

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН
РГП НА ПХВ «НАУЧНО-ПРОИЗВОДСТВЕННЫЙ ЦЕНТР
ТРАНСФУЗИОЛОГИИ»

Буркитбаев Ж.К., Оспанова М.Е., Абдрахманова С.А.,
Балгабаева Т.С., Ахаева М.А.

**ЗАГОТОВКА И ХРАНЕНИЕ ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ СТВОЛОВЫХ
КЛЕТОК ПЛАЦЕНТАРНОЙ КРОВИ**

Методические рекомендации

Астана
2017

УДК 615. 1/4
ББК 52.82
3-14

Буркитбаев Ж.К., Оспанова М.Е., Абдрахманова С.А., Балтабаева Т.С., Ахаева М.А. Заготовка и хранение гемопоэтических стволовых клеток плацентарной крови: Методические рекомендации/ НППЦТ.,-Астана,2017, 21 с.

ISBN 978-601-7541-55-2

Авторы:

- Буркитбаев Ж.К. - кандидат медицинских наук, Директор РГП на ПХВ «Научно-производственный центр трансфузиологии»
- Оспанова М.Е. - заведующая отделением криобиологии РГП на ПХВ «Научно-производственный центр трансфузиологии»
- Абдрахманова С.А. - кандидат медицинских наук, Заместитель директора РГП на ПХВ «Научно-производственный центр трансфузиологии»
- Балтабаева Т.С. - заведующая отделением управления качеством и внутреннего аудита РГП на ПХВ «Научно-производственный центр трансфузиологии»
- Ахаева М.А. - магистр естественных наук, специалист отделения криобиологии РГП на ПХВ «Научно-производственный центр трансфузиологии»

Рецензенты:

1. Аскарров М.Б. - доктор медицинских наук, Руководитель Центра клеточных технологий и трансплантации, «Национальный научный медицинский центр»
2. Кеймакин В.М. - кандидат медицинских наук, Руководитель департамента онкогематологии и трансплантологии костного мозга Национальный научный центр онкологии и трансплантологии

В методических рекомендациях изложены этапы отбора доноров плацентарной крови, методы фракционирования плацентарной крови и система эффективной заготовки и хранения ПК. Методические рекомендации предназначены для специалистов службы крови, лаборатории криобиологии.

Утверждено и разрешено к изданию типографическим способом РГП «Республиканский центр развития здравоохранения» (протокол заседания Экспертной группы РЦРЗ № 55 от 22 декабря 2017 года).

© Буркитбаев Ж.К., Оспанова М.Е., Абдрахманова С.А. и др., 2017.

Содержание

Перечень сокращений	4
Введение	5
1. Заготовка и переработка плацентарной крови	6
для получения ГСК	
1.2 Отбор доноров плацентарной крови.....	7
1.3 Процедура сбора плацентарной крови	9
2. Процессинг плацентарной крови	10
2.1 Оценка пригодности плацентарной крови к переработке.....	10
2.2 Переработка ПК с целью выделения фракции ГСК	13
2.2.1 Подготовка к переработке плацентарной крови	13
2.2.2 Выделение концентрата СК методом двойного центрифугирования	14
2.2.3 Выделение концентрата СК методом аппаратного цитафереза.....	15
2.2.4 Процедура криоконсервации образца ГСК ПК.....	16
Заключение	18
Список использованных источников	19
Список рекомендуемой литературы	21

Перечень сокращений, условных обозначений, символов

ГСК - гемопоэтические стволовые клетки
NetCord-FACT - международные стандарты
Worldwide Network for Blood and Marrow Transplantation - Всемирная сеть трансплантации крови и костного мозга
ПК - плацентарная кровь
СК - стволовые клетки
ГСК ПК - гемопоэтические стволовые клетки плацентарной крови
WBC - white blood cells - белые кровяные клетки
HLA - Human Leucocyte Antigens - человеческие лейкоцитарные антигены
ДМСО - диметилсульфоксид
ГЭК - гидроксипропилкрахмал

Введение

В настоящее время значительно возрос интерес к плацентарной крови как к альтернативному источнику репопулирующих гемопоэтических стволовых клеток (далее - ГСК), пригодному для трансплантации.

В мировой практике более 30 лет проводят трансплантации ГСК плацентарной крови для лечения онкогематологических и других заболеваний системы крови [1].

Первая успешная трансплантация ГСК пуповинной крови ребенку с анемией Фанкони (1988) послужила отправной точкой для расширения объемов трансплантации стволовых клеток плацентарной крови и создания системы ее банковского обеспечения [1,2,3].

В последнее время возрастает количество трансплантаций ГСК из плацентарной крови (Rubinstein P., 1999; Gluckman E., 2004; Rocha V., 2007).

Использование современных технологий сбора и обработки пуповинной крови в рамках международных стандартов NetCord-FACT позволяют сократить потери клеток при сборе и обработке плацентарной крови. Однако множество причин, влияющих на клеточный состав, на различную степень седиментации эритроцитов при обработке ПК (Sparrow R.L., 2002; Askari S., 2005; Rocha V., 2007) делают актуальным определение прогностических факторов. На основании этих данных можно провести оценку пригодности плацентарной крови для хранения в качестве трансплантационного материала для неродственных трансплантаций [1,2,4].

В мировой системе банков плацентарной крови крупнейшим является Нью-Йоркский центр плацентарной крови [1,2]. По данным некоммерческой организации Международная сеть трансплантации костного мозга (Worldwide Network for Blood and Marrow Transplantation), в 2012 году было зафиксировано более 1 млн. трансплантаций гемопоэтических стволовых клеток по всему миру, из них более 30 000 трансплантаций плацентарной крови [5].

Накопленный мировой опыт трансплантации ГСК плацентарной крови подтверждает их высокий репопуляционный потенциал.

Проблема качественной заготовки и хранения ГСК плацентарной крови является актуальной и в Республике Казахстан.

В этой связи, в 2009 году на базе Научно-производственного центра трансфузиологии впервые открыта лаборатория криобиологии, занимающаяся созданием регистра образцов ГСК плацентарной крови, готовых для клинического применения.

1. Заготовка и переработка плацентарной крови для получения гемопоэтических стволовых клеток

Процедура получения образца гемопоэтических стволовых клеток плацентарной крови, пригодного для проведения трансплантации — это многоэтапный процесс, начиная с процедуры отбора доноров плацентарной крови с последующими этапами ее сбора, переработки с целью выделения фракции ГСК и их криоконсервирования, а также целого спектра лабораторных исследований для обеспечения качества полученного трансплантата. Применение современных технических средств позволяет эффективно выделять из плацентарной крови фракцию гемопоэтических стволовых клеток. Современные протоколы криоконсервации позволяют максимально сохранить жизнеспособность стволовых клеток и их дальнейшую функциональную активность [6,7].

Важным аспектом заготовки является наличие службы, располагающей возможностью эксплуатации соответствующего оборудования для проведения процессинга плацентарной крови. Этапы переработки плацентарной крови с выделением фракции стволовых клеток, дальнейшая криоконсервация и криогенное хранение, предусматривает также наличие лабораторной службы, которая выполняет следующие виды исследований: на маркеры трансфузионных инфекций, бактериологические, иммуногематологические и иммунологическое титрование тканей [8].

При организации деятельности подразделения процессинга плацентарной крови необходимо выделить ряд помещений для обеспечения технологической поточности всех мероприятий, а также наличие необходимого оборудования [9].

При планировании помещений необходимо выделить зоны приема и регистрации биологических материалов и сопроводительной документации, зоны фракционирования плацентарной крови и подготовки к криоконсервации образцов ГСК, с наличием стерильной зоны для проведения инвазивных манипуляций и зоны криогенного хранения образцов гемопоэтических стволовых клеток.

Минимальный перечень оборудования должен включать в себя оборудование для проведения фракционирования плацентарной крови (рефрижираторная центрифуга, весы-уравновешиватели и/или аппарат цитафереза) и сопутствующих манипуляций (медицинские весы, стриппер-выжиматель, плазмаэкстрактор, запаиватель магистралей, аппарат стерильного соединения магистралей), оборудование для криоконсервации (программный замораживатель, рефрижиратор, дьюары с жидким азотом). Все инвазивные манипуляции с гемаконами должны производиться в условиях стерильности окружающей среды, что может быть достигнуто применением шкафов биологической безопасности с ламинарным потоком воздуха [10].

1.2 Отбор доноров плацентарной крови

Донором плацентарной крови выступает здоровая беременная женщина. Сбор плацентарной крови является абсолютно безопасной процедурой, как для матери, так и для новорожденного.

Сбор плацентарной крови производит обученный акушерско-гинекологический персонал. Оказание необходимой медицинской помощи матери и ребенку является приоритетом. Сбор плацентарной крови не является первостепенной задачей акушерского персонала.

Со стороны женщины, согласившейся стать донором пуповинной крови, необходимо предоставление правдивой информации о своем здоровье и семейном анамнезе.

Вся информация о доноре является конфиденциальной и не подлежит огласке.

Отбор кандидатов в доноры среди рожениц является важным этапом обеспечения качества образцов ГСК плацентарной крови.

Отбор кандидатов проводится из числа здоровых рожениц, состоявших на учете по беременности, прошедших обследование в рамках гарантированной медицинской помощи.

Предварительно у беременной женщины необходимо получить письменное информированное согласие на сбор плацентарной крови. В беседе с роженицей необходимо её информировать:

- о цели сбора плацентарной крови;
- о безопасности процедуры сбора плацентарной крови для самой женщины и новорожденного;
- о том, какие имеются противопоказания к донации плацентарной крови;
- об обязательном согласии роженицы на донацию плацентарной крови в письменном виде;
- о том, что отказ от донации плацентарной крови может быть принят на любом этапе донации в устной форме без объяснения причины;
- о том, что решение об отказе от донации плацентарной крови так же может быть принято персоналом организации родовспоможения, так как обеспечение безопасности жизни роженицы и оказание необходимой медицинской помощи во время родов должны быть приоритетом.

Необходимо тщательно собрать данные анамнеза жизни, акушерского анамнеза и вносить их в анкету донора.

Существуют абсолютные и относительные противопоказания к донации плацентарной крови [11].

Абсолютными противопоказаниями к сбору плацентарной крови являются:

1) наличие носительства и установленных инфекционных заболеваний, в том числе ВИЧ-инфекция, вирусные гепатиты, сифилис и заболевания, передающиеся половым и гемотрансмиссивным путем;

2) установленные генетические заболевания у роженицы и в семейном анамнезе;

3) наследственные и врожденные патологии, в том числе кроветворной и иммунной систем;

4) психические заболевания;

5) онкологические заболевания, в том числе в стадии ремиссии;

6) применение цитостатических и тератогенных средств во время беременности;

7) наркомания, токсикомания, алкоголизм в семейном анамнезе;

8) переливание крови и ее компонентов, оперативные вмешательства (в том числе аборт) в течение последних 12 месяцев;

9) лечение методом иглоукалывания, выполнение пирсинга и татуировок в течение 12 месяцев перед родами;

10) постоянное отстранение от донорства крови (при наличии такового);

11) отказ роженицы от донации плацентарной крови (на любом этапе).

Относительные противопоказания к донорству плацентарной крови связаны с особенностями течения настоящей беременности и родов. В ряде случаев при имеющейся необходимости сбора плацентарной крови могут быть проигнорированы при условии отсутствия риска развития угрожающих состояний у женщины и новорожденного.

К относительным противопоказаниям относятся:

1) анемия беременных во второй половине беременности;

2) угроза прерывания беременности в течение всего срока беременности;

3) срок гестации менее 37 недель и более 40 недель беременности;

4) вторая степень зрелости плаценты;

5) наличие в анамнезе у матери неспецифического инфекционного заболевания в первую половину беременности;

6) возраст матери более 40 лет;

7) третьи и более роды;

8) многоплодная беременность;

9) продолжительность безводного периода более 4-х часов;

10) кесарево сечение.

Добровольное информированное согласие заполняется в 2-х экземплярах: один экземпляр остается у женщины, второй – передается в организацию, осуществляющую переработку плацентарной крови.

Необходимо проверить полноту заполнения документации – информированного согласия, анкеты донора. Неполное заполнение сопроводительной документации служит основанием к выбраковке образца плацентарной крови и его дальнейшей утилизации.

В случае отказа от донации ПК на любом этапе по решению самой роженицы необходимо поставить соответствующую отметку в анкете донора.

Необходимо провести взятие проб периферической крови беременной женщины для проведения исследований на наличие маркеров трансфузионных инфекций. Обязательным условием является маркировка пробирок с пробами крови с указанием фамилии, инициалов и даты рождения роженицы.

1.3 Процедура сбора плацентарной крови

Процедура сбора плацентарной крови требует внимания и четкого выполнения всех действий, так как является важным этапом обеспечения выделения максимального количества стволовых клеток.

Сбор проводят после рождения ребенка и его отделения от последа, из пупочной вены последа (до момента его рождения, т.е. пока он находится внутри полости матки). Для сбора плацентарной крови используются стерильные закрытые донорские системы, обязательным условием является соблюдение правил асептики и антисептики [11].

Плацентарную кровь получают при физиологических родах доношенных новорожденных (37–40 недель гестации (медиана - 40 недель) при отсутствии стандартных противопоказаний.

Перед сбором плацентарной крови у роженицы необходимо удостовериться в ее согласии на донацию (наличие подписанного информированного согласия и заполненной анкеты донора ПК). Если принято решение об отказе от донации плацентарной крови на любом этапе: либо самой роженицей, либо персоналом организации родовспоможения, необходимо поставить соответствующую отметку в анкете донора.

Предварительно необходимо проверить срок годности используемой донорской системы, осуществить контроль целостности гемаконов, визуально оценить качество антикоагулянта (прозрачность, цвет, наличие примесей и пр.). При нарушении герметичности, нарушении прозрачности и наличии примесей в антикоагулянте гемаконы не используют.

Обязательным условием является маркировка гемакона с указанием на них ФИО и даты рождения роженицы, даты сбора плацентарной крови.

Сбор плацентарной крови необходимо провести непосредственно в основной мешок донорской системы с антикоагулянтом. В современных донорских системах следует предварительно исключить попадание плацентарной крови в мешок для первой порции крови путем его герметизации, например, механически закрыть зажимом.

Сбор проводят до момента рождения плаценты, пока она находится в полости матки (in utero), что снижает риск бактериальной контаминации. Также при таком методе сбора задействуется сжимающий эффект сокращающихся мышц матки, что позволяет забрать оптимальный объем плацентарной крови.

Место предполагаемой пункции пупочной вены необходимо обработать стерильной салфеткой, смоченной в растворе антисептика. Проведя пункцию пупочной вены, начинают сбор плацентарной крови, путем самотёка, опустив гемакон ниже уровня таза роженицы на 50-60 см.

При ослаблении кровотока необходимо подождать 5 секунд, вена может повторно наполниться кровью, после чего можно продолжать сбор плацентарной крови. Допускается щадящая пальпация низа живота в проекции матки и пупочного канатика с целью усиления вытекания крови в гемакон.

При необходимости проводится повторная пункция пупочной вены. Во время сбора плацентарной крови необходимо помешивать поступающую кровь с консервирующим раствором каждые тридцать-сорок секунд. После завершения сбора необходимо надежно герметизировать магистраль, закрыв зажимом. Надевать на иглу колпачок запрещено во избежание риска укола. Защитный чехол натягивается на иглу до щелчка.

Также необходимо собрать пробу плацентарной крови в пробирку с антикоагулянтом для дальнейших исследований. Допустимо проводить отбор данной пробы шприцем из рожденной плаценты.

При загрязнении гемакон с кровью тщательно протирается салфеткой, смоченной в дезинфицирующем растворе, затем упаковывается в полиэтиленовый пакет.

После окончания процедуры сбора плацентарной крови в присутствии роженицы проводится повторная идентификация её данных с данными маркировки гемакона и вакутейнеров, указывается дата и время сбора плацентарной крови, заполняется сопроводительная документация.

Хранение гемакона с плацентарной кровью и его транспортировка в службу процессинга плацентарной крови проводится при температуре $+22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ в темном сухом месте. Пробирки с образцами плацентарной крови и периферической крови матери для лабораторного тестирования до момента процессинга хранятся и транспортируются при температуре $+4^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ [12].

Срок хранения с момента сбора плацентарной крови до начала процессинга не должен превышать более 48 часов. Транспортировка биоматериала в службу процессинга должна быть осуществлена в течение 24 часов. Перед транспортировкой необходимо проверить наличие всех компонентов, соответствие маркировки, полноту заполнения сопроводительной документации.

2. Процессинг плацентарной крови

2.1 Оценка пригодности плацентарной крови к переработке

В службе процессинга плацентарной крови при поступлении биоматериала ведется контроль полноты поступившего комплекта, который должен состоять из гемакона с плацентарной кровью, соответствующих ему

пробирок с образцами плацентарной крови и периферической крови матери для лабораторного тестирования, пакета сопроводительной документации, а также контроль условий хранения и транспортировки [13].

Проводится визуальная оценка содержимого гемакона с плацентарной кровью на герметичность, на наличие сгустков, хлопьев, пленки, признаков гемолиза и бактериальной контаминации.

Проводится проверка полноты заполнения документации, соответствие данных с маркировкой на гемаконе с плацентарной кровью и с маркировкой пробирок с образцами плацентарной крови и периферической крови женщины-донора.

Проводится взвешивание гемакона с плацентарной кровью, с целью уточнения объема собранной плацентарной крови. Рекомендуемый чистый вес плацентарной крови без учета веса самого гемакона и объема антикоагулянта, должен составлять более 40 мг.

С целью оценки пригодности образца плацентарной крови к процессингу в ней проводят определение уровня ядросодержащих клеток (лейкоцитов или WBC – white blood cells) [14]. Отбор пробы проводят в условиях ламинарного шкафа с помощью стерильного шприца (в данном случае нарушается герметичности гемакона), или отбирают пробу путем перевода содержимого гемакона после тщательного перемешивания в магистраль с помощью стриппера и отделения необходимого отрезка магистрали с помощью запаивателя (в данном случае герметичность гемакона не нарушается). Исследование пробы проводится на автоматическом гематологическом анализаторе.

Расчет абсолютного количества ядросодержащих клеток в дозе плацентарной крови проводится по формуле:

$$\text{WBC}_1 \times 10^9 \text{ в дозе} = (\text{WBC} \times 10^9 / \text{л} * \text{«чистый» вес ПК}) / 1000$$

** «чистый вес» - вес самой дозы плацентарной крови без учета веса гемоконсерванта и гемакона*

При уровне WBC_1 более $0,4-0,6 \times 10^9$ в дозе образец плацентарной крови допускается к процессингу.

Пробирки, содержащие образцы периферической крови донора плацентарной крови, соответствующие допущенным к процессингу гемаконам с плацентарной кровью, направляются на лабораторное тестирование на наличие маркеров трансфузионных инфекций (код исследования на ВИЧ: 108.3 – доноры органов и клеток). Результаты тестирования должны быть выданы в течение 12 часов.

Отрезок магистрали (не менее 20 см), содержащий плацентарную кровь, направляется на бактериологическое исследование. Предварительные результаты бактериологического исследования на стерильность должны быть выданы через 12 часов.

Процессинг допущенных доз плацентарной крови откладывается до получения результатов тестирования на трансфузионные инфекции и бактериологического исследования на стерильность.

До начала процессинга гемаконы с плацентарной кровью хранятся при температуре $+22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ в темном сухом месте, а оставшиеся пробирки с образцами плацентарной крови и периферической крови матери для лабораторного тестирования – при температуре $+4^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ в условиях специализированного холодильника.

При выполнении исследования возможны выбраковки доз плацентарной крови. Возможные причины выбраковки на всех этапах исследования представлены в таблице 1.

Таблица 1 - Причины выбраковки доз плацентарной крови

№	Этап выбраковки	Причина выбраковки
1	Транспортировка комплекта в службу процессинга плацентарной крови	Временной промежуток с момента сбора плацентарной крови до момента ее доставки в ОКБ составил более 24 часов, нарушение температурного режима транспортировки
2	Проверка полноты комплекта	Отсутствие какой-либо составляющей комплекта
3	Макроскопическая оценка содержимого гемакона с плацентарной кровью	Нарушение герметичности гемакона с плацентарной кровью, наличие гемолиза, хлопьев, пленки, признаков бактериальной контаминации
4	Проверка сопроводительной документации, сверка маркировки гемакона с плацентарной кровью, пробирок с образцами плацентарной крови и периферической крови женщины-донора	Отсутствие информации о доноре плацентарной крови, неполное заполнение документации, наличие несоответствия маркировки
5	Взвешивание гемакона с плацентарной кровью	Чистый вес плацентарной крови менее 40 гр.
6	Определение содержания ядросодержащих клеток (лейкоцитов) в плацентарной крови	Содержание ядросодержащих клеток менее $0,4 \times 10^9$ клеток в образце плацентарной крови
7	Лабораторное тестирование периферической крови донора плацентарной крови	Результаты ИХЛА и ПЦР на наличие маркеров трансфузионных инфекций положительные
8	Бактериологическое исследование плацентарной крови на стерильность	Предварительные результаты на бактериальную контаминацию положительные

Недопущенные к процессингу образцы плацентарной крови, соответствующие им пробирки с периферической кровью женщины-донора, подлежат обязательной утилизации как опасные медицинские отходы класса «Б».

2.2 Переработка плацентарной крови с целью выделения фракции гемопоэтических стволовых клеток

В основе всех методов фракционирования плацентарной крови лежит ее центрифугирование и разделение на глобулярную и жидкую части. Цель любой методики сепарации заключается в выделении лейко-тромбоцитарного слоя (buffy-coat), содержащего ядросодержащие клетки, в том числе и гемопоэтические стволовые клетки [15].

Фракционирование позволяет удалить излишки эритроцитов, что немаловажно при иногруппной по системе АВ0 и резус трансплантации, а также снизить содержание гемолизированных клеток в конечном продукте. Также в результате фракционирования уменьшается объем замораживаемого продукта, что позволяет снизить дозу вводимого раствора крипротектора и снизить риск возникновения его побочного действия.

Существует метод фракционирования с применением рефрижераторной центрифуги. В данном случае присутствие оператора необходимо на каждом этапе. Важным аспектом является проведение валидации имеющегося оборудования для определения наилучших режимов центрифугирования для эффективного выделения целевого продукта [15,16,17].

Также существует метод фракционирования с применением аппаратов автоматического цитафереза, когда присутствие оператора минимизировано. В основе лежит разделение на конечные продукты под контролем оптических датчиков, что увеличивает эффективность выделения buffy-coat –слоя [17,18,19].

2.2.1 Подготовка к переработке плацентарной крови

Необходимо повторно провести идентификацию всех компонентов: гемакона с плацентарной кровью, пробирок с образцами плацентарной крови и периферической крови женщины-донора. Каждому гемакону с плацентарной кровью и соответствующим ему пробиркам присуждается единый идентификационный штрих-код [19,20,21].

Предварительно из гемакона с плацентарной кровью отбирается проба для тканевого типирования по HLA-системе.

Для эффективного разделения плацентарной крови на слои во время центрифугирования предварительно в гемакон вводится седиментирующий раствор, в качестве которого может выступить 6% раствор гидроксипропила крахмала. Данная процедура проводится в условиях

ламинарного шкафа.

Доза вводимого раствора гидроксиэтилкрахмала составляет 20% от «рабочего» веса плацентарной крови – веса дозы плацентарной крови вместе с антикоагулянтом, без учета веса гемакона и рассчитывается по формуле:

$$V_{ГЭК} (\text{мл}) = \text{«рабочий» вес ПК} \times 0,2$$

Расчетная доза гидроксиэтилкрахмала вводится посредством стерильного шприца путем прокола магистрали, идущей к гемакону, после тщательной дезинфекции и при постоянном помешивании содержимого гемакона. После введения гидроксиэтилкрахмала необходимо тщательно герметизировать магистраль с помощью запаивателя проксимальнее места прокола. Дистальный участок магистрали в месте запаивания отрезается и утилизируется.

2.2.2 Выделение концентрата стволовых клеток методом двойного центрифугирования

Выделение концентрата стволовых клеток методом двойного центрифугирования подразумевает под собой использование рефрижераторной центрифуги и проводится в два этапа.

Первый этап центрифугирования – разделение на плазму, содержащую фракцию стволовых клеток и глобулярную массу (эритроциты).

Целью этапа является удаление эритроцитов. На данном этапе центрифугирование проводится в «мягком» режиме при ускорении 400-420g в течение 7-10 минут при минимальном торможении. Гемаконы помещаются в центрифужные стаканы портами вниз. Важным является наличие пустого гемакона, куда по окончании данного этапа сбрасываются эритроциты в пределах 75%. Чрезмерное удаление эритроцитов чревато увеличением потери ядросодержащих клеток. После удаления эритроцитов гемаконы отсоединяются с помощью запаивателя магистралей. Эритроциты могут быть использованы для проведения иммуногематологических исследований.

Второй этап центрифугирования – выделение концентрата стволовых клеток из оставшейся в гемаконе плазмы со взвешенными в ней форменными элементами. К гемакону с плазмой с помощью стерильного коннектора прикрепляется пустой стерильный гемакон. На данном этапе центрифугирование проводится в «жестком» режиме для максимального осаждения имеющихся клеток при ускорении в пределах 1200-1300g в течение 15 минут при минимальном торможении.

Гемаконы помещаются в центрифужные стаканы портами вверх. После остановки центрифуги гемакон аккуратно вынимается из центрифужного стакана, помещается в плазмоекстрактор, с помощью которого надосадочную плазму аккуратно переводят в пустой гемакон. Гемаконы отделяются путем запаивания магистрали между ними.

Оставшаяся клеточная взвесь ресуспендируется и переводится в мешок для глубокой заморозки клеток и тканей для дальнейшей криоконсервации. Проводится отбор пробы в объеме 0,5-1,0 мл для определения уровня содержания ядросодержащих клеток и процента выхода клеток, определения методом проточной цитометрии уровня стволовых клеток с маркерами CD34+ и определения их жизнеспособности.

Надосадочная плазма в минипробирках может быть использована для дальнейшего тестирования, отбора архивных образцов при необходимости повторных исследований. Минипробирки хранятся под тем же идентификационным кодом, что и основной образец стволовых клеток, с дополнительным обозначением вида биоматериала, согласно системе идентификации, имеющейся в службе процессинга.

2.2.3 Выделение концентрата стволовых клеток методом аппаратного цитафереза

Данный метод предполагает использование имеющийся в наличии системы аппаратного цитафереза [22].

Целью данного этапа является уменьшение общего объема биоматериала, удаления эритроцитов, тромбоцитов и сохранение максимального количества гемопоэтических прогениторных клеток. Используются закрытые системы расходных материалов, включающих в себя сепарационную камеру переменного объема, что позволяет обработать любой объем исходного образца, мешки для сбора плазмы и эритроцитов, а также возможно наличие криомешка для фракции buffy-coat [22,23,24].

Автоматический метод позволяет достичь высокого выхода ядросодержащих клеток в конечном продукте. Содержание стволовых клеток может составить более 90% от начального количества. Конечный продукт характеризуется высокой жизнеспособностью - 97% и низким гематокритом, что в конечном итоге будет означать высокую жизнеспособность после размораживания. Минимизируется риск бактериальной контаминации и потери образца. Дополнительным преимуществом автоматизации является сокращение времени процедуры, возможна стандартизация отчетов о проведении процедур [25,26].

Присоединение расходных наборов к гемакону с плацентарной кровью необходимо проводить с соблюдением правил асептики и антисептики. Предварительно необходимо провести оценку пригодности набора (проверка сроков годности, отсутствие нарушения герметичности, повреждений), его соответствие проводимой процедуре.

Процедура проводится согласно инструкции производителя оборудования.

2.2.4 Процедура криоконсервации образца гемопоэтических стволовых клеток плацентарной крови

Время хранения полученной фракции гемопоэтических стволовых клеток плацентарной крови при температуре выше 0°C ограничивается 48-56 часами, что не отвечает клиническим потребностям. Поэтому в настоящее время имеет широкое применение криоконсервация – процесс глубокой заморозки клеток и тканей с последующим хранением в условиях температуры от -80°C до -196°C.

Хранение клеточной взвеси в условиях ультранизких температур диктует использование соответствующих криомешков – мешков для глубокой заморозки клеток и тканей, выполненных из этилвинилацетатного пластика, стойкого к действию низких температур, отличающегося пластичностью, прозрачностью, не обладающего пирогенными свойствами.

В основном криомешки снабжены рядом специальных портов различных модификаций, с помощью которых вводится внутрь как собственно клеточная взвесь, так и растворы для оптимизации процессов криоконсервации. Все инвазивные манипуляции с криомешками необходимо проводить в условиях ламинарного шкафа, при необходимости соединения трубок используют аппарат стерильного соединения магистралей.

Важную роль играет маркировка криомешков, для чего используются криогенные этикетки, стойкие к действию низких температур. Обычно данные этикетки выполняются на металлизированной основе. Надписи с данными об образце ГСК на этикетки наносятся резиносодержащей краской с помощью специальных термопринтеров.

Этикетки на криомешки необходимо наклеивать тщательно, не задевая руками клейкой стороны. Для более тщательного наклеивания этикеток допускается предварительное обезжиривание криомешка путем протирания его ватным шариком, смоченным в спирте.

На рисунках 1 и 2 представлены примеры этикетки для маркировки криомешка и вид криомешка.

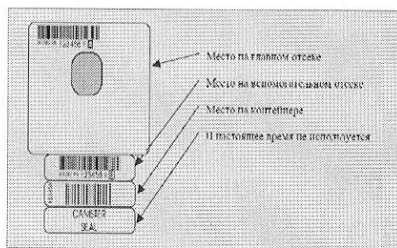


Рисунок 1 - Пример этикетки для маркировки криомешка

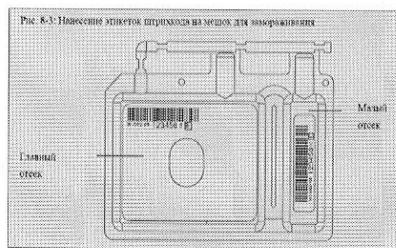


Рисунок 2 - Вид криомешка

При замораживании клеточной взвеси значительная часть форменных элементов, присутствующих в ней, подвергается лизису, в основном в момент кристаллизации – перехода жидкой фазы в твердую.

Для уменьшения процента гибели клеток применяют специальные растворы, называемые криопротекторами. Действие криопротекторов направлено на связывание молекул воды и снижение их вовлечения в процесс роста кристаллов льда, что в свою очередь снижает резкие изменения осмолярности и способствует сохранению целостности клеточных мембран. Наиболее широкое распространение среди применяемых растворов криопротекторов имеет диметилсульфоксид (ДМСО). Оптимальное содержание ДМСО в конечном продукте для криоконсервации составляет 7-10%. При данном соотношении криопротекция клеток сохраняется, при этом не требуется отмывания от криопротектора перед трансфузией клеточной взвеси и риск побочного действия на реципиента также невысокий. Раствор ДМСО и клеточная взвесь перед смешиванием должны быть охлаждены до температуры +4°C и при введении так же необходимо соблюдать данный температурный режим. Для этих целей допустимо применение хладагентов.

Криопротектор вводится в клеточную взвесь медленно. При введении с целью выравнивания концентрации криопротектора в криомешке проводится аккуратное помешивание методом постукивания пальцами по криомешку (на горизонтальной поверхности).

После введения криопротектора допустимо провести отбор необходимого количества содержимого, без размораживания основного образца, для архивирования с целью проведения дополнительных исследований. Архивные образцы в минипробирках хранятся в аналогичных условиях, что и основной образец ГСК плацентарной крови.

После окончания процесса из криомешка с клеточной взвесью удаляются излишки воздуха и магистраль герметизируется с помощью запаивателя. Магистраль аккуратно отрезается в месте пайки. На магистрали допустимо формирование отрезков с содержанием клеточной взвеси.

Криомешок с клеточной взвесью необходимо поместить дополнительно в оберточный мешок для дополнительной защиты. Для дальнейшего хранения криомешок помещается в криобокс, представляющий из себя металлический короб, соответствующий размерам криомешка. Манипуляции с криомешком после добавления криопротектора должны занимать минимально возможное время, чтобы не допустить его нагревания.

В настоящее время методики криоконсервации предполагают использование программных замораживателей, а также замораживание в «пассивном» режиме в условиях низкотемпературных рефрижераторов или в парах жидкого азота без использования программных замораживателей.

Через два часа от начала замораживания контейнер переносится в хранилище с жидким азотом для длительного (в течение многих лет) хранения биоматериала.

Заключение

В настоящее время возрастает количество трансплантации гемопоэтических стволовых клеток из плацентарной крови.

Переработка плацентарной крови с целью выделения ГСК – технологически отлаженный процесс, требующий наличия необходимого оборудования и соответствующих расходных материалов, с организацией полного лабораторного сопровождения.

В методических рекомендациях использованы опыт работы исследователей Российской Федерации и стандарты гематологической практики стран Европейского сообщества, приведены методики проведения основных манипуляций с ГСК плацентарной крови – сбора и криоконсервирования.

Выполнение данного алгоритма исследований позволит в Республике Казахстан создать регистр образцов ГСК плацентарной крови, готовых для клинического применения.

Список использованных источников

1. Тюмина О.В., Волчков С.Е., Трусова, Л.М., Ключников Д.Ю. Гематологические аспекты заготовки пуповинной крови (10 –летний опыт работы Самарского банка крови) //Гематология и трансфузиология. - 2013. - Т. 58. №3. - С. 8-9.
2. Абдулкадыров К.М., Романенко Н.А., Селиванов Е.А. Наш опыт по заготовке, тестированию и хранению гемопоэтических клеток пуповинной крови// Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. 2006.- №1(3). – С. 63-65.
3. Гришина В.В. Разработка оптимальных методов криоконсервирования кроветворных клеток пуповинной крови человека для трансплантаций// Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. 2006.- №1(3). – С. 52-53.
4. Исакова Л.М. Пуповинная кровь - источник гемопоэтических стволовых клеток //Медицинские аспекты здоровья женщины. - 2007. - №1. - С. 58-60.
5. Карпова Е.Э. Прогнозирование эффективности обработки пуповинной крови с трансплантационными целями. дисс...канд. мед наук: 14.00.29. - Москва, - 2008. - 132 с.
6. Мхеидзе Д.М., Гришина В.В., Мелкова К.Н. и др. Заготовка гемопоэтических стволовых клеток. Методические рекомендации. - 2007. - 29с.
7. Жибурт Е.Б., Максимов В.А., Вечерко А.В., Кузьмин Н.С. Европейский подход к прослеживаемости и уведомлениям о серьезных побочных реакциях и происшествиях в службе крови// Трансфузиология. - 2006.- Т.7. №3. - С. 27-42.
8. Федорова Т.А., Аппалуп М.В. Использование пуповинной крови как альтернатива донорским трансфузиям в неонатологии. Клеточная трансплантология и тканевая инженерия №1(3), - 2006. - С. 39-41.
9. Aroviita P. Haematopoietic Stem Cell Units for Transplantation. Academic dissertation. Helsinki, - 2005. p 127.
10. Исакова Л.М. Пуповинная кровь- источник гемопоэтических стволовых клеток //Медицинские аспекты здоровья женщины. - 2007. - № 1. - С. 58-60.
11. Смолянов А.Б., Хурцилава О.Г., Иволгин Д.А., Супильникова О.В., Хрупина А.С. Исследование образца пуповинной крови общественного регистра Исследование образцов пуповинной крови общественного регистра доноров на наличие маркеров инфекционных агентов // Журнал инфектологии. - 2012.- Т.4, №2. – С.46-50.
12. Бубнова Л.Н. Регистр доноров гемопоэтических стволовых клеток/ Л.Н. Бубнова, Е.В. Беляева, А.С. Беркос и др.// Вестник гематологии. - 2005.- №1. - С.33-36.

13. Яковлева М.В., Шаманская Т.В., Астрелина Т.А., Подколзина Э.А., Карпова Е.Э. Использование пуповинной крови при проведении аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток у детей (опыт работы московского банка стволовых клеток)//Вестник Росздравнадзора. - 2010. - №6. - С. 63-66.

14. Михеев В.С. Медицинская биология и генетика клетки. СПб.: Изд-во «ВВМ», 2009. - 164 с.

15. Румянцева А.Г., Масчан А.А. Трансплантация гемопоэтических стволовых клеток у детей. - М.: Медицинское информационное агентство, 2003. - С.39-50.

16. Практическая и лабораторная гематология, С.М. Льюис, Б. Бэйн, И. Бэйтс, перевод с английского под редакцией А. Г. Румянцев. - Москва, 2009, -672 с.

17. Ballen K.K., Wilson M., Wu J, Ceredona A.M., Hsieh C., Stewart F.M., Popovsky M.A., Quesenberry P.J. Bigger is better: maternal and neonatal predictors of hematopoietic potential of umbilical cord blood units. Bone Marrow Transplant. 2001 Jan. -№27(1):7-14.

18. Bárcena A., Muench M.O., Kapidzic M., Susan J., Fisher S.J. A new role for the human placenta as a hematopoietic site throughout gestation. Reprod Sci. 2009 February; 16(2): 178-187.

19. Bertolini F., Lazzari L., Lauri E., Corsini C., Castelli C., Gorini F., Sirchia G. Comparative study of different procedures for the collection and banking of umbilical cord blood. J Hematother. 1995 Feb; 4(1):29-36.

20. Bhattacharya A., Slatter M.A., Chapman C.E., Barge D., Jackson A., Flood T.J., Abinun M., Cant A.J., Gennery A.R. Single centre experience of umbilical cord stem cell transplantation for primary immunodeficiency. Bone Marrow Transplant. 2005; 36:295 - 299.

21. Donaldson C., Armitage W. John, Laundry V., Barron C., Buchanan R., Webster J., Bradley B., Hows J. Impact of obstetric factors on cord blood donation for transplantation. British Journal of Haematology. Vol.106 Is.1:128 -132.

22. Barry F.P. Biology and clinical applications of mesenchymal stem cells//Birth Defects Res. C Embryo Today //2003.69.(3).p.p.250-256.

23. Elchalal U., Fasouliotis S., Shtockheim D., Brautbar C., Schenker J., Weinstein D., Nagler A. Postpartum umbilical cord blood collection for transplantation: A comparison of three methods. American Journal of Obstetrics and Gynecology, Vol. 182, Is.1: 227-232.

24. Кишкун А.А. Иммунологические и серологические исследования в клинической практике. М., 2006. - 118 с.

25. Ballen K.K., Wilson M., Wu J. et.al. Bigger is better: Maternal and neonatal predictors of hematopoietic potential of umbilical cord units.//Bone Marrow Transplant. 2001.27(1).p.p. 7-14.

26. Курчанов Н.А. Генетика человека с основами общей генетики: учебное пособие. - М: Изд-во: СпецЛит, 2009 г. - 192 с.

Список рекомендуемой литературы

1. Трансфузиология. Учебник/ Е.Б. Жибурт. - Из-во. Питер, 2002. - 736с.

2. Заготовка и переливание тромбоцитов. Руководство для врачей/ Е.Б. Жибурт, С.Р. Мадзаев. - М.: Издание Российской академии естественных наук, 2013. - 376с.

3. Жибурт Е.Б. Бенчмаркинг заготовки и переливания крови.- Издательство Российской академии естественных наук. - 2009г. - 206с.

4. Кабазиева Г.Ш. HLA-система и псориаз//Медицина.- 2000.- №6.- С.11-12.

5. Безопасное переливание крови: руководство для врачей. - СПб: Издательство «Питер», 2000. -391с.

6. Наглядная иммунология/ Бурместер Г.Р., Пецутто А.; пер. с англ.-3-е изд. - Москва, 2014.-90 с.