

УДК 616-089.819.843

Иволгин Д. А.^{1,2}, Смолянинов А. Б.^{1,2}¹Научно-исследовательская лаборатория клеточных технологий ГБОУ ВПО Северо-Западный Медицинский Университет им. И. И. Мечникова, Санкт-Петербург, Российская Федерация²Покровский банк стволовых клеток, Санкт-Петербург, Российская Федерация

e-mail: ida59m@mail.ru

ВЫДЕЛЕНИЕ ФРАКЦИИ ЯДРОСОДЕРЖАЩИХ КЛЕТОК ИЗ ПУПОВИННОЙ КРОВИ – ВЫБОР МЕТОДА

РЕЗЮМЕ

Актуальной является сравнительная оценка различных технических приемов обработки пуповинной крови для обеспечения максимально высокого выхода клеток с учетом соотношения «затраты-эффективность».

Проведено исследование эффективности выделения фракции ядросодержащих клеток из образцов пуповинной крови (n = 2898) методами двойного центрифугирования, полуавтоматической (*Sepax S100, Biosafe*) и автоматической сепарации (*MacoPress Smart, MacoPharma*). Определяли общее количество ядросодержащих клеток, количество и жизнеспособность CD34⁺ клеток (на единицу объема и абсолютное) до начала обработки образцов, после обработки и перед замораживанием.

Установлено, что полуавтоматическая и автоматическая системы сепарации эффективнее метода двойного центрифугирования по основным качественным показателям клеточного концентрата: общему количеству ядросодержащих клеток, выходу ядросодержащих клеток. Показано, что полуавтоматическая система выделения фракции ядросодержащих клеток требует наименьшее количество времени для обработки одного образца.

На основании полученных данных полуавтоматическая система предложена как оптимальная при ежедневном массовом поступлении образцов пуповинной крови в банк пуповинной крови для обработки и хранения.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: пуповинная кровь, банк пуповинной крови, полуавтоматическая система сепарации клеток

Пуповинная кровь (ПК) в настоящее время признана одним из основных источников стволовых клеток для лечения различных заболеваний. Наряду с преимуществами, по сравнению с другими источниками стволовых клеток (костный мозг, периферическая кровь), ПК содержит относительно ограниченное количество гемопоэтических клеток [1, 2]. Так как исход трансплантации во многом зависит от количества трансплантируемых клеток [3], существует необходимость максимального сокращения потерь клеток в процессе обработки образцов. Проводимые в банках ПК работы по повышению эффективности выделения ядросодержащих клеток могут значительно улучшить исходы трансплантации стволовых клеток ПК [4, 5].

Идея обработки (сокращения объема) ПК, помещаемой на длительное криохранилище, принадлежит основателю первого общественного банка пуповинной крови профессору П. Рубинштейну (1995). До этого на хранение помещалась цельная ПК. Обработка ПК преследовала: сокращение места для ее хранения, а следовательно, связанных с этим расходов; уменьшение количества вводимого в образец ПК криопротектора для снижения частоты проявлений его побочных эффектов при трансплантации. Первым подходом к сокращению объема образ-

цов ПК стал метод двойного центрифугирования [6]. Данный способ и его модификации [7, 8] используются по настоящее время и являются стандартом для сравнения эффективности выделения фракции ядросодержащих клеток другими техническими приемами.

Следующим этапом совершенствования технологии обработки ПК стало появление так называемых полуавтоматических систем «top-and-bottom», используемых первоначально для фракционирования периферической крови [9]. Примерами таких систем могут быть *Optipress II (Baxter, США)* и *Compomat G4 (Fresenius, Германия)*. На сегодняшний день данные системы активно используются для выделения фракции ядросодержащих клеток из ПК [10-13]. Их эффективность оценивалась как в рамках технологических решений систем полуавтоматической сепарации [14], так и в сравнении с другими способами обработки ПК [15, 16]. Накопленный опыт свидетельствует о явных перспективах применения полуавтоматических систем [17] в обеспечении высокого и стабильного выхода клеток ПК. Кроме того, использование полуавтоматических систем обработки ПК значительно снижает риск контаминации и повреждения контейнера с ПК [18].

Наряду с использованием полуавтоматических систем с 2000 года для обработки ПК стали использоваться полностью автоматические системы, такие как *Sepax S-100 (Biosafe, Швейцария)* [19, 20]. При помощи такого клеточного сепаратора количество манипуляций, производимых с ПК, уменьшается по сравнению и с полуавтоматическими системами. Кроме этого, в таком аппарате существуют программы, позволяющие проводить выделение клеточного концентрата из образца ПК малого объема, отмывание размороженного клеточного концентрата от криопротектора. Существует и ряд других способов обработки ПК, однако широкого распространения они в настоящий момент не получили [21].

Тем не менее при организации деятельности банка ПК по обработке и хранению образцов ПК необходимо учитывать не только эффективность тех или иных способов выделения фракции ядродержащих клеток из ПК, но и ряд дополнительных факторов, к которым относятся затраты на приобретение оборудования и расходных материалов, а также время обработки образца ПК.

Целью исследования явилась сравнительная оценка различных технических приемов обработки ПК для организации деятельности лаборатории выделения стволовых клеток, обеспечивающих максимально высокий выход ядродержащих клеток с учетом соотношения «затраты – эффективность».

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Основу работы составил ретроспективный количественный и качественный анализ образцов ПК ($n = 2898$), собранных в родовспомогающих учреждениях Санкт-Петербурга, Ленинградской области и других городов Российской Федерации. Все образцы ПК были доставлены, обработаны, заморожены и помещены на длительное криохранилище в НИЛ клеточных технологий Северо-Западного Государственного Медицинского университета им. И. И. Мечникова и Покровского банка стволовых клеток в рамках создания общественного хранилища ПК. Все образцы ПК были собраны как во время срочных родов, так и во время операции кесарева сечения.

Выделение стволовых клеток из образцов ПК осуществляли следующими способами:

I группа ($n = 1797$) – методом двойного центрифугирования [6] в модификации Американской ассоциации банков крови [22].

II группа ($n = 1012$) – с использованием автоматической системы *Sepax S100 (Biosafe, Швейцария)*.

III группа ($n = 78$) – с помощью полуавтоматической системы *MacoPress Smart (MacoPharma, Франция)*.

Лабораторные методы исследования

В соответствии с международными стандартами заготовки ПК [8, 23] существуют обязательные исследования качественных показателей ПК в процессе ее обработки. К ним относятся: определение общего количества ядродержащих клеток, количества *CD34⁺* клеток и жизнеспособности клеток. В данной работе проводились исследования образцов ПК по следующим показателям:

- до начала обработки – определение количества ядродержащих клеток при помощи гематологического анализатора *Coulter AcT diff 2 (Beckman Coulter, США)*;
- после обработки и перед замораживанием – определение количества ядродержащих клеток на гематологическом анализаторе, а также количества и жизнеспособности *CD34⁺* клеток (на единицу объема и абсолютное) с использованием проточного цитофлуориметра *FC500 (Beckman Coulter, США)* с программным обеспечением *CXP* и набором реагентов *Stem-Kit (Beckman Coulter, США)*. Выход ядродержащих клеток после обработки рассчитывался в процентах от количества клеток до обработки.

Статистические методы

Статистическая обработка данных осуществлялась по параметрическим и непараметрическим (ненормальное распределение) статистическим методикам [24, 25]. Для определения нормальности распределения переменных проводился тест Колмогорова-Смирнова [26, 27]. Статистический анализ проводился с использованием *t*-критерия Стьюдента, а также *U*-критерия Манна-Уитни. Критический уровень значимости был принят $p < 0,05$. Применялся стандартный пакет прикладных программ *Microsoft Office Excel 2003* для *MS Windows версия 1.0*, *SPSS* для *MS Windows*, версия 19.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Исходные характеристики образцов пуповинной крови, которые впоследствии подвергались обработке двойным центрифугированием, автоматической и полуавтоматической сепарацией, представлены в **табл. 1**. Показано, что значения *t*-критерия в группах, характеризующих объем ПК, количество ядродержащих клеток в 1 мл и всех ядродержащих клеток в образце ПК, достоверно не различались.

Результаты, полученные после обработки ПК с использованием двойного центрифугирования, полуавтоматического способа и автоматической системы, представлены в **табл. 2**.

Установлено, что медиана значений ряда показателей в группах полуавтоматической обработки и автоматической сепарации превышает значения, полученные при обработке ПК двойным центрифугированием. При сравнении этих групп непараметрическим критерием Манна-Уитни с группой I выявлены достоверные различия между показателями количества ядродержащих клеток в образце, количества ядродержащих клеток на единицу объема, выхода ядродержащих клеток от исходного количества. Также количество клеток *CD34⁺* на единицу объема было достоверно выше в группе II по сравнению с группой I. Важно отметить, что автоматизированные системы обработки ПК не снижали жизнеспособность ядродержащих клеток. Достоверных различий в группах II и III не выявлено.

Полученные данные свидетельствуют о том, что выделение фракции ядродержащих клеток из ПК полуавтоматической и автоматической сепарацией эффективнее способа двойного центрифугирования.



Таблица 1. Исходная характеристика образцов пуповинной крови в группах перед обработкой различными способами ($M \pm m$)

ГРУППА	СПОСОБ ОБРАБОТКИ ПК	ОБЪЕМ ОБРАЗЦА, МЛ	КОЛИЧЕСТВО ЯДРОСОДЕРЖАЩИХ КЛЕТОК, $\times 10^6$ КЛЕТОК/МЛ	ОБЩЕЕ КОЛИЧЕСТВО ЯДРОСОДЕРЖАЩИХ КЛЕТОК, $\times 10^6$ КЛЕТОК
I	Двойное центрифугирование ($n = 1797$)	$111,8 \pm 0,8$	$11,4 \pm 0,08$	$1286,4 \pm 13,4$
II	Автоматическая сепарация ($n = 1012$)	$110,9 \pm 0,2$	$11,1 \pm 0,16$	$1235,8 \pm 23,2$
III	Полуавтоматическая сепарация ($n = 78$)	$111,1 \pm 0,4$	$11,2 \pm 0,08$	$1266,6 \pm 18,9$



Таблица 2. Показатели пуповинной крови после обработки различными технологическими способами (Ме и размах вариант)

ГРУППА	СПОСОБ ОБРАБОТКИ ПК	КОЛИЧЕСТВО ЯДРО-СОДЕРЖАЩИХ КЛЕТОК, $\times 10^6$ КЛ/МЛ	ОБЩЕЕ КОЛИЧЕСТВО ЯДРО-СОДЕРЖАЩИХ КЛЕТОК, $\times 10^6$ КЛ	ВЫХОД ЯДРО-СОДЕРЖАЩИХ КЛЕТОК ОТ ИСХОДНОГО КОЛИЧЕСТВА, %	КОЛИЧЕСТВО CD34 ⁺ $\times 10^6$ КЛ/МЛ	ОБЩЕЕ КОЛИЧЕСТВО КЛЕТОК CD34 ⁺ , $\times 10^6$ КЛ	ЖИЗНЕ-СПОСОБНОСТЬ, %
I	Двойное центрифугирование (n = 1797)	39,2	860,0	73,0	0,09	1,95	98,6
		2,5-93,1	50,0-2000,0	47,3-98,2	0,002-0,31	0,05-6,6	96,6-100,0
II	Автоматическая сепарация (n = 1012)	43,3*	905,3*	81,9*	0,11*	2,1	99,2
		12,5-95,0	247,1-1950,0	65,1-97,6	0,005-0,4	0,09-7,5	96,6-100,0
III	Полуавтоматическая сепарация (n = 78)	42,3*	891,8*	81,7*	0,1	1,9	99,1
		8,5-83,5	669,0-1787,1	61,7-94,4	0,003-0,4	0,07-6,8	96,5-100,0

Примечания: * – различия достоверны в сравнении с группой I, $p < 0,05$.

Временные затраты на выделение фракции ядросодержащих клеток из одного образца ПК составили: двойное центрифугирование – 27,25 мин., автоматическая обработка – 54 мин., полуавтоматическая – 25,7 мин.

При сравнении расходов (все цены даны по данным дистрибьюторов) организация обработки ПК методом двойного центрифугирования требует приобретения рефрижераторной центрифуги (780 тыс. руб.) и расходных материалов (контейнер для крови) из расчета 27 руб. на один образец. Для автоматической сепарации ПК необходимо приобретение системы *Sepax S100* за 2,3 млн. руб. и разовых систем для обработки из расчета 6150 руб. на один образец. При эффективности, сравнимой с автоматическим способом обработки ПК, расходы на внедрение метода полуавтоматической сепарации составляют 1,3 млн руб. на приобретение аппарата и 1650 руб. для выделения ядросодержащих клеток из одного образца ПК (по ценам дистрибьюторов).

Таким образом, использование для обработки ПК полуавтоматических и автоматических систем позволяет повысить выделяемое количество ядросодержащих клеток. Выбор конкретного способа обработки ПК остается за банком и зависит от ряда факторов: численность персонала, количество поступающих и обрабатываемых образцов ПК в день, возможность своевременной закупки расходного материала, периодичность обслуживания оборудования и др. Представленные результаты сопоставительной оценки основных способов выделения фракции ядросодержащих клеток ПК по критерию «затраты – эффективность» могут быть учтены при организации деятельности банков пуповинной крови. Исходя из опыта работы Покровского банка стволовых клеток, при ежедневном поступлении и обработке 5 и более образцов ПК следует предложить систему полуавтоматической сепарации *Macopress Smart* как эффективную и требующую минимальных затрат времени для обработки одного образца ПК.

ВЫВОДЫ

1. ПОЛУАВТОМАТИЧЕСКАЯ *MACOPRESS SMART* (*MACOPHARMA*, ФРАНЦИЯ) И АВТОМАТИЧЕСКАЯ *SEPAX S100* (*BIOSAFE*, ШВЕЙЦАРИЯ) СИСТЕМЫ ОБЕСПЕЧИВАЮТ ЗНАЧИТЕЛЬНО БОЛЕЕ ВЫСОКИЙ ВЫХОД ФРАКЦИИ ЯДРОСОДЕРЖАЩИХ КЛЕТОК ИЗ ПК ПО СРАВНЕНИЮ С МЕТОДОМ ДВОЙНОГО ЦЕНТРИФУГИРОВАНИЯ И СОПОСТАВИМЫ ПО ЭФФЕКТИВНОСТИ.
2. ОБРАБОТКА ПК ПОЛУАВТОМАТИЧЕСКИМ СПОСОБОМ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ СИСТЕМЫ *MACOPRESS SMART* ТРЕБУЕТ НАИМЕНЬШИХ ЗАТРАТ ВРЕМЕНИ И В БОЛЬШЕЙ МЕРЕ УДОВЛЕТВОРЯЕТ ТРЕБОВАНИЯМ ПО КРИТЕРИЮ «ЗАТРАТЫ – ЭФФЕКТИВНОСТЬ».

ЛИТЕРАТУРА

1. Factors associated with outcomes of unrelated cord blood transplant: Guidelines for donor choice [Text] / E. Gluckman, V. Rocha, W. Arcese et al. // Experimental Hematology. – 2004. – Vol. 32, №4. – P. 397–407.
2. Unrelated donor hematopoietic cell transplantation: marrow or umbilical cord blood? [Text] / S.S. Grewal, J.N. Barker, S.M. Davies et al. // Blood. – 2003. – Vol. 101, № 11. – P. 4233–4244.
3. Gluckman E. Ten years of cord blood transplantation: from bench to bedside [Text] / E. Gluckman // British Journal of Haematology. – 2009. – Vol. 147, № 2. – P. 192–199.
4. Barker J.N. Umbilical cord blood transplantation for the treatment of cancer [Text] / J.N. Barker, J.E. Wagner // Nature Reviews Cancer. – 2003. – Vol. 3, № 7. – P. 526–532.
5. Barker J.N. Optimizing Unrelated Donor Cord Blood Transplantation [Text] / J.N. Barker, V. Rocha, A. Scaradavou // Biol. Blood Marrow Transplant. – 2009. – Vol. 15, № 1. – P. 154–161.
6. Processing and cryopreservation of placental/umbilical cord blood for unrelated bone marrow reconstitution [Text] / P. Rubinstein, L. Dobrila, R. E. Rosenfield et al. // Proc. Nati. Acad. Sci. USA. – 1995. – Vol. 92, № 22. – P. 10119–10122.
7. A simple and reliable procedure for cord blood banking, processing, and freezing: St Louis and Ohio Cord Blood Bank experiences [Text] / J.M. Alonso, D.M. Regan, C.E. Johnson et al. // Cytotherapy. – 2001. – Vol. 3, № 6. – P. 429–433.
8. Standarts for Cellular Therapy Product Services [Text] / AABB; 5th edition. – 2011. – 126 p.

9. The Bottom and Top System: A New Technique for Blood Component Preparation and Storage [Text] / C.F. Högman, L. Eriksson, K. Hedlund et al. // Vox Sanguinis. – 1988. – Vol. 55, № 4. – P. 211–217.
10. Umbilical cord blood collection and separation for haematopoietic progenitor cell banking [Text] / J.A. Ademokun, C. Chapman, J. Dunn et al. // Bone Marrow Transplantation. – 1997. – Vol. 19, № 10. – P. 1023–1028.
11. The London Cord Blood Bank: analysis of banking and transplantation outcome [Text] / S. Davey, S. Armitage, V. Rocha et al. // British Journal of Haematology. – 2004. – Vol. 125, № 3. – P. 358–365.
12. Development of a district Cord Blood Bank: a model for cord blood banking in the National Health Service [Text] / C. Donaldson, R. Buchanan, J. Webster et al. // Bone Marrow Transplantation. – 2000. – Vol. 25, № 8. – P. 899–905.
13. Umbilical cord blood processing with the Optipress II blood extractor [Text] // M.I. Godinho, M.E. de Sousa, A. Carvalhais et al. // Cytotherapy. – 2000. – Vol. 2, № 6. – P. 439–443.
14. Automated separation of cord blood units in top and bottom bags using the Compomat G4 [Text] // P. Solves, V. Mirabet, F. Carbonell-Uberos et al. // Clin Lab Haematol. – 2006. – Vol. 28, № 3. – P. 202–207.
15. Red blood cell depletion with a semiautomated system or hydroxyethyl starch sedimentation for routine cord blood banking: a comparative study [Text] / P. Solves, V. Mirabet, D. Planelles et al. // Transfusion. – 2005. – Vol. 45, № 6. – P. 867–873.
16. Dextran sedimentation in a semi-closed system for the clinical banking of umbilical cord blood. Transfusion [Text] / K.S. Tsang, K. Li, D.P. Huang et al. – 2001. – Vol. 41, № 3. – P. 344–352.
17. Ten-year quality control of a semiautomated procedure of cord blood unit volume reduction [Text] / L. Lecchi, L. Perego, F. Garcea et al. // Transfusion. – 2008. – Vol. 49, № 3. – P. 563–569.
18. Cord blood banking: volume reduction of cord blood units using a semi-automated closed system [Text] / S. Armitage, D. Fehily, A. Dickinson et al. // Bone Marrow Transplantation. – 1999. – Vol. 23, № 5. – P. 505–509.
19. A strategy of splitting individual high volume cord blood units into two half subunits prior to processing increases the recovery of cells and facilitates ex vivo expansion of the infused haematopoietic progenitor cells in adults [Text] / A.C. Papassavas, V. Gioka, T. Chatzistamatiou et al. // Int. J. Lab Hematol. – 2008. – Vol. 30, № 2. – P. 124–132.
20. Fully automated and reproducible cord blood processing using the Biosafe Sepax and Coolmix Devices [Text] / K. Theunissen, M. Boogaerts, L. Lauweryns et al. // Abstracts of ASN Conference. – San-Diego. – 2003.
21. A simple filtration system for red blood cell depletion and volume reduction in routine processing of human umbilical cord blood [Text] / S.O. Sowemimo-Coker, F. Andrade, A. Kim et al. // Vox Sanguinis – 2009. – Vol. 96, № 2. – P. 138–145.
22. Umbilical cord blood [Text] / D.H. McKenna et al. // Core Principles in cellular therapy / ed. by J.D. Roback et al. / AABB, Bethesda, 2008. – Chapter 3. – P. 47–72.
23. Cryopreservation of umbilical cord blood with a novel freezing solution that mimics intracellular ionic composition [Text] // I.B. Nicoud, D.M. Clarke, G. Taber et al. // Transfusion. – 2012. – Vol. 52, № 9. – P. 2055–2062.
24. Орлов А. И. Непараметрическое точечное и интервальное оценивание характеристик распределения [Текст] / А. И. Орлов // Заводская лаборатория. – 2004. Вып. 70, № 5. – С. 65–70.
25. Холлендер М. Непараметрические методы статистики [Текст] / М. Холлендер, Д. Вульф // Пер. с англ. – М.: Финансы и статистика, 1983. – 518 с.
26. Вероятность и математическая статистика. Энциклопедия [Текст] / гл. ред. Ю.В. Прохоров. – М.: Изд-во «Большая Российская Энциклопедия», 1999. – 910 с.
27. Власов В.В. Введение в доказательную медицину [Текст] / В.В. Власов // М.: МедиаСфера, 2001. – 392 с.

Авторы подтверждают отсутствие возможных конфликтов интересов.

Статья поступила в редакцию 16.02.2014 г.

Принята к печати 06.03.2014 г.

Рекомендована к печати на заседании редакционной коллегии после рецензирования.



**СТАТЬЯ НА САЙТЕ
TRANSPLANTOLOGY.ORG**