

Криобанк аутологичных стволовых клеток кордовой крови человека

Г.С. ЛОБЫНЦЕВА, Ю.В. ГЛАДКИХ, Д.В. ЛОБЫНЦЕВ, И.В. ВОРОЖКА

Институт клеточной терапии, г. Киев

В настоящее время необходимость создания низкотемпературных банков стволовых клеток, полученных из кордовой крови, никто не оспаривает. В Америке считают аморальным для родителей не сделать процедуру сохранения и сбережения индивидуальных стволовых клеток новорожденного ребенка.

Банк стволовых гемопоэтических клеток, полученных из пупочного канатика ребенка необходим для лечения детей с лейкозом, злокачественными опухолями, анемиями и наследственными заболеваниями. В США около 30 банков и более 10 банков в Европе предлагают создавать такие “резервы здоровья и биологического времени” для новорожденных.

Американские специалисты утверждают, что устранение дефицита в КМ для трансплантации резко снизит расходы на лечение больных. Сегодня стоимость трансплантации КМ между совместимыми партнерами, включая пребывание в клинике и все необходимые медицинские препараты, составляет от 150 до 300 тысяч долларов, а обращение в Национальный донорский регистр США добавляет к этой сумме еще 5 тысяч долларов. Трансплантация КК стоит 2000 долларов и может быть проведена даже в амбулаторных условиях.

Важен тот факт, что во время беременности мать и ребенок проходят тщательное медицинское обследование, позволяющее выявить наличие любых персистирующих инфекций, потенциально опасных генов и факторов предрасположенности к заболеваниям.

В замороженном состоянии стволовые клетки пуповинной крови способны храниться многие годы без потери жизнеспособности и пролиферативного потенциала. Кроме того, репопуляционная способность фетальных кроветворных клеток в 2-3 раза выше, чем у клеток костного мозга взрослого человека.

Еще в 1997 W. Fluke, E.D. Zanjani высказали предположение, что эмбриональные стволовые кроветворные клетки способны трансформироваться в регионарные стволовые клетки и быть источником клеток для восстановления всех поврежденных органов.

Создание в Украине на базе Института клеточной терапии Криобанка, который берет на себя ответственность за организацию такого важного для Украины учреждения, способного десятки лет сохранять в замороженном состоянии кордовую кровь, полученную в родильных домах с согласия родителей, является необходимым и своевременным мероприятием.

Часто ссылаясь на зарубежные авторитеты, мы забываем об огромном научном вкладе в решение данной проблемы наших отечественных ученых, о наших приоритетах. Так, в Украине в Институте проблем криобиологии и криомедицины НАНУ проводились исследования по криоконсервированию кордовой крови еще в начале 90-х годов (А.А.Цуцаева и др.), а препараты кордовой крови применяются в клинической практике почти 20 лет.

Однако до сих пор в нашей стране нет закона, разрешающего введение клеток кордовой крови, несмотря на то, что использование взрослой донорской крови в детской гематологии запрещено и ее полностью могла бы заменить кордовая кровь. Следует сказать, что в 2002 г. во все роддома был передан приказ МОЗ Украины о необходимости сбора кордовой крови, затем, ввиду отсутствия дополнительного финансирования на приобретение необходимых материалов, тема была забыта и только иногда для исследовательских работ эту кровь собирали.

Институт клеточной терапии имеет все условия для выполнения поставленной задачи: специалистов – разработчиков метода криоконсервирования стволовых кроветворных клеток (Патенты 42599 А, 46673 А, 49759 А, 6221, 60238А Украина, 2233589 Россия); лабораторную базу, оборудованную по современным требованиям; криобанк и техническое оснащение для криоконсервирования и длительного хранения препаратов; собственную ПЦР лабораторию, созданную согласно требованиям GMP, в которой обеспечивается проверка вирусологической чистоты препаратов; осуществление бактериологического контроля в аккредитованной лаборатории; проведение по желанию родителей скрининга пуповинной крови ребенка на наличие генетических заболеваний.

Клетки кордовой крови могут заменить донорскую при кровопотерях во время операций, лечении анемий различного происхождения, вторичных иммунодефицитах после терапевтической миелосупрессии, а также они могут

Адрес для корреспонденции: Лобынцева Г.С., Институт клеточной терапии, ул. Кучера, 7, г. Киев 03148 ; тел.: +38 (044) 274-45-04

применяться в качестве донорского материала при заболелвании родителей. Ежегодно только в Киеве рождается около 14,4 тысяч детей, кордовая кровь которых утилизируется.

Открытие Криобанка предшествовал длительный этап экспериментальных исследований по разработке технологического процесса фракционирования и замораживания клеток. Исследовано более двухсот образцов кордовой крови, полученной в родильных домах Киева с согласия рожениц.

Отработаны условия получения, температурные режимы хранения кордовой крови до поступления в Криобанк, необходимая документация, которая заполняется при ее заготовке (см. патенты).

Для выделения мононуклеаров из цельной крови мы применяли различные растворы и получили результаты, свидетельствующие о том, что наиболее приемлемым для спонтанного осаждения эритроцитов является 4%-й раствор желатины, затем для концентрации клеток в малом объеме производили шадящий режим центрифугирования. В табл. 1 даны средние показатели количественного и качественного состава клеточной популяции после отделения эритроцитов. Из приведенных данных видно, что колебания объема выделенного эксфузата довольно значительны, однако мы не обнаружили зависимости этих различий от веса, пола, группы крови и других показателей ребенка.

Поскольку время с момента родов до фракционирования клеток колеблется от 3 до 24-х часов, то оптимальное количество ЯКК в эксфузате можно получить из крови, хранившейся 12 часов

Таблица 1. Средние показатели аллогенной (КК) и аутологичной (АК) пуповинной крови.

Количество образцов	Объем эксфузата, мл	Количество ЯКК, $\times 10^6$ /мл	Общее ЯКК в эксфузате, $\times 10^9$	Относительное содержание мононуклеаров, %	Общее количество мононуклеаров в эксфузате, $\times 10^9$
КК n = 251	39,1 \pm 19,2 (9–108)	21,6 \pm 9,4 (2,25–110,6)	0,8 \pm 0,3 (0,11–3,69)	32,9 \pm 0,3 (15–50)	0,3 \pm 0,02 (0,01–1,48)
АК n = 30	54,9 \pm 34,3 (31,5–85,5)	15,24 \pm 5,2 (4,0–26,05)	0,8 \pm 0,4 (0,33–1,85)	34,5 \pm 0,2 (22–47)	0,3 \pm 0,01 (0,03–0,68)

при комнатной температуре, самое низкое – в течение 3 часов. Различия в количестве мононуклеаров составляли до 30%.

При заготовке, доставке и хранении крови до момента криоконсервирования важным является установление температурных режимов. Все манипуляции проводили при комнатной температуре (20–25°C), так как нашими исследованиями было установлено, что клетки-предшественники гемопоэза обладают повышенной чувствительностью к перепадам температур, особенно противопоказаны манипуляции с клетками при 0°C (многие исследователи предподготовку клеток к замораживанию проводят на льду). При фракционировании (0°C) и последующем криоконсервировании жизнеспособность клеток после размораживания составляла 10-20%. При использовании нашего технологического процесса потеря клеток составляет 3-5% за счет разрушения эозинофилов, количество КОЕ-ГМ не изменяется. В ПЦР лаборатории поступившие образцы подвергаются вирусологическому контролю. Мы исследуем кровь матери, плаценту и кордовую кровь. Используя годовой опыт работы

криобанка аутологичной кордовой крови можно сделать определенные выводы. В Украине еще не создано информационное поле для массовой заготовки аутологичной кордовой крови. Необходимо широкое обсуждение в прессе вопросов получения и применения стволовых клеток. Необходимо принятие законодательных документов, разрешающих клиническое применение препаратов кордовой крови. Для создания криобанков наряду с государственным финансированием необходимо привлекать инвестиции частных предпринимателей.

Таблица 2. Количественное распределение ядродержащих клеток в пуповинной крови с учетом возможного использования для трансплантации реципиентам различной весовой категории

Параметры	Количество лейкоцитов в эксфузате				
	0,1–0,5 $\times 10^9$	0,51–1,0 $\times 10^9$	1,01–1,5 $\times 10^9$	1,51–2,0 $\times 10^9$	2 $\times 10^9$
Процент образцов исследования n = 89	18% (16)	55% (49)	11% (10)	10% (9)	6% (5)
Вес реципиента из расчета 2,0 $\times 10^7$ клеток/кг	5–25	25,5–50	50,5–75	75,5–100	100