Наш опыт по заготовке, тестированию и хранению гемопоэтических клеток пуповинной крови

К.М. Абдулкадыров, Н.А. Романенко, Е.А. Селиванов
ФГУ Российский НИИ гематологии и трансфузиологии
Министерства здравоохранения и социального развития, Санкт-Петербург

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

Последние два десятилетия в биологии и медицине ознаменовались повышенным интересом к изучению стволовых клеток организма человека: выращивание (культивирование) их in vitro, определение способности их к делению и специализации, применение в клинической медицине для лечения некоторых фатальных заболеваний, таких, как солидные опухоли, острые и хронические лейкозы, апластическая анемия, наследственные нарушения метаболизма и иммунной системы, аутоиммунные заболевания, сахарный диабет, инсульты, травмы спинного мозга, патология миокарда и другие. Источником стволовых клеток могут быть костный мозг, стимулированные периферические гемопоэтические клетки, жировая ткань, эпителиальные клетки слизистой оболочки носоглотки в области «обонятельного эпителия», плацентарная (пуповинная) кровь, плацента. Получение стволовых клеток из первых четырех источников несколько затруднительно из-за необходимости оперативного вмешательства и использования анестезии. Пуповинная кровь (ПК) собирается без риска для новорожденного и его матери. Поэтому в статье мы хотим подробно остановиться на одном из этапов доклинического использования плацентарной крови, поделиться своим опытом по заготовке, лабораторному тестированию и хранению стволовых клеток.

Отбор образцов пуповинной крови для заготовки

В предродовый период у роженицы выясняют анамнез на предмет ранее переносимых трансмиссивных инфекций: вирусные гепатиты, сифилис, ВИЧ-инфекция, малярия, возвратный тиф, лептоспироз, токсоплазмоз. Обычно все женщины при поступлении в роддом уже обследованы на HBs антиген, сифилис, ВИЧ-инфекцию. При положительных тестах или указаниях в анамнезе на перенесенную одну из перечисленных инфекций заготовку крови не проводят. Кроме этого, не рекомендуется проведение сбора крови, если у матери имеет место инфекционно-септическое заболевание, в виду высокого риска инфицирования пуповинной крови. Не имеет смысла заготавливать образцы крови, если общий объем ее, полученный при эксфузии, составляет менее 40–50 мл или абсолютное содержание ядросодержащих клеток (ЯСК) менее $0{,}5 \times 10^9$ в единице.

Из 110 обследованных нами образцов по объему не подошло 6 (объем составил от 18 до 40 мл), а по содержанию ЯСК, которых было менее $0{,}5 \times 10^9$ в единице, не подошло 17 образцов пуповинной крови.

Заготовка и транспортировка пуповинной крови

Технология получения ПК из вены пуповины заключается в том, что кровь из плаценты по соединительным трубкам (дренажу) оттекает в контейнер с гемоконсервантом под действием силы тяжести, т.е. самопроизвольно. При этом контакт крови с окружающей средой практически отсутствует. Для эксфузии ПК используют готовые системы с мешком объемом 150 мл, в котором содержится 30 мл антикоагулянта – Davol suction evacuator (CR Bard, Cranston, RI). Можно использовать и «Гемакон» 500/300 или «Компопласт» 300 с 30 мл глюгицира в качестве гемоконсерванта.

Эксфузию крови осуществляют при естественных родах в родильном зале, а после кесарева сечения – в операционной или предоперационной. При естественных родах после рождения ребенка и отделения его от последа зажимом производят эксфузию крови путем пережатия пупочного канатика. Пуповинный канатик на протяжении 10–12 см в месте предполагаемой пункции тщательно обрабатывают 5% настойкой йода и 70% раствором этилового спирта или раствором АХД. После этого производят пункцию вены пуповинного канатика иглой, соединенной с «Гемаконом» 500/300 или «Компопластом». Контейнер с гемоконсервантом располагают на 50–60 см ниже уровня расположения тела роженицы, чтобы кровь самопроизвольно оттекала по соединительным трубкам в контейнер. Вся процедура эксфузии обычно длится не более 5 мин. При наступлении обескровливания плаценты соединительную трубку от контейнера перекрывают.

В случае, когда плацента уже выделена из полости матки или после кесарева сечения, ее укладывают на специальную рамку с отверстием для пуповинного канатика плодной поверхностью книзу. При отсутствии рамки сбор ПК осуществляют при помощи ассистента, который бережно держит плаценту плодной поверхностью книзу, приподняв ее на 50–70 см выше уровня расположения контейнера. Обработку и дезинфекцию поверхности пуповинного канатика, пункцию вены и дренаж осуществляют таким же способом, как описано выше. В этом случае очень важно эксфузию крови осуществлять незамедлительно. Это связано с тем, что во время операции при ручном отделении плаценты от слизистой оболочки матки нередко происходит массивное механическое повреждение маточной поверхности последа, что приводит к высвобождению и попаданию в ПК большого количества тканевого тромбопластина, который запускает механизм внутрисосудистого свертывания крови. В таких случаях пуповинная кровь может свернуться еще до начала эксфузии крови. Так, по результатам наших исследований из 42 заготовок крови из уже выделенной плаценты (после кесарева сечения) в 5 случаях не удалось получить кровь объемом более 10 мл вследствие того, что она свернулась внутри сосудов. В среднем, из 96 заготовленных доз ПК получился объем 76,5±23,7 мл (от 40 до 141 мл) при абсолютном содержании ЯСК $1{,}13 \pm 0{,}57 \times 10^9$.

Единицы ПК доставляются из роддома в лабораторию в специальном термоконтейнере (сумке–холодильнике), который позволяет обеспечить стабильную температуру крови на уровне от +8 до +22°С на протяжении более 2 часов. С момента заготовки пуповинной крови до замораживания выделенных из нее гемопоэтических клеток не должно проходить более 24 часов. При превышении этих сроков хранения крови наблюдается значительная потеря жизнеспособности ЯСК, а при сроках более 36 часов отмечается гибель гранулоцитарных клеток с выходом в плазму крови большого количества внутриклеточных лизосомальных ферментов, которые повреждают в том числе и кроветворные клетки. В своих исследованиях мы установили, что при длительности хранения до 24 часов витальность клеток, определяемая по трипановому синему, составляла 99,0±1,0% (n=32), при хранении от 24 до 36 часов – 97,4±3,9% (n=12) и от 36 до 42 часов сохранность клеток составила 92,8±5,7% (n=6).

Получение гемопоэтических клеток

Метод сепарации пуповинной крови используется для отделения ЯСК, в том числе – гемопоэтических, от основной массы крови – эритроцитов и плазмы. Необходимость сепарации ПК с одной стороны вызвана тем, что необходимо удалить эритроциты, которые при несовместимости по групповым антигенам (АВО, Rh и др.) могут вызывать у реципиента гемолитическую реакцию. С другой стороны, при удалении плазмы и эритроцитов, уменьшается общий объем замораживаемого образца от 150–200 мл до 20–25 мл. Кроме этого, существенно снижается содержание свободного гемоглобина в компоненте после размораживания, что также уменьшает осложнения при трансфузии клеточной взвеси.

За последние два десятилетия разработано много различных методов выделения ЯСК – на градиенте плотности (фиколл, перколл, buyant density solution BDS72), с использованием седиментирующего вещества (желатина, гидроксиэтилкрахмал, метилцеллюлоза), простым центрифугированием с разделением на фракции [1, 4].

Мы провели исследования с гидроксиэтилкрахмалом (HES) и желатиной и получили вполне удовлетворительные результаты, практически не различающиеся между собой. Однако, учитывая, что использовался желатин для лабораторных исследований, мы не можем рекомендовать его для седиментации образцов ПК и последующего клинического применения в качестве компонента крови. Поэтому приводим свои результаты по использованию гидроксиэтилкрахмала (HES–steril® 10%, Fresenius AG* Bad Homburg) для сепарации пуповинной крови. Длительность двукратной процедуры седиментации составила по 45 мин для каждой единицы ПК. При седиментации нами получено 83,1±9,6% ЯСК, жизнеспособность которых составляла по трипановому синему 95,5±4,3%; сохранность мононуклеарной фракции лейкоцитов была 83,4±14,1%, КОЕ–ГМ–1,34±0,81 (0,19–3,17) $\times 10^3$/мл и число клеток с иммунофенотипом $CD34^+$ составило 3,53±2,37$\times 10^4$ из каждого мл крови (n=24). Таким образом, из отобранных единиц пуповинной крови, объем которых составлял в среднем 93,2±21,9 мл выделено 1,30±0,66$\times 10^9$ ядросодержащих элементов, 0,44±0,15$\times 10^9$ мононуклеаров, 0,93±0,91$\times 10^5$ КОЕ–ГМ, клеток $CD34^+$ – 3,29±2,21$\times 10^6$.

Криоконсервирование клеток пуповинной крови

Не менее ответственным считается процесс замораживания и длительное хранение кроветворных клеток в жидком азоте или в его парах при ультранизких температурах (от –150°С до –196°С). На эти процессы влияет ряд факторов, прежде всего – состав ограждающего раствора и скорость охлаждения клеточной взвеси. В своих работах Donaldson C. и соавт. (1996), исследуя эффективность различных концентраций диметилсульфоксида (ДМСО) – основного интрацеллюлярного криопротектера клеток (от 2,5% до 10%) в сочетании с 4% раствором HES при криоконсервировании, показали, что сохранность клеток с иммунологическим типом $CD34^+$ практически не изменялась при использовании концентраций ДМСО от 5% до 10% в сочетании с HES и без него. Однако при снижении ДМСО с 5% до 2,5%, по их данным, отмечалась гибель гемопоэтических клеток ПК, сохранность которых падала с 85,4% до 12,2% [2]. Аналогичные результаты показали и Richter E. с соавторами (1998), которые установили, что под защитой ограждающих растворов, содержащих 5% и 10% в конечной концентрации ДМСО с аутогенной сывороткой, удалось обеспечить удовлетворительную сохранность гемопоэтических клеток [3].

Вторым не менее важным для сохранения гемопоэтических клеток в функционально активном состоянии является скорость охлаждения клеточной взвеси, особенно в период фазы кристаллизации. В этот период обычно происходит большая потеря клеток. Для предотвращения гибели клеток были найдены оптимальные программы охлаждения, обеспечивающие достаточную сохранность клеточных структур. В настоящий момент общепринятым считается, что скорость охлаждения должна составлять от 1°С до 3°С в мин. Кристаллизация клеточной взвеси происходит обычно в температурном диапазоне от –3°С до –15°С. В этот период происходит выброс латентного тепла и в замораживаемой клеточной взвеси температура повышается на 1–5°С. Чтобы предотвратить повреждение клеточных мембран кристаллами льда, период кристаллизации необходимо сократить до 1,5–2 минут, что обеспечивается дополнительной подачей паров жидкого азота. В этот период разница температур замораживаемого образца и камеры программного замораживателя может составлять от 15°С до 40°С. Такой подход к решению проблемы замораживания дает большие возможности для создания простых и эффективных методов криоконсервирования.

Нами проведены исследования по криоконсервированию кроветворных клеток пуповинной крови с использованием двух видов ограждающих растворов. Основную защиту клеток обеспечивал 10% ДМСО в конечной концентрации. В первом случае использовали ДМСО и аутологичную сыворотку, во втором добавляли гидроксиэтилкрахмал (4% HES в конечной концентрации с клеточной взвесью). Замораживание проводили в программном замораживателе ЗК 1.00.00.00 (Харьков). Скорость охлаждения составляла 1°С/мин. Температура начала кристаллизации отмечалась на уровне –9,4±2,9°С (от –5,3°С до –13,2°С). Выброс латентного тепла (фаза кристаллизации) длился в течение 23″ – 2′40″, а повышение температуры клеточной взвеси внутри проб доходило до –5,0±0,4°С (от –4,2°С до –5,7°С). Время полной кристаллизации составляло, в среднем, 3′39″±1′57″. Разница температур камеры и опытного образца клеточной взвеси составляла 15°С. Оценку сохранности клеток проводили при помощи подсчета жизнеспособных клеток после суправитального окрашивания их трипановым синим (позволяет оценить жизнеспособность, прежде всего, зрелых клеток), число ЯСК, мононуклеарных клеток (МНК) и колониеобразующей способности гранулоцитарно–моноцитарных клеток (КОЕ–ГМ). Таким образом, под защитой ограждающего раствора 10% ДМСО (в конечной концентрации) и аутологичной сыворотки (n=16) витальность клеток при суправитальном окрашивании составила 76,5±17,4%, Сохранность ЯСК и МНК, соответственно, 88,7±14,1% и 92,0±10,2%, а КОЕ–ГМ – 95,0±14,1%. Сохранность клеток

при усилении ограждающего раствора 4% HES в конечной концентрации (n=10) составила: по трипановому синему – 72,3±15,2%, ЯСК – 91,7±10,6%, МНК – 92,6±18,5% и КОЕ–ГМ – 94,5±13,6%. Результаты нашего исследования достоверной разницы не выявили (P>0,1). Однако нами показано, что оба ограждающих раствора при программном криоконсервировании клеток являются вполне эффективными, позволяющими обеспечить удовлетворительную сохранность гемопоэтических клеток пуповинной крови.

Лабораторное тестирование пуповинной крови для использования ее в клинической медицине

Использование ПК и ее компонентов, прежде всего, гемопоэтических клеток, в клинической практике требует ее лабораторного тестирования на выявление бактериального загрязнения, вирусного и паразитарного персистирования, а также HLA типирования и исследования на содержание гемопоэтических предшественников [5].

Следуя Европейским стандартам безопасности приготовления и использования компонентов крови (7–я редакция, 2001 г.), каждый образец ПК тестируется на групповую принадлежность крови по АВО и Rh(D), проводится HLA–типирование, определение АлАТ, исследуется на наличие HBs антигена, антител к вирусному гепатиту С и цитомегаловирусной инфекции (ЦМВ), сифилису, Т–клеточному лейкозу человека (HTLV), а также определяют жизнеспособность лейкоцитов [6]. Кроме этого, осуществляют бактериологический посев на стерильность. Для более достоверной диагностики ВИЧ–инфекции и ЦМВ предлагают постановку полимеразной цепной реакции (ПЦР).

Для полного лабораторного тестирования ПК необходимо около 10 мл крови: вышеперечисленные исследования требуют до 4 мл крови, а оставшиеся 6 мл центрифугируют. Полученную плазму замораживают и хранят в холодильниках при –40°С или ниже, а мононуклеарные клетки выделяют в градиенте плотности (фиколл), криоконсервируют и в последующем используют для дальнейшего тестирования (постановка ПЦР на ЦМВ, ВИЧ, повторное определение HLA генотипа). Замороженные МНК хранят в двух пробирках в отдельных биологических хранилищах в жидком азоте или его парах. Ниже приводится подробная таблица лабораторных тестов пуповинной крови до и после криоконсервирования, принятых в Российском НИИ гематологии и трансфузиологии.

При отрицательных тестах по вышеперечисленным параметрам ПК можно использовать в клинике. Исследования клеток после их размораживания необходимы для оценки качества трансплантата, прогнозирования времени приживления кроветворных клеток и восстановления гемопоэза у реципиента.

Таблица. **Лабораторное тестирование пуповинной крови**

Изучаемые показатели	После заготовки	После сепарации	После размораживания
Объем пуповинной крови	+	+	+
Количество ЯСК	+	+	+
Количество МНК	+	+	+
Количество КОЕ-ГМ		+	+
Количество $CD34^+$	±	+	+
Содержание эритроцитов	+		
Примесь свободного гемоглобина	+	+	+
Жизнеспособность			
ЯСК	+	+	+
АлАТ	+		
АсАТ	+		
Билирубин	+		
Бактериальное загрязнение	+		+
HBs Ag	+		
Антитела к вирусному гепатиту С	+		
Антитела к бледной трепонеме	+		
Антитела к ВИЧ	+		+ (ПЦР)
Антитела к ЦМВ	+		+ (ПЦР)
Антитела к токсоплазмозу	+		
Антитела к HTLV –I и -II	+		±
HLA- фенотип (I класса)	+		
HLA- генотип (II класса)	±	+	

ЛИТЕРАТУРА:

1. Абдулкадыров К.М., Романенко Н.А., Старков Н.Н. Получение и клиническое применение периферических гемопоэтических стволовых клеток из пуповинной крови. Вопросы онкологии 2000; 46(5): 513–20.
2. Donaldson C., Armitage W.J., Denning–Kendall P.A. Optimal cryopreservation of human umbilical cord blood. Bone Marrow Transplant. 1996; 18(4): 725–31.
3. Richter E., Eichler H., Raske D. et al. 5% Me2SO is sufficient to preserve stem cells derived from cord blood. Bone Marrow Transplant. 1998; 22(Suppl. 1): S16.
4. Perutelli P., Catellani S., Scarso L. et al. Processing of human cord blood by three different procedures for red blood cell depletion and mononuclear cell recovery. Vox. Sang. 1999; 76(4): 237–40.
5. Абдулкадыров К.М., Романенко Н.А. Заготовка и лабораторное тестирование гемопоэтических клеток пуповинной крови. Трансфузиология 2003; 4(1): 25–33.
6. Guide to the preparation, use and quality assurance of blood components/2001/ 7th edition: 232.