

ОБЗОРЫ

Использование пуповинной крови как альтернатива донорским трансфузиям в неонатологии

Т.А. Федорова, М.В. Аппалуп

ГУ Научный Центр Акушерства, гинекологии и перинатологии РАМН,

Отделение гравитационной хирургии крови

В обзоре представлены современные данные о получении и использовании стволовых клеток пуповинной крови в неонатологии.

Пуповинная кровь всегда привлекала внимание акушеров и неонатологов, связанное первоначально с диагностическими задачами.

Однако большой интерес к пуповинной крови, возникший в последнее десятилетие, обусловлен особенностями ее клеточного состава. Уже в 70-х годах XX столетия было известно, что данная среда содержит большое количество клеток-предшественников, по сравнению с периферической кровью детей и взрослых. Среди клеток-предшественников выделяют стволовые клетки — наименее зрелые, относящиеся к длительно живущим популяциям и способные поддерживать свою численность за счет пролиферации, а также прогениторные клетки — коротко живущие, быстро дифференцирующиеся и дающие начало функционально активным клеткам крови и иммунной системы. Прогениторные клетки обеспечивают быстрое восстановление иммунной функции в организме реципиента после миелоабляции, а стволовые клетки ответственны за формирование всей самоподдерживающейся кроветворной системы.

Заготовка и использование гемопоэтических стволовых клеток пуповинной крови для пересадок имеет целый ряд преимуществ перед другими источниками кроветворной ткани. Прежде всего, отсутствует угроза причинения вреда здоровью матери и ребенка. Кроме того, при ее заготовке не требуется общая анестезия, а риск передачи некоторых латентных инфекций значительно ниже, чем при использовании костного мозга или периферических стволовых клеток взрослых доноров. Появляется практически неограниченная возможность длительного хранения гемопоэтических ПК в замороженном состоянии, что позволяет накапливать и сохранять различные HLA-типы клеток, в то время как потенциальные доноры костного мозга со временем выбывают из Регистра по разным причинам. Замороженные образцы, находящиеся в банках пуповинной крови, могут предоставляться по требованию в любой центр трансплантации, что устранит задержки, которые нередко возникают из-за затрудненного поиска донора и заготовки костного мозга.

Вместе с тем, основным недостатком пуповинной крови, как источника стволовых клеток, является ее исходно малое количество и невозможность проведения повторного забора, поэтому и общее количество стволовых клеток, получаемых из нее, сравнительно невелико.

Проведенные в нашей стране и за рубежом исследования показали, что объем пуповинной крови зависит от множества факторов: срока гестации, при котором проводится родоразрешение, веса плода и плаценты, характера патологии, осложняющей течение беременности, способа родоразрешения и, наконец, методики сбора крови.

Перед проведением сбора пуповинной крови, независимо от конечной его цели, необходимо получить согласие беременной женщины. Тщательно изучается соматический, акушерско-гинекологический и семейный анамнез беременной для выявления возможных генетических нарушений и инфекционных заболеваний, передающихся гематогенным путем. Каждую беременную обязательно обследуют на носительство HBS-Ag, наличие антител к возбудителям гепатита С, ВИЧ-инфекции, сифилиса, Т-клеточного лейкоза человека и цитомегаловирусной инфекции. При выявлении положительных серологических реакций у беременной забор пуповинной крови не проводится.

Сбор пуповинной крови осуществляется после рождения ребенка и отделения его от последа, при этом большое значение имеет время наложения зажимов на пуповину. В ряде работ было доказано, что если пуповина клеммируется позже 30 секунд после рождения ребенка, то объем получаемой крови уменьшается практически вдвое. Итальянские ученые получили интересные данные о положительном влиянии раннего помещения новорожденного на живот матери при самопроизвольных родах на увеличение объема пуповинной крови, что, по всей видимости, связано с повышением внутрибрюшного давления.

Существуют открытый и закрытый способы сбора пуповинной крови. При открытом способе кровь собирается в стерильную емкость самотеком, после обработки конечного участка пуповины дезинфицирующим раствором. Объем собранной таким способом крови оказывается существенно большим, чем при сборе закрытым способом, поскольку кровь поступает в емкость одновременно из артерий и вены пуповины, имеющих большой диаметр. Однако при таком способе забора риск микробной контаминации вагинальной флорой составляет 20–30%, что на порядок выше, чем при закрытом способе.

Большинство авторов сходятся во мнении, что оптимальным является закрытый способ сбора пуповинной крови, сводящий риск бактериальной контаминации до 1–2%. В настоящее время для сбора пуповинной крови используют специальные закрытые трансфузионные системы, содержащие антикоагулянт и оснащенные дренажной иглой, или шприцы объемом 50 мл, частично заполненные антикоагулянтом. Сбор крови в трансфузионную систему осуществляется путем дренирования иглой, самотеком, тогда как при сборе шприцом имеет место активная эксфузия и отрицательное давление, создаваемое поршнем шприца, может оказывать повреждающее действие на клетки крови. Другим недостатком шприцевого метода является необходимость повторной пункции после заполнения первого шприца, что повышает риск микробной контаминации, удлиняет время процедуры и создает определенные неудобства медицинскому персоналу, особенно в случае кесарева сечения. Тем не менее, при соблюдении всех правил асептики и антисептики этот

метод достаточно эффективен и безопасен и с успехом применяется в ряде учреждений, поскольку позволяет получить больший объем крови по сравнению со сбором в трансфузионные системы.

Из имеющихся на сегодняшний день антикоагулянтов предпочтительно использование CPDA, состоящего из цитрата и фосфата натрия, декстрозы и аденина. CPDA обеспечивает не только антикоагуляцию, но и обладает протективным действием в отношении клеточных мембран в процессе обработки и разделения крови на те или иные компоненты. Однако возможно применение и других антикоагулянтов, таких, как цитрат–фосфат–декстроза, кислотный–цитрат–декстроза или глюцигир.

Сбор пуповинной крови может проводиться при самопроизвольных родах и кесаревом сечении, как до, так и после отделения последа. При сборе до отделения последа процедура несколько упрощается, однако во всех случаях следует помнить о том, чтобы контейнер, в который собирается кровь, находился на 50–80 см ниже уровня положения роженицы для того, чтобы кровь самопроизвольно поступала в контейнер под действием силы тяжести.

Методы антисептической обработки одинаковы независимо от условий сбора: пупочный канатик тщательно обрабатывают на протяжении 8–12 см в месте предполагаемой пункции 5% настойкой йода и 70% раствором этилового спирта или «Октенисептом». После этого пунктируют вену пупочного канатика. Вена пуповины имеет больший диаметр, чем артерии, что легко определяется визуально. Вся процедура сбора обычно длится от 3 до 10 минут. При наступлении обескровливания плаценты, о котором можно судить по прекращению тока крови и спадению вены, пункционную иглу удаляют и закрывают защитным колпачком.

При правильном выполнении техники сбора средний объем пуповинной крови составляет, как правило, 80–100 мл. По данным литературы, объем получаемой крови может зависеть от многих факторов, таких, как масса тела новорожденного, время пересечения пуповины, срок беременности, длина пуповины. Однако в исследовании, проведенном российскими авторами, не выявлено зависимости объема собранной крови от массы плода. С другой стороны, если низкая масса новорожденного обусловлена патологией фетоплацентарного комплекса или пуповины, тяжелыми осложнениями беременности, то сбор пуповинной крови может оказаться затрудненным или вообще невозможным. Поэтому при необходимости прогнозирования, следует в большей степени опираться на клинические и лабораторные данные обследования беременной.

Важными факторами, влияющим на объем сбора пуповинной крови, является время отделения ребенка от пуповины и уровень, на котором она пересекается. Раннее отделение ребенка от последа, равно как и наложение зажимов на пуповину на максимально близком расстоянии к ребенку, не влечет за собой каких-либо отрицательных последствий для новорожденного. Поэтому, если нет акушерских или неонатальных показаний для выдержки более длительных сроков, акушерская тактика может учитывать интересы персонала, проводящего сбор пуповинной крови, и производить перевязку пуповины сразу после рождения младенца.

Профессором К.М. Абдулкадыровым и соавт. было проведено исследование разных способов сбора плацентарной крови путем дренирования вены пуповины. Сбор пуповинной крови проводили в условиях родильного зала в трех вариантах: при физиологических родах, при нахождении плаценты *in utero* и *ex utero*, а также при кесаревом сечении. Авторами было установлено, что объемы собираемой крови существенно не различались, составив в среднем 70 мл. В том же исследовании отмечено, что, если с момента рождения

ребенка до момента пережатия пуповины проходило менее 14 секунд, то средний объем крови составлял 80 мл, а если этот период был более продолжительным, то средний ее объем был практически вдвое меньше.

Поскольку наиболее часто целью сбора пуповинной крови является получение концентрата ядросодержащих клеток, группой авторов было проведено исследование влияния времени, прошедшего с момента сбора крови до выделения из нее различных фракций, а также температуры, при которой хранились образцы до разделения, на количественный выход мононуклеарных клеток, эритроидных предшественников и колониеобразующих единиц гранулоцитов и моноцитов. Эти исследования позволили обнаружить выраженное влияние обоих факторов как на выход мононуклеарных клеток в целом, так и на количество всех типов клеток–предшественников. Интересно, что наименьшие потери клеточного материала при длительности хранения до 72 часов отмечены при температуре +25°C, а наибольшие – при +4°C.

После выделения и подсчета клеточного состава полученного концентрата он подвергается замораживанию и хранится при сверхнизких температурах – как правило, в сосудах Дьюара с жидким азотом. Функцию хранения выполняют так называемые банки стволовых клеток, число которых увеличивается с каждым годом во всем мире. Хранящиеся таким образом клетки выполняют роль своего рода «биологической страховки» на случай заболевания ребенка или его ближайших родственников, чаще всего – сестер и братьев.

Наибольшее применение стволовые клетки пуповинной крови находят в онкогематологии. Поскольку количество их изначально ограничено, они, как правило, используются для аутоотрансплантации в случае развития злокачественных заболеваний крови у детей. Естественно, что чем меньше возраст и вес ребенка, тем больше шансов восстановить гемопоэтическую функцию после химиотерапевтической или лучевой миелоабляции с помощью аутоклеток пуповинной крови. Также возможно применение у детей аллогенных клеток пуповинной крови, в случае их совместимости с реципиентом по HLA–системе. Применение данных клеток у взрослых лимитировано их недостаточным количеством для замещения гемопоэза во взрослом организме.

Научные эксперименты, проводящиеся практически в каждом современном научно-исследовательском институте соответствующего профиля, как в России, так и за рубежом, направлены на определение возможностей эффективного применения стволовых клеток пуповинной крови для лечения аутоиммунных и других заболеваний. На сегодняшний день эти исследования проводятся на животных, поэтому вопрос их клинического использования остается открытым.

С начала 90-х годов XX столетия пуповинная кровь стала привлекать внимание трансфузиологов и неонатологов в качестве источника аутокомпонентов: эритроцитарной массы и плазмы. Достижения современной науки и техники позволяют добиться существенных успехов в лечении и выхаживании глубоко недоношенных детей, а также в хирургической коррекции врожденных пороков развития у новорожденных первого месяца жизни. Однако именно эти группы новорожденных наиболее часто нуждаются в трансфузиях донорских компонентов крови, несущих в себе высокий риск передачи гемотрансмиссивных заболеваний и иммунологической несовместимости.

Кроме того, донорами являются взрослые люди, кровь которых по клеточному и биохимическому составу резко отличается от крови новорожденных. В частности, эритроциты новорожденных содержат фетальный гемоглобин, отличающийся по структуре от гемоглобина взрослых.

С другой стороны, методики кровосбережения, такие как аутодонорство, нормоволемическая гемодилюция и реинфузия аутоэритроцитов, широко применяемые у взрослых пациентов, в силу очевидных причин невозможно применить у новорожденных. Поэтому единственным источником аутокомпонентов в данной ситуации может стать пуповинная кровь. На сегодняшний день над проблемой аутоотрансфузии пуповинной крови работают коллективы ученых практически во всех странах мира. При этом различные группы исследователей применяют принципиально разные подходы. Так, японские исследователи в основном изучают хранение и применение цельной пуповинной крови у недоношенных новорожденных и новорожденных с пороками развития, подлежащими хирургической коррекции. Лимитирует применение этой методики кратковременность пригодности цельной крови для введения, поскольку уже после трех дней хранения количество микросгустков и процент гемолизированных эритроцитов в ней, а, следовательно, и содержание ионов калия не позволяют провести трансфузию без осложнений. Тем не менее, у 25 детей, перенесших в первые трое суток жизни оперативные вмешательства с кровопотерей более 10% ОЦК, аутоотрансфузии пуповинной крови было достаточно для достижения нормальных гемоконцентрационных показателей без дополнительных трансфузий донорской эритроцитомассы.

Возможность разделения пуповинной крови на компоненты – плазму и эритроцитарную массу – с последующим хранением и применением последней параллельно исследуют группы трансфузиологов и неонатологов в ряде университетов Европы. Естественно, что при таком подходе сроки хранения эритроцитомассы значительно увеличиваются, за счет чего расширяется спектр показаний для ее введения. Заготавливая пуповинную эритроцитомассу с помощью специально разработанных замкнутых систем, можно удлинить сроки ее хранения до 35–42 суток. Спорным является вопрос о необходимости удаления из пуповинной эритроцитомассы лейкоцитарного слоя, содержащего до 99% лейкоцитов. В ряде исследований эритроцитомасса заготавливалась без лейкоцитарного слоя, в других – вместе с ним. Так или иначе, но каких-либо осложнений после введения обоих типов аутоэритроцитомассы новорожденным не было, а говорить об анализе отдаленных последствий трансфузий лейкоцитосодержащей эритроцитомассы пока преждевременно.

В нескольких университетах Германии был проведен анализ контаминации пуповинной эритроцитомассы материнскими эритроцитами и лейкоцитами, выявивший контаминацию трех образцов из 390 исследованных. Учитывая то, что такая контаминация может иметь клиническое значение только при несовместимости матери и ребенка по системе АВО,

резус или Kell, тотальный скрининг образцов не представляется целесообразным.

Крайне важным является вопрос микробиологической безопасности эритроцитомассы, заготовленной из пуповинной крови. Исходя из принципа минимизации риска микробной контаминации образцов, все авторы выделяют в качестве критериев исключения острые формы бактериальной и вирусной инфекции у беременных, сопровождающиеся признаками хориоамнионита. Различными исследовательскими группами был сделан вывод, что бактериальное загрязнение в большинстве случаев происходит при самопроизвольных родах, составляет 3–7% всех образцов с преимущественным выявлением банальной вагинальной палочковой или кокковой флоры и практически полностью зависит от квалификации и добросовестности персонала, выполняющего сбор пуповинной крови. Лишь в единичных случаях контаминация была связана с врожденными гнойно-септическими заболеваниями, в частности – с меконезальным перитонитом.

Тем не менее, в случаях, когда заключение о росте микроорганизмов было получено уже после проведения трансфузии, ни у одного ребенка не развилось гнойно-септических осложнений.

Приведенные данные не отрицают необходимости микробиологического исследования всех образцов пуповинной крови, но указывают на два алгоритма: проведение посевов на экспресс-среды с получением результата в течение 72 часов или проведение рутинных исследований с получением результата на 5–7-й день и дополнительным тестом на чувствительность микроорганизмов к антибиотикам с тем расчетом, что при развитии септического процесса у новорожденного терапия будет целенаправленной. Очевидно, что первый алгоритм является наиболее безопасным.

Что же касается применения аутоплазмы, полученной из пуповинной крови, то литературных данных о ее клиническом применении нами не было найдено. Лишь одной исследовательской группой был проведен анализ коагуляционного потенциала пуповинной криоплазмы, в результате чего была установлена прямая его зависимость от соотношения антикоагулянта и крови в каждом конкретном образце.

Так или иначе, специалисты из разных стран и университетов сходятся во мнении, что заготовка и применение компонентов аутопуповинной крови является высокоэффективным и перспективным, а также практически единственно возможным методом кровосбережения в неонатологии. Дальнейшее развитие этих методик должно быть направлено на получение как можно большего числа пригодных для клинического применения компонентов из одного образца пуповинной крови: эритроцитов, ядроксодержащих клеток и плазмы.

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. Стрижаков А.Н., Мхеидзе Д.М., Тимохина Е.В., Гришина В.В. Пуповинная кровь – источник стволовых клеток. Вопросы гинекологии, акушерства и перинатологии. 2003; 2(4): 33–7.
3. Егоров В.В., Иванов А.А., Пальцев М.А. Стволовые клетки человека. Молекулярная медицина. 2003; 2: 3–14.
4. Brune T., Garritsen H., Witteler R. et al. Autologous placental blood transfusion for the therapy of anaemic neonates. Biol. Neonate. 2002; 81: 236–43.

5. Garritsen H., Brune T., Louwen F. et al. Autologous red cells derived from cord blood: collection, preparation, storage and quality controls with optimal additive storage medium (Sag-mannitol). Transfusion Medicine 2003; 13: 303–10.
6. Hosono S., Mugishima H., Nakano Y. et al. Autologous cord blood transfusion in an infant with a huge sacrococcygeal teratoma. J. Perinat. Med. 2004; 32: 187–9.
7. Paxson C.L. Collection and use of autologous fetal blood. Am. J. Obstet. Gynecol. 1979; 134: 708–10.
8. Strauss R.G. Red blood cells transfusion in the neonate. Clin. Perinatol. 1995; 22: 641–55.