценка социально-экономических потерь общества, эффективность медикаментозной терапии, совершенствование институциональной базы борьбы с этой инфекцией». Цит. по: http://spdfund.org/files/position_paper_tasp.pdf
47. Lange V., Böhme I., Hofmann J., et al. Cost-efficient high-throughput HLA typing by MiSeq amplicon sequencing // *BMC Genomics*. – 2014; 15: 63.
48. Heger M. CHOP Launches NGS-based HLA Typing Service // *Clinical Sequencing News*. - 2014. Информация доступна по адресу: <http://www.genomeweb.com/sequencing/chop-launches-ngs-based-hla-typing-service>
49. Bialozynski C., Dinauer D., Gifford B., et al. Development of an HLA typing method for the Ion Torrent PGM next generation sequencing platform // *Human Immunology*. – 2013; 74 (Suppl.): 140.
50. Shi J., Dinauer D., Radick M., et al. Next generation HLA typing software as Torrent Server plug-in on Ion PGM // *Human Immunology*. - 2013; 74 (Suppl.): 158.
51. Saudi Human Genome Program. Информация доступна по адресу: <http://rc.kfshrc.edu.sa/sgp/Index.asp>
52. Human Longevity Inc. Human Genomics. Информация доступна по адресу: <http://www.humanlongevity.com/science-technology/human-genomics/>
53. Regeneron and Geisinger Health System Announce Major Human Genetics Research Collaboration; 2014. Информация

доступна по адресу:
<http://investor.regeneron.com/releasedetail.cfm?ReleaseID=818844>

54. Покровская А.В. Продолжительность течения инфекции, вызываемой вирусом иммунодефицита человека, и влияющие на нее факторы / Дисс. ... канд. мед. наук. М.; - 2011. 138 с.

55. Clinical trials: Allogeneic Transplant in HIV Patients. Информация доступна по адресу:

<http://clinicaltrials.gov/ct2/show/record/NCT01410344?term=HIV+delta+32&rank=1>

56. Lim J.K., Murphy P.M. Chemokine control of West Nile virus infection // Exp. Cell Res. - 2011; 317(5): 569-74.

57. Kindberg E., Mickiene A., Ax C., et al. A deletion in the chemokine receptor 5 (CCR5) gene is associated with tickborne encephalitis // J. Infect. Dis. - 2008; 197(2): 266-9.

58. Keynan Y., Juno J., Meyers A., et al. Chemokine receptor 5 Δ 32 allele in patients with severe pandemic (H1N1) 2009 // Emerg. Infect. Dis. - 2010; 16(10): 1621-2.

59. Bogunia-Kubik K., Duda D., Suchnicki K., Lange A. CCR5 deletion mutation and its association with the risk of developing acute graft-versus-host disease after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation // Haematologica. - 2006; 91(12): 1628-34.

60. Reshef R., Luger S.M., Hexner E.O., et al. Blockade of lymphocyte chemotaxis in visceral graft-versus-host disease // N. Engl. J. Med. - 2012; 367(2): 135-45.

61. Ganetsky A., Miano T.A., Hughes M.E., et al. An evaluation of a pharmacokinetic interaction between tacrolimus and maraviroc in allogeneic stem cell transplant recipients. Abstracts of BMT Tandem Meetings. - 2014. Информация доступна по адресу: <https://bmt.confex.com/tandem/2014/webprogram/Paper3724.html>

62. Clinical trials: Phase II Maraviroc for GVHD Prevention. Информация доступна по адресу: <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01785810>

PROSPECTS FOR CREATING THE REGISTER OF HIV-RESISTANT DONORS

V.V. Zubov¹, Yu.G. Ioffe², D.Yu. Klyuchnikov³

¹ Institute of Theoretical and Experimental Biophysics RAS, Puschino; ² Karelian Register of Unrelated Hematopoietical Marrow Donors, Petrozavodsk; ³ Samara Regional Center for Family Planning and Reproduction, Samara

Resume

Over the last years the transplant treatment of HIV/AIDS based on transplantation of HIV-resistant hematopoietic stem cells with Δ 32 mutation in CCR5 gene attracts a lot of interest. The homozygous carriers of this mutation reach about 1-2% of total population in Russia. For their search the development of specialized HIV-resistant hematopoietic cells donor registry and cord blood units on the basis of already existing registries and cord blood banks is needed.

In the presented review the history of the first successful transplant treatment of HIV/AIDS ("The Berlin patient") and the development of this kind of treatment in USA and Germany were discussed. The risks obstructed to widespread implementation of this approach in Russia were described. The information about number of potential donors of hematopoietic stem cells in Russian registries and about the number of cord blood units in cord blood banks was presented. The approximate cost of search and HLA-typing of Δ 32 mutation carriers was calculated. And the prospects of cost-cutting of HLA-typing using modern high throughput DNA sequencing were considered.

Keywords: HIV, AIDS, HIV-resistance, CCR5 Δ 32, HSC transplantation, NGS, high throughput sequencing, HLA typing, hematopoietic stem cell donorship, bone marrow donor registries