



УДК 57.087.7/.79:57/081:[616.15:616.48]

Исаикина Я.И., Лях Е.Г., Новикова М.А., Фролова Р.Л., Жерносеченко А.А., Цивинская А.В.
Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии
и иммунологии, Минск, Беларусь

Isaikina Y., Liakh H., Novikova M., Fralova R., Zhernasechanka H., Tsvybinskaya H.
Republican Research Centre for Pediatric Oncology, Hematology and Immunology, Minsk, Belarus

Исследование влияния различных факторов на параметры качества образцов пуповинной крови

The investigation of different factors influence on the quality of Cord Blood events

Резюме

Целью исследования являлось изучение влияния объема, концентрации лейкоцитов в собранной пуповинной крови (ПК) и процедуры обработки ПК на основные параметры качества образцов концентрата стволовых клеток ПК. Проведен анализ 958 образцов ПК банка персонифицированного хранения ПК центра детской онкологии, гематологии и иммунологии Республики Беларусь. Определены объем, концентрация лейкоцитов в 1 мл ПК и количество ядросодержащих клеток (ЯСК) в каждом образце до обработки, а также содержание ЯСК, CD34⁺ клеток, колониеобразующих единиц гранулоцитов и макрофагов (КОЕ-ГМ) после проведения процессинга автоматическим или ручным методами. Установлена зависимость количества ЯСК и КОЕ-ГМ в концентратах стволовых клеток ПК от объема цельной ПК ($r=0,5761$, $p<0,05$ и $r=0,6089$, $p<0,05$ соответственно), а также корреляция между содержанием ЯСК и CD34⁺ клеток в образцах ПК и числом лейкоцитов в 1 мл собранной ПК ($r=0,7543$, $p<0,001$ и $r=0,518$, $p<0,05$ соответственно). Выход ЯСК не отличался при проведении процессинга ПК автоматическим ($71,6\pm0,84\%$) и ручным ($71,9\pm1,64\%$) методами, но относительное число стволовых CD34⁺ клеток было достоверно выше после автоматической обработки ПК ($p=0,0008$).

Ключевые слова: пуповинная кровь, процессинг, ядросодержащие клетки, CD34⁺ клетки, колониеобразующие единицы гранулоцитов и макрофагов.

Abstract

The aim of this study was to estimate the influence of cord blood (CB) parameters after collected (volume and leukocyte concentration), and processing mode of CB on total nucleated cells (TNCs), CD34⁺ cells and colony forming units-granulocyte macrophage (CFU-GM) number in finished CB units. We have investigated 958 CB units that have saved in CB bank of Byelorussian Research Centre for Pediatric Oncology, Hematology and Immunology. The volume and concentration of leukocyte in 1 ml collected CB were tested, number of TNCs, CD34⁺ cells, CFU-GM were assessed after CB processing. The significant dependence was found between quantity of TNCs and CFU-GM in finished CB units and collected CB volume ($r=0.5761$, $p<0.05$ and $r=0.6089$, $p<0.05$). A high correlation was demonstrated between concentration of leukocyte in collected CB and number of TNC, CD34⁺ cells in finished CB units ($r=0.7543$, $p<0.001$ and $r=0.518$, $p<0.05$). There was not

difference in the TNCs number at the output when applied an automatic or a manual method of processing, but quantity of CD34⁺ cells was higher after an automated system using ($p=0.0008$).

Keywords: cord blood, processing, total nucleated cells, CD34⁺ cells, colony forming units-granulocyte macrophage.

■ ВВЕДЕНИЕ

Пуповинная кровь (ПК) является альтернативным источником стволовых клеток, которые могут быть использованы как для трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (ГСК), которая входит в протокол лечения многих гематологических и онкологических заболеваний, так и в регенеративной медицине.

Впервые ПК была успешно применена как источник ГСК для трансплантации от донора-сиблинга в 1988 г. [1]. В 1994 г. была проведена успешная неродственная трансплантация ПК для восстановления гемопоэза [2]. С развитием методов процессинга ПК, позволяющих редуцировать объем и концентрировать мононуклеарные клетки, а также с совершенствованием метода криозамораживания, количество заготовленных образцов многократно выросло [3]. Так как успешное приживление ГСК при трансплантации ПК возможно только в случае HLA-антигенных совместимости донора и реципиента, во многих странах в рамках программы European Cord Blood Bank Project (Eurocord) были созданы банки ПК [4–8]. Широкое распространение получили не только публичные банки ПК, но и персонализированное хранение ПК. К 2015 г. было создано 215 таких коммерческих банков в 54 странах мира, в которых находилось на хранении 4,03 миллиона образцов концентрата стволовых клеток ПК (образец ПК) [9].

Высокое содержание ранних клеток-предшественников и мощная пролиферативная активность стволовых клеток обеспечивают ПК высокий восстановительный потенциал. Поэтому сейчас ПК находит все более широкое применение в регенеративной медицине. Проводятся исследования эффективности использования полученных из ПК мононуклеарных клеток, CD34⁺ клеток, мезенхимальных стволовых клеток для терапии неврологических заболеваний, включая ДЦП, сахарного диабета, сердечно-сосудистых заболеваний, заболеваний печени [9].

Общепринятыми показателями качества образца ПК является содержание ядросодержащих клеток (ЯСК), CD34⁺ клеток и колониеобразующих единиц гранулоцитов и макрофагов (КОЕ-ГМ).

Длительная история заготовки и хранения ПК сопровождалась исследованиями влияния различных факторов на получение образцов ПК высокого качества. Был проведен анализ зависимости объема и клеточного состава ПК от данных матери и неонатальных параметров плода. Разные группы исследователей выявили разную взаимосвязь между такими параметрами, как возраст и раса матери, срок гестации, пол плода, и содержанием ЯСК и CD34⁺ клеток в образцах ПК. Тем не менее, все



авторы отмечают, что достоверное влияние на количественный состав ПК имеют вес плода и объем собранной ПК [10–13].

Изучалась взаимосвязь между методом родоразрешения и объемом, количеством и качеством клеточного состава ПК. Sparrow R.L. с соавт. показали отсутствие достоверных различий в количестве ЯСК и CD34⁺ клеток при физиологических и оперативных родах [14]. Однако в исследовании Volpe G. с соавт. установлено, что при кесаревом сечении по сравнению с физиологическими родами объем ПК достоверно выше (95,4 мл против 85,0 мл соответственно, $p<0,01$), но содержание ЯСК ниже ($9,70 \times 10^8$ клеток и $8,74 \times 10^8$ клеток соответственно, $p=0,037$) [15].

Объем собранной из пуповины ПК варьирует в различных исследованиях от 30 мл до 240 мл [10, 17, 18, 20]. В отличие от стандартов заготовки ПК в публичных банках для коммерческих банков ПК (персонализированное хранение) объем доставленной ПК не является лимитирующим параметром и выбраковывается лишь ПК с драматически низким содержанием ЯСК.

Оценка клеточного состава образцов ПК, находящихся на долгосрочном хранении, у разных групп исследователей дала сопоставимые результаты. Так, содержание ЯСК варьировало от $6,45 \pm 2,7 \times 10^8$ до $10,2 \pm 4,6 \times 10^8$ [10, 16–18], а количество CD34⁺ клеток от $2,46 \pm 2,72 \times 10^6$ до $4,3 \pm 3,8 \times 10^6$ [17, 18].

Количество КОЕ-ГМ в образце ПК является показателем функциональной активности ГСК, а именно способности стволовых клеток ПК к пролиферации. Этот параметр тем более важен, что число КОЕ-ГМ коррелирует со скоростью восстановления гемопоэза после трансплантации. Анализ колониеобразующей способности гемопоэтических клеток-предшественников, выполненный разными группами ученых, показал, что их количество варьировало от $60 \pm 70 \times 10^4$ КОЕ-ГМ до $225 \pm 48 \times 10^4$ [10, 16, 19, 20].

В центре детской онкологии, гематологии и иммунологии Республики Беларусь заготовка и хранение ПК от сиблиングов пациентов, проходящих лечение в центре, были начаты в 1999 г., а в 2010 г. на базе центра был открыт банк ПК для персонализированного хранения. За время работы было заготовлено и находится на хранении в банке ПК при сверхнизких температурах более 1000 образцов.

■ ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Оценка зависимости основных параметров качества образцов концентратов стволовых клеток ПК от объема и концентрации лейкоцитов в ПК после коллекции и процедуры их обработки.

■ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалом исследования являлись 958 образцов ПК, полученных при физиологических или оперативных родах доношенных новорожденных и находящихся в банке персонализированного хранения ПК центра детской онкологии, гематологии и иммунологии Республики Беларусь.

Коллекция ПК выполнялась после пересечения пуповины методом пункции сосудов пупочного канатика специальной системой для забора

ПК, содержащей антикоагулянт (CPDA). Полученный материал обрабатывали и замораживали не позднее 24 ч после процедуры забора ПК.

Приготовление концентрата стволовых клеток ПК проводилось двумя методами:

1. Автоматический метод на сепараторе Sepax (Biosafe, Швейцария) по протоколу Umbilical Cord Blood – Hydro Ethyl Starch. Этот метод при добавлении к цельной ПК 6%-го раствора гидроксиэтилкрахмала (HES) в объеме 20% позволил в автоматическом режиме сконцентрировать ЯСК пуповинной крови и редуцировать объем образца.
2. Ручной метод двойного центрифугирования, предложенный P. Rubinstein. Выполняли добавлением 6%-го раствора HES к цельной ПК и дальнейшим центрифугированием смеси ПК/HES с целью получения плазмы, обогащенной ЯСК с фракцией стволовых клеток. Плазма, содержащая ЯСК, повторно центрифугировалась при 400 г с последующим удалением избытка плазмы [21].

Криозамораживание образцов ПК проводили путем добавления к концентратору клеток ПК раствора криопротектора на основе диметилсульфоксида (ДМСО) до достижения 10%-й концентрации ДМСО в конечном продукте. Замораживали клетки с использованием программируемого замораживателя IceCube 1810 (Sy-Lab, Австрия). Хранение образцов ПК осуществлялось при сверхнизкой температуре -196°C в криохранилище (Sy-Lab, Австрия).

Оценку объема собранной и доставленной для хранения ПК проводили методом взвешивания с пересчетом веса на объем, учитывая коэффициент плотности ПК – 1,053.

Подсчет концентрации лейкоцитов в ПК проводили в трихлоруксусной кислоте методом микроскопии с помощью камеры Горяева.

Экспрессию поверхностных CD34 антигенов на ГСК определяли методом проточной цитофлуориметрии на приборе FACScan (Becton Dickinson, США). Для каждого образца определяли относительное и абсолютное число CD34⁺ клеток.

Для оценки КОЕ-ГМ бурстобразующих единиц эритроцитов (БОЕ-Э) проводили культивирование мононуклеарных клеток ПК в концентрации $1 \times 10^5/\text{мл}$ в среде метилцеллюлозы (StemCell Technologies, Канада) при 37°C , 5% CO₂ и 90% влажности. После 14 суток культивирования количество КОЕ-ГМ и БОЕ-Э подсчитывали под инвертированным микроскопом AXIOVERT (Zeiss, Германия).

Для всех образцов ПК выполнялось тестирование на инфекционные агенты: Anti-HIV-1 и -2, HIV1-Ag; Anti-HTLV-I и -II; Anti-HBcor-Ag, HBs-Ag; Anti-HCV; Anti-CMV; Anti-Toxoplasma gondii; RW; Staphilococci; Streptococci; Enterococci; Neisseria gonorrhoeae; Candida species; Aspergillus species; Esherihia coli. Образцы с положительным результатом тестирования выбраковывались.

Статистическую обработку данных проводили с применением методов описательной статистики, корреляционного анализа Спирмена, t-критерия Стьюдента для сравнения независимых выборок программы Statistica 6.0. Различия между сравниваемыми показателями считали статистически значимыми при $p \leq 0,05$.



■ РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Всего было проанализировано 958 образцов ПК, находящихся на долгосрочном хранении в банке ПК, 801 из которых был обработан в автоматическом режиме и 157 образцов ПК – в ручном режиме.

До обработки образцов ПК были определены такие параметры, как объем собранной ПК, число лейкоцитов в 1 мл ПК и общее содержание ЯСК. Медиана объема ПК после сбора составляла 74,0 (15,0–184,0) мл. ПК объемом менее 40 мл принималась для обработки и хранения по желанию клиентов банка ПК, так как персонифицированное хранение образцов ПК ставит своей целью не получение продукта с содержанием CD34⁺ клеток, достаточным для проведения процедуры трансплантации ГСК, а сохранение стволовых клеток ПК, которые могут использоваться донором для дальнейшего лечения различных заболеваний. Число лейкоцитов в 1 мл ПК в среднем было $7,78 \pm 0,11 \times 10^6$, а количество ЯСК в поступивших образцах – $9,19 \pm 2,32 \times 10^6$. Наши результаты по объему ПК после коллекции сопоставимы с результатами других авторов, тогда как содержание ЯСК в полученных нами ПК выше по сравнению с данными, представленными Pick M. с соавт. ($6,3 \times 10^8$ в 83 мл) [22] или Nakagawa R. с соавт. ($5,86 \times 10^8$ ЯСК в 60,8 мл) [10].

После проведения процессинга и получения образца концентратата стволовых клеток ПК объем каждого образца был минимизирован до 25 мл. Основные количественные параметры образцов ПК: содержание ЯСК, CD34⁺ клеток, КОЕ-ГМ и БОЕ-Э были исследованы до помещения ПК на хранение (табл. 1).

Статистический анализ данных показал сокращение числа ЯСК в образцах ПК после процессинга по сравнению с первоначальным их количеством ($p < 0,05$). Выход ЯСК в образцах лейкоконцентратата ПК составлял $72,9 \pm 2,92\%$, что, вероятно, можно объяснить потерей сегментоядерных нейтрофилов при проведении сепарации в градиенте плотности HES. Подобную потерю ЯСК при проведении седиментации ПК с применением HES наблюдали и другие авторы. Так, в одном исследовании сохранность ЯСК в 983 образцах ПК составляла $70,9 \pm 7,5\%$ при ручном методе обработки и $76,8 \pm 4,6\%$ при автоматическом [23], а в другом – $83,4 \pm 14,1\%$ [24].

Установлена корреляционная зависимость количества ЯСК в образце ПК после обработки от объема собранной ПК ($r = 0,5761$) (рис. 1А), что согласуется с данными других исследователей [10]. Абсолютное число КОЕ-ГМ также зависит от объема собранной ПК ($r = 0,6089$) (рис. 1Б).

Выявлена высокая зависимость содержания ЯСК и CD34⁺ клеток в образцах ПК от числа лейкоцитов в 1 мл собранной до обработки ПК ($r = 0,7543$, $p < 0,001$ и $r = 0,518$, $p < 0,05$ соответственно) (рис. 1В, Г).

Таблица 1

Основные параметры образцов концентратата стволовых клеток ПК

Параметры	ЯСК $\times 10^8$	CD34 ⁺ $\times 10^6$	КОЕ-ГМ $\times 10^4$	БОЕ-Э $\times 10^4$
Медиана (мин. – макс.)	5,7 (0,07–32,2)	2,35 (0,05–31,0)	89,71 (1,17–689,93)	21,54 (1–455,6)

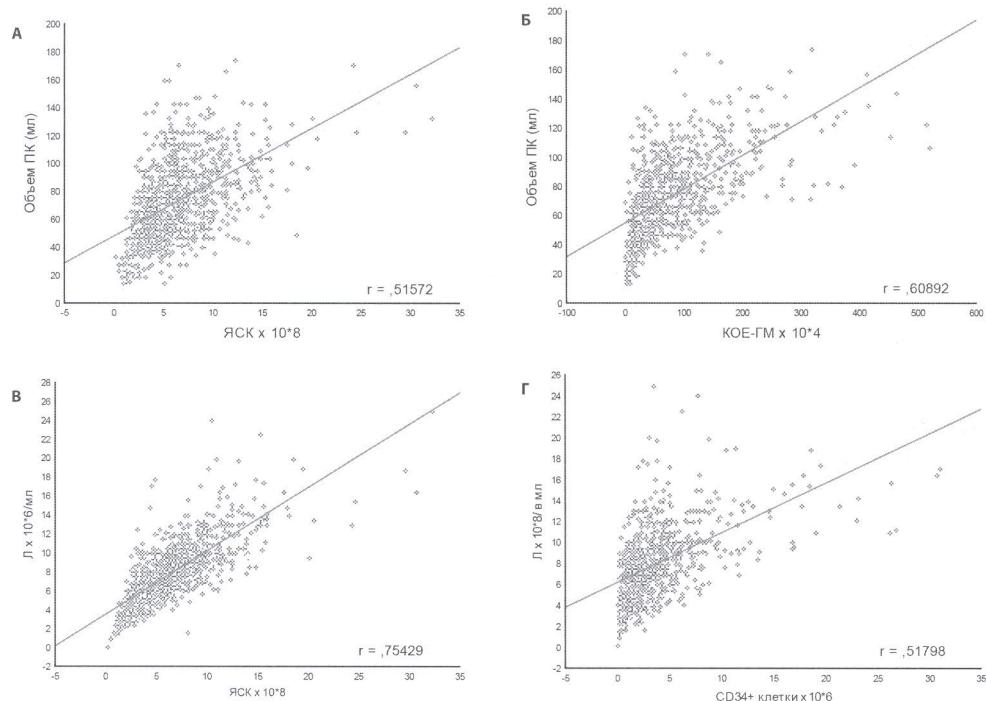


Рис. 1. Корреляционная зависимость между параметрами образцов ПК после обработки (ЯСК, CD34⁺ клетки, КОЕ-ГМ) и параметрами ПК при коллекции (объем, число лейкоцитов (Л) в 1 мл ПК; А – между количеством ЯСК и объемом ПК; Б – между абсолютным числом КОЕ-ГМ и объемом ПК; В – между количеством ЯСК и числом лейкоцитов в 1 мл ПК; Г – между количеством CD34⁺ клеток и числом лейкоцитов в 1 мл ПК

Проведено сравнительное исследование между основными параметрами образцов ПК, процессинг которых проводился в автоматическом и ручном режиме. До манипуляции содержание ЯСК в образцах ПК этих групп достоверно не различалось и составляло в среднем $9,21 \pm 0,18 \times 10^8$ в ПК, обработанных автоматическим методом, и $10,03 \pm 0,46$ – в ПК, обработанных методом центрифугирования ($p=0,07$). Характеристики образцов ПК после различных методов обработки приведены в табл. 2.

Таблица 2

Параметры образцов ПК после автоматического и ручного методов процессинга

Параметры	Процессинг ПК		Достоверность различий (p)
	Автоматический режим	Ручной режим	
ЯСК $\times 10^8$	5,6 (0,07–32,2)	6,0 (0,5–30,6)	0,015
CD34 ⁺ (%)	0,45 (0,02–3,07)	0,34 (0,03–2,16)	0,0008
CD34 ⁺ $\times 10^6$	2,4 (0,05–31,0)	2,0 (0,07–30,6)	0,3727
КОЕ-ГМ $\times 10^4$	90,61 (1,17–689,93)	102,34 (1,58–506,08)	0,0823



Полученные данные показали, что после процессинга в автоматическом режиме относительное количество стволовых CD34⁺ клеток в образцах ПК составляло 0,51±0,01%, что достоверно выше, чем после ручной обработки – 0,42±0,02% ($p=0,0008$), хотя среднее содержание ЯСК при использовании автоматического метода было ниже ($p=0,015$). Важно отметить, что выход ЯСК (соотношение ЯСК после процессинга к ЯСК в исходном материале ПК, в процентах) не отличался при автоматическом и ручном методах обработки ПК и составлял 71,6±0,84% и 71,9±1,64% соответственно ($p=0,9530$).

■ ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Установлена зависимость количества ЯСК и колониеобразующих миелоидных клеток-предшественников КОЕ-ГМ в образцах ПК, которые находятся на хранении в персонифицированном банке ПК, от объема собранной ПК. Высокий уровень корреляции наблюдается между числом лейкоцитов в 1 мл собранной ПК и содержанием ЯСК и CD34⁺ клеток в хранящихся образцах ПК. Выход ЯСК не отличается при проведении процессинга ПК автоматическим и ручным методами, но относительное количество стволовых CD34⁺ клеток достоверно выше в образцах ПК, обработанных в автоматическом режиме.

■ ЛИТЕРАТУРА

1. Gluckman E., Broxmeyer H.A., Auerbach A.D., Friedman H.S., Douglas G.W., Devergie A., Esperou H., Thierry D., Socie G., Lehn P. (1989) Hematopoietic reconstitution in a patient with Fanconi's anemia by means of umbilical cord blood from an HLA-identical sibling. *N. Engl. J. Med.*, vol. 321, no 17, pp. 1174–1178.
2. Kurtzberg J., Graham M., Casey J., Olson J., Stevens C.E., Rubinstein P. (1994) The use of umbilical cord blood in mismatched related and unrelated hemopoietic stem cell transplantation. *Blood Cells*, vol. 20, no 2–3, pp. 275–283.
3. Reboreda N.M., Di'az A., Castro A., Villaescusa R.G. (2000) Collection, processing and cryopreservation of umbilical cord blood for unrelated transplantation. *Bone Marrow Transplant.*, vol. 26, pp. 1263–1270.
4. Rubinstein P., Carrier C., Scaradavou A., Kurtzberg J., Adamson J., Migliaccio A.R., Berkowitz R.L., Cabbad M., Dobrila N.L., Taylor P.E. (1998) Outcomes among 562 Recipients of Placental-Blood Transplants from Unrelated Donors. *N. Engl. J. Med.*, vol. 339, pp. 1565–1577.
5. Gluckman E., Rocha V., Chastang C. (1998) Cord blood banking and transplant in Europe. *Eurocord. Vox Sang.*, vol. 74, pp. 95–101.
6. Armitage S., Warwick R., Fehily D., Navarrete C., Contreras M. (1999) Cord blood banking in London: the first 1000 collections. *Bone Marrow Transplant.*, vol. 24, pp. 139–145.
7. Ballen K.K., Gluckman E., Broxmeyer H.E. (2013) Umbilical cord blood transplantation: the first 25 years and beyond. *Blood*, vol. 25, no 122, pp. 491–498.
8. Ballen K.K., Verter F., Kurtzberg J. (2015) Umbilical cord blood donation: public or private? *Bone Marrow Transplant.*, vol. 50, no 10, pp. 1271–1278.
9. Rizk M., Aziz J., Shorr R., Allan D.S. (2017) Cell-Based Therapy Using Umbilical Cord Blood for Novel Indications in Regenerative Therapy and Immune Modulation: An Updated Systematic Scoping Review of the Literature. *Biol. Blood Marrow Transplant.*, vol. 17, pp. 30498–30506. doi: 10.1016/j.bbmt.2017.05.032.

10. Nakagawa R., Watanabe T., Kawano Y., Kanai S., Suzuya H., Kaneko M. (2004) Analysis of maternal and neonatal factors that influence the nucleated and CD34+ cell yield for cord blood banking. *Transfusion*, vol. 44, no 2, pp. 262–267.
11. Philip J., Kushwaha N., Chatterjee T., Mallhi R.S. (2015) Optimizing cord blood collections: Assessing the role of maternal and neonatal factors. *Asian J Transfus Sci.*, vol. 9, no 2, pp. 163–167.
12. Donaldson C., Armitage W.J., Laundy V., Barron C., Buchanan R., Webster J. (1999) Impact of obstetric factors on cord blood donation for transplantation. *Br. J. Haematol.*, vol. 106, pp. 128–132.
13. Wen S.H., Zhao W.L., Lin P.Y., Yang K.L. (2012) Associations among birth weight, placental weight, gestational period and product quality indicators of umbilical cord blood units. *Transfus Apher Sci.*, vol. 46, pp. 39–45.
14. Sparrow R.L., Cauchi J.A., Ramadi L.T., Waugh C.M., Kirkland M.A. (2002) Influence of mode of birth and collection on WBC yields of umbilical cord blood units. *Transfusion*, vol. 42, pp. 210–215.
15. Volpe G., Santodirocco M., Di Mauro L., Miscio G., Boscia F.M., Muto B., Volpe N. (2011) Four phases of checks for exclusion of umbilical cord blood donors. *Blood Transfus.*, vol. 9, pp. 286–291.
16. M-Reboreda N., Díaz A., Castro A., Villaescusa R.G. (2000) Collection, processing and cryopreservation of umbilical cord blood for unrelated transplantation. *Bone Marrow Transplant.*, vol. 26, pp. 1263–1270.
17. Donaldson C., Buchanan R., Webster J., Laundy V., Horsley H., Barron C., Anderson N., Bradley B. (2000) Development of a district Cord Blood Bank: a model for cord blood banking in the National Health Service. *Bone Marrow Transplant.*, vol. 25, pp. 899–905.
18. Fasouliotis S.J., Shtockheim D., Brautbar C., Schenker J.G., Weinstein D., Nagler A. (2000) Postpartum umbilical cord blood collection for transplantation: a comparison of three methods. *Am J Obstet Gynecol.*, vol. 182, pp. 227–232.
19. Aroviita P., Teramo K., Westman P., Hiilesmaa V., Kekomäki R. (2003) Associations among nucleated cell, CD34+ cell and colony-forming cell contents in cord blood units obtained through a standardized banking process. *Vox Sang.*, vol. 84, no 3, pp. 219–227.
20. Cairo M.S., Wagner J.E. (1997) Placental and/or umbilical cord blood: an alternative source of hematopoietic stem cells for transplantation. *Blood*, vol. 90, pp. 4665–4678.
21. Rubinstein P., Dobrila L., Rosenfield R.E., Adamson J.W., Migliaccio G., Migliaccio A.R., Taylor P.E., Stevens C.E. (1995) Processing and cryopreservation of placental/umbilical cord blood for unrelated bone marrow reconstitution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, vol. 92, pp. 10119–10122.
22. Pick M., Nagler A., Grisaru D., Eldor A., Deutsch V. (1998) Expansion of megakaryocyte progenitors from human umbilical cord blood using a new two-step separation procedure. *Br. J. Haematol.*, vol. 103, no 3, pp. 639–650.
23. Tyumina O., Toropovskiy A., Volchkov S., Trusova L. (2006) Vnedreniye optimal'nykh metodov obrabotki i testirovaniya pupovinnoy krovi. *Vestnik Samar. gos. Un-ta*, no 6/2, pp. 18–25.
24. Abdulkadyrov K., Romanenko N., Selivanov E. (2006) Nash opyt po zagotovke, testirovaniyu i khraneniyu gemopoeticheskikh kletok pupovinnoy krovi. *Geny i kletki*, vol. 1, no 1, pp. 63–65.