

УДК 615.387.012

ВНЕДРЕНИЕ ОПТИМАЛЬНЫХ МЕТОДОВ ОБРАБОТКИ И ТЕСТИРОВАНИЯ ПУПОВИННОЙ КРОВИ¹

© 2006 О.В. Тюмина, А.Н. Тороповский, С.Е. Волчков, Л.М. Трусова²

С целью изучения оптимальных методов обработки и тестирования пуповинной крови (ПК), влияния различных факторов (масса, рост плода, шкала Апгар, срок гестации) на объем собранной ПК и количество ядросодержащих клеток (ЯСК) произведено 983 взятия ПК. В каждом образце ПК в первые 24 часа после родов определяли наличие гемотрансмиссивных инфекций, проводилось бактериологическое исследование. По причине инфекционной опасности были утилизированы 122 (12,4%) образца. Процент высеваемости микробов-контаминантов составил 5,8%, контаминация воздушной флорой – 0,1%. Корреляционный анализ показал положительную зависимость объема собранной ПК от массы и роста плода. Выявлено, что применение автоматического метода обработки позволяет получить больший выход ЯСК.

История создания банков ПК началась во Франции с 1988 г. [1,2]. Сегодня целая сеть как государственных, так и частных банков пуповинной крови (ПК) работает за рубежом. Разработан единый международный стандарт для банков ПК “International Standards for Cord Blood Collection, Processing, Testing, Banking, Selection and release”, который регламентирует все процедуры (взятие крови, тестирование, обработка, криохранение), работы с образцом ПК.

Однако данным документом не предусмотрен минимальный объем ПК, пригодной для хранения, а также способ выделения концентрата стволовых клеток. Пуповинную кровь можно криоконсервировать и без предварительной обработки, как это делают во Франции. Однако эритроциты и гранулоциты при замораживании и размораживании лизируются, и продукты лизиса могут вызывать неблагоприятные реакции у реципиента. Кроме того, эритроциты могут быть несовместимы по эритроцитарным антигенам (ABO и Rh) с реципиентом. По этой причине, а также для уменьшения объема биоматериала (экономия места) перед долгосрочным хранением ПК проводят ее фракционирование для выделения ЯСК, используя два принципиальных подхода:

1) “ручной” метод (седиментация желатином; гидроксипропилкрахмалом; полиглюкином; на основе фиколла или перколла; фракционирование пуповин-

¹ Представлена доктором биологических наук, профессором В.Г. Подковкиным.

² Тюмина Ольга Владимировна, Тороповский Андрей Николаевич, Волчков Станислав Евгеньевич, Трусова Лариса Михайловна, ГУЗ Самарской области “Клинический центр клеточных технологий”

ной крови при помощи центрифугирования; лизис эритроцитов хлоридом аммония [6]);

2) “автоматический” метод (выделения концентрата ЯСК аппаратным методом с помощью сепаратора клеток).

Большинство банков пуповинной крови в США и в странах Европы в своей работе используют сепаратор клеток для работы с пуповинной кровью.

В России история создания банков пуповинной крови началась с 2003 г., только три банка (г.Москва, г.Самара и г. Казань), являясь государственными, осуществляют хранение образцов для публичного использования. Основным документом, регламентирующим деятельность банков ПК в РФ, является Приказ Министерства здравоохранения РФ № 325 от 25.07.2003 г. “О развитии клеточных технологий в Российской Федерации”.

В настоящей статье проведен анализ результатов обработки ПК и лабораторного скрининга, проводимого в процессе обработки на наличие инфекционных агентов по материалам работы государственного банка ПК, созданного в г. Самаре в 2003 г.

Материал и методы

Заготовка ПК производилась после получения информированного согласия у беременной женщины, которая проходила тщательный дородовой скрининг на наличие противопоказаний к донорству ПК (тяжелые соматические заболевания, отягощенный семейный анамнез, акушерская патология). Донором не может быть беременная женщина при положительных результатах тестирования на наличие следующих инфекций: ВИЧ 1 и 2, сифилис, гепатит В и С, острую стадию (положительный Ig M) инфекций: вируса простого герпеса 1 и 2, цитомегаловируса, токсоплазмоза. Информация о женщине — доноре плацентарной крови и данные новорожденного ребенка (масса, рост, оценка по шкале Апгар, срок гестации) кодировались и заносились в анонимном виде в базу данных банка. Сбор ПК проводился как при физиологических, так и при оперативных родах закрытым способом в стандартную систему для взятия донорской крови (контейнеры пластиковые одинарные CPDA-1 250 GG, Terumo).

Для определения массы полученной ПК биоматериал взвешивали. Пробы для тестирования брали из гемакона, содержащего ПК и антикоагулянт. Гематокрит, количество лейкоцитов, лимфоцитов и моноцитов определяли на автоматическом гематологическом анализаторе Cell Dyne до и после обработки.

Всего подвергнуто обработке 983 образца ПК. Один из основных этапов в процессе обработки ПК — лабораторный скрининг ПК на наличие инфекций. В соответствии с приказом МЗ РФ № 325 от 25.07.2003г. проводилось исследование крови методом иммуноферментного анализа на аппарате “AxSYM system” (Abbott) в первые 24 часа после родов на наличие следующих серологических маркеров: HIV-1 и -2 Ag/Ab, Anti-HBcor, HBs-Ag, Anti-HCV (тест системы фирмы Abbott), на аппарате SANOFI Pasteur проводилось исследование на Anti-CMV, Anti-Toxoplasma gondii, Anti-HSV-1 и -2, RW (тест-системы ЗАО “Вектор-Бест”, ЗАО “ЭКОлаб”). Для микробиологического исследования образцов ПК использовалась универсальная среда HiCombi Dual

Performance Medium производства компании HIMEDIA. Для бактериологического исследования набирается 5 мл плазмы, полученной в результате обработки ПК.

Выделение концентрата СК проводилось двумя методами:

1) по методу Рубинштейна — двойное центрифугирование (с добавлением гидроксиэтилкрахмала [3]);

2) аппаратным методом с помощью сепаратора Sерах Швейцарской фирмы “Biosafe” по протоколу “UCB-HES” v.110 (также с добавлением гидроксиэтилкрахмала).

Метод Рубинштейна — вполне надежная система, но требует много манипуляций с образцами пуповинной крови и делает эту процедуру долгой. Автоматизация способствует улучшению процесса обработки.

Портативная система Sерах позволяет обрабатывать различные источники стволовых клеток (пуповинная кровь, материалы лейкофереза, периферическая кровь и костный мозг) в стерильных условиях. Полностью автоматизированный и многофункциональный аппарат Sерах идеально подходит для повторяющейся стандартной обработки и фракционирования пуповинной крови в лаборатории.

Программа “Umbilical Cord Blood — Hydro Ethyl Starch” разработана специально для обработки образцов пуповинной крови. Гидроксиэтилкрахмал (HES) 0,6% добавляют в объеме 20%, что позволяет ускорить седиментацию эритроцитов и сохранить жизнеспособность клеток после криоконсервирования. Согласно протоколу “UCB-HES”, HES добавляется к собранным образцам пуповинной крови, что позволяет уменьшить первоначальный объем в течение 20-30 мин до конечного объема 20-50 мл.

Статистическая обработка данных проводилась с помощью программ Statistica 6.0 и MS Excel 2003.

Результаты и их обсуждение

Из 983 образцов ПК 122 (12,4%) было утилизировано по причине инфекционной опасности. Из них положительный анализ на HBs-Ag выявлен в 4 образцах (0,4%); Anti-HCV — в 19 образцах (1,9%); RW — в 9 образцах (0,9%); Anti-HBcor — в 88 образцах (9%) (рис. 1). Высокий процент выявляемости антител к ядерному антигену гепатита В (9%) связан с высокой персистенцией вируса гепатита В в популяции и свидетельствует в пользу перенесенного гепатита. Данный анализ не входит в обязательный перечень обследований как для доноров крови [4], так и для беременных женщин, однако является обязательным при тестировании ПК в связи с более высокими требованиями к безопасности концентрата прогенеторных клеток ПК [5].

Положительный титр антител класса Ig G к CMV был выявлен в 885 образцах (90%), к *Toxoplasma gondii* — в 472 образцах (48%), к вирусу герпеса — в 924 образцах (94%), что свидетельствует о высокой встречаемости данных инфекций в популяции и не является показанием к утилизации образцов ПК.

Для микробиологического анализа исследуемых образцов крови на стерильность и грибы использовалась двухфазная готовая среда HiCombi Dual Performance Medium производства компании HIMEDIA. Спектр выявленных

микроорганизмов представлен следующим образом: *S. Epidermidis* (0,1%), *E. Coli* (0,5%), *Kl. Pneumoniae* (2%), *S. Warneri* (0,3%), *S. Hominis* (1%), *S. Haemolyticus* (0,5%), *Str. Haemolyticus* (0,3%), *Ent. Faecalis* (1%), *A. Viridans* (0,1%). Общий процент высеваемости составил 5,8%. Благодаря использованию закрытого способа взятия ПК, закрытых способов обработки ПК, а также готовой универсальной среды HiCombi, для исключения возможности контаминации проб воздушной флорой процент высеваемости микробов-контаминантов воздушной флоры (*A. Viridans*) составил всего 0,1%. В соответствии с международными стандартами была определена чувствительность к антибиотикам выявленных микроорганизмов.

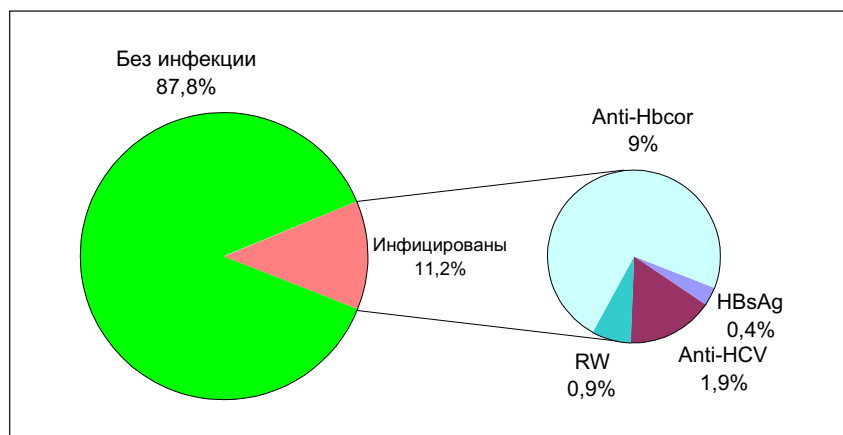


Рис. 1. Положительные результаты анализов на инфекцию

Мы исследовали такие характеристики новорожденного ребенка ($n=230$), как масса 3560 ± 308 (2700,00-4720,00 г), рост $54 \pm 1,97$ (50-60 см), шкала Апгар $8 \pm 0,58$ (6-9 баллов), а также срок гестации $40 \pm 0,67$ (37-42 недель), и провели корреляционный анализ ($n=102$) зависимости объема собранной пуповинной крови от массы плода ($r=0,268$, $p<0,01$), его роста ($r=0,203$, $p<0,05$), шкалы Апгар ($r=-0,092$, $p>0,1$), срока гестации ($r=-0,003$, $p>0,1$).

Таким образом, мы подтвердили, что чем больше ребенок (его масса и рост, см. рис. 2, 3), тем больший объем ПК можно получить (слабая прямая корреляционная связь), другие показатели (шкала Апгар и срок гестации) не влияют на объем собранной крови.

Проведенный корреляционный анализ ($n=102$) зависимости количества ядродержащих клеток в образце от объема собранной пуповинной крови ($r=0,102$, $p>0,1$), а также от массы ($r=0,073$, $p>0,1$), роста плода ($r=0,121$, $p>0,1$), срока гестации ($r=0,159$, $p>0,1$), шкалы Апгар ($r=-0,174$, $p>0,1$) связи между количеством ЯСК в образце и данными факторами не обнаружил.

Наиболее важный результат обработки ПК – это процент выхода ядродержащих клеток. При ручном методе обработки выход ЯСК составил $70,9 \pm 7,5\%$, автоматическая обработка образцов повысила выход ЯСК до $76,8 \pm 4,6\%$ ($p<0,05$). Как видно из рис. 4, применение автоматического сепаратора позволяет получать меньший разброс результатов.

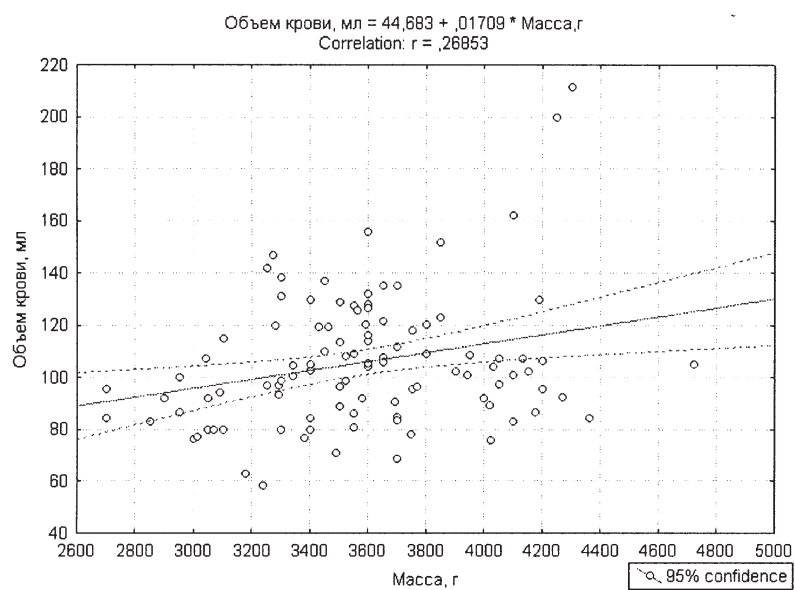


Рис. 2. Зависимость объема пуповинной крови от массы плода

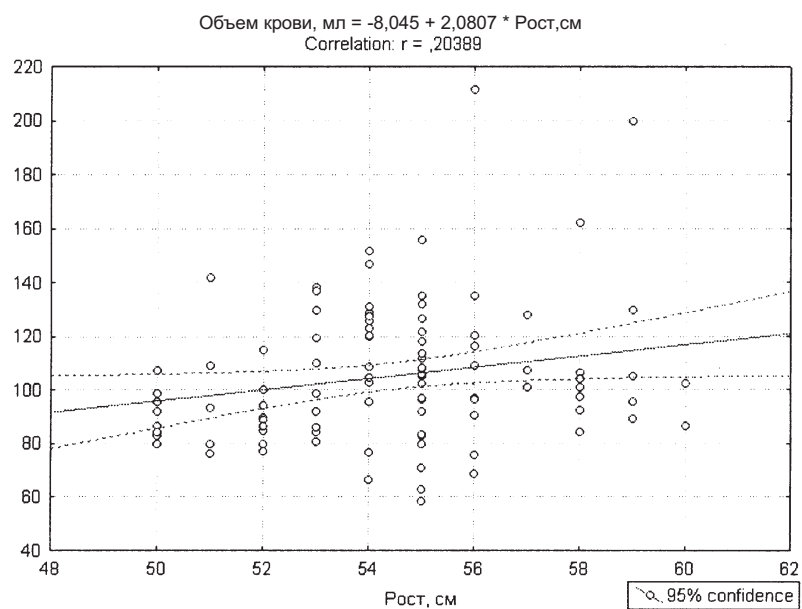


Рис. 3. Зависимость объема пуповинной крови от роста плода

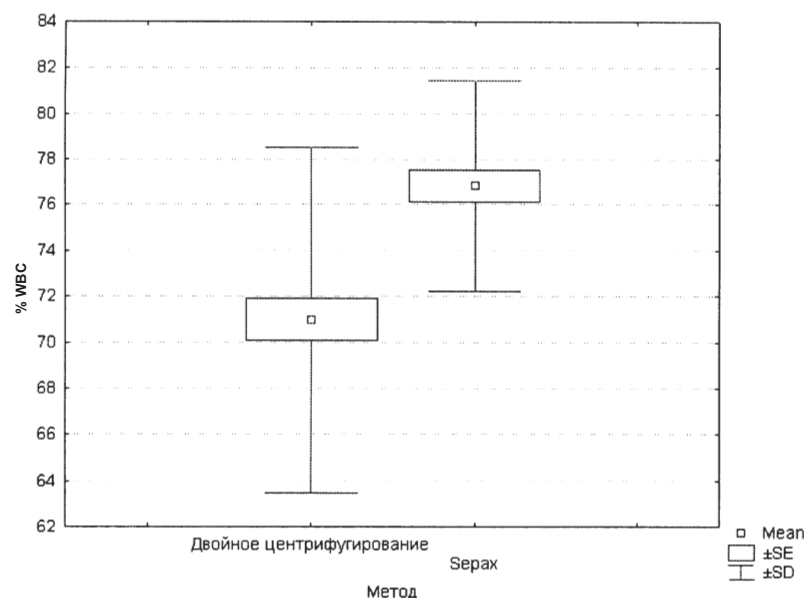


Рис. 4. Процент выхода ЯСК в зависимости от метода обработки

Заключение

Проведенная исследовательская работа показала, что для уменьшения процента утилизации образцов ПК в обязательный лабораторный скрининг женщин-доноров ПК должен быть включен анализ на Anti-HBcor.

Использование закрытых методик взятия и обработки крови, а также готовых универсальных сред позволяет практически исключить возможность контаминации образцов ПК воздушной флорой.

Найдена слабая корреляционная связь между объемом собранной пуповинной крови и массой, а также ростом плода; шкала Апгар и срок гестации не влияют на величину объема.

Автоматический метод выделения концентрата стволовых клеток обеспечивает больший выход ЯСК по сравнению с ручным методом обработки ПК, значительно сокращает время работы, сводит к минимуму риск контаминации, а также позволяет получать более стабильные результаты работы.

Литература

- [1] Gluckman, E. Hematopoietic reconstitution in a patient with Fanconis anemia by means of umbilical-cord blood from HLA-identical sibling / E. Gluckman, H.E. Broxmeyer // *N. Engl. J. Med.* — 1989. — Vol. 321. — P. 1174-1178.
- [2] Gluckman, E. Hematopoietic Stem-Cell transplants using umbilical-cord blood / E. Gluckman // *N. Engl. J. Med.* — 2001. — Vol. 344. — № 24. — P. 1860-1861.
- [3] Processing and cryopreservation of placental/umbilical cord blood for unrelated bone marrow reconstitution / P. Rubinstein [et. al.] // *Froc. Nat. Acad. Sci. USA.* — 1995. — Vol. 92. — № 22. — P. 10119-10122
- [4] Приказ Минздрава РФ от 14.09.2001 № 364 “Об утверждении порядка медицинского обследования донора крови и ее компонентов”.
- [5] Приказ Минздрава РФ от 25.07.2003 №325 “О развитии клеточных технологий в Российской Федерации”.
- [6] Scott, R. *Burger Umbilical Cord Blood Stem Cells* / R. Scott. — *Handbook of Transfusion Medicine*. Z.: Academic Press, 2001. — P. 171-178.

Поступила в редакцию 5.09.2006;
в окончательном варианте — 10.09.2006.

INTRODUCING OPTIMAL METHODS FOR UMBILICAL CORD BLOOD PROCESSING AND TESTING³

© 2006 O.V. Tyumina, A.N. Toropovskiy,
S.E. Volchkov, L.M. Trusova⁴

To study optimal methods of processing and testing umbilical cord blood (UCB), effect of various factors (new-born's weight, height, Apgar scale, gestation time) on collected UCB volume and nucleated cells (NC) quantity 983 UCB units are taken. Each UCB unit in first 24 hours is tested for haemotransmissible infections presence, bacteriological testing is also taken. 122 (12,4%) UCB units are utilized because of infectious danger. Percentage of infected units with microbes-contaminants is 5,8%, contamination from air is 0,1%. Correlative analysis has shown positive dependence of collected UCB volume on new-born's weight and height. It is found that application of an automatic method of processing allows receiving greater output of NC.

Paper received 5.09.2006.
Paper accepted 19.09.2006.

³ Communicated by Dr. Sci. (Biology) Prof. V.G. Podkovkin.

⁴ Tyumina Olga Vladimirovna, Toropovskiy Andrey Nickolaevich, Volchkov Stanislav Evgenievich, Trusova Larisa Mikhailovna, Samara State Healthcare Department, Samara Regional Clinical Centre of Cells Technologies.