

Системний підхід до контролю якості кріоконсервованих клінічних зразків гемопоетичної тканини пуповинної крові

П.М.Перехрестенко, Т.О.Калиниченко, Г.Т.Глухенька, Р.П.Павлюк,
Г.П.Гашук, Н.К.Скачкова, О.П.Настенко, М.К.Алгазінова, В.О.Посисаєв

Інститут гематології та трансфузіології АМН України
Київ, Україна

У роботі представлена система контролю якості ядровмісних клітин пуповинної крові для стандартних умов їх зберігання. Визначено критерії якості зразків пуповинної крові на етапах процесу кріоконсервування (фракціонування, заморожування, зберігання, відтаювання, підготовки до введення в організм реципієнта).

Ключові слова: пуповинна кров, гемопоетична тканина, кріоконсервування, система контролю якості, критерії якості.

Вступ

Функціонування суспільних банків пуповинної крові (ПК) не можливе без розробки і прийняття єдиних стандартів якості заготівлі та кріоконсервування цієї гемопоетичної тканини (ГТ), так необхідної для лікування хворих і з супресіями гемопоезу.

Цілком зрозуміло, що чи не найголовнішим напрямом при створенні єдиних стандартів із заготівлі і консервування біологічного матеріалу є опрацювання і прийняття єдиних принципів та рекомендацій з проведення контролю якості. Це дасть можливість значно підвищити ефективність лікування гематологічних, онкологічних, спадкових хвороб, особливо у педіатричній практиці, що є одним з пріоритетних напрямів вітчизняної медицини.

Метою дослідження було створити систему контролю якості ядровмісних клітин пуповинної крові на етапах процесу кріоконсервування для подальшого алогенного застосування в якості гемопоетичної тканини.

Матеріали та методи дослідження

Забір ПК здійснювали методом «замкненої» системи при фізіологічних пологах після отримання інформованої згоди вагітної. Кров набирали шляхом дренажу пупкової вени материнського дистального кінця пуповини в пластикатний контейнер. У якості стабілізато-

ра використовували розчин CPDA-1 в об'ємі 22 мл. ПК зберігали в термоізоляційному контейнері при температурі 21,5-3,5 С не більше 24 годин до моменту кріоконсервування.

Матеріал піддавали програмному заморожуванню у нефракціонованому і фракціонованому стані за технологіями, розробленими в ДУ «ІГТ АМНУ». Виділення ядерних клітин в окрему фракцію проводили за допомогою колоїдного розчину (діюча речовина — гідроксид етилкромаль (ГЕК). В якості кріопротекторів застосовували диметилсульфоксид (ДМСО) в кінцевій концентрації 5% і низькомолекулярний полівінілпіролідон (ПВП) у кінцевій концентрації 8%.

Дослідженню підлягали нативні зразки та такі, що зберігались у рідкому азоті до 8 років. Оцінку здійснювали морфологічними (збереженість субпопуляційного складу фракції ядровмісних клітин (ЯВК) та їх життєздатність методом світлової мікроскопії), імунологічними (тест на неочікувані антитіла в сироватці крові матері мікрометодом у гелі — непрямий антиглобуліновий тест; визначення вмісту клітин, які мають на своїй поверхні диференційний антиген людини CD34) і функціональними методами (оцінка збереженості проліферативної функції та вмісту гранулоцитарно-макрофагальних клітин — попередників гемопоезу (КУО-ГМ) в культурі тканини (напіврідкий агар), оцінка показників фагоцитозу).

Результати дослідження та їх обговорення

Запропоновані принципи здійснення контролю якості є складовою системи, що ґрунтується на принципах належної виробничої практики та управління якістю.

Критеріями відбору нативного зразка ПК при його реєстрації є зовнішні ознаки та кількісні параметри, такі як належне пакування і маркування (герметичність контейнера, наявність інформованої згоди вагітної на заготівлю, тестування і використання зразка; наявність супроводжувального талона до зразка із задокументованою відсутністю маркерів збудників трансмісивних інфекцій у крові матері), термін зберігання ПК не більше 24 год. з моменту заготівлі зразка, відсутність ознак зсідання крові, а також такі параметри, як об'єм зразка не менше ніж 40 мл, загальна кількість ЯВК — не менше ніж $0,5 \cdot 10^9$ клітин при їх життєздатності не нижче ніж 95%. Додатковими критеріями якості зразків є: відсутність у сироватці крові матері неочікуваних антитіл до еритроцитарних антигенів; морфологічна збереженість клітинного складу зразків ПК, де найбільш інформативним показником є кількість зруйнованих клітин на 100 лейкоцитів (не більше 20 клітин); збереженість фагоцитарної функції нейтрофільних гранулоцитів.

До спектра методів оцінки якості зразка на цьому етапі відносяться також такі обов'язкові дослідження, як тестування крові породіллі на безпечність щодо трансмісивних інфекцій, підрахунок загальної кількості моноклеарних клітин (МНК), визначення вмісту CD34-позитивних клітин, а також серед додаткових — оцінка фагоцитарної функції нейтрофільних гранулоцитів, визначення вмісту КУО-ГМ у культурі тканини. Зразки, що пройшли відбір за основними кількісно-якісними параметрами до подальшого довгострокового зберігання, гістотипують за системою HLA, визначають їх групову та резус-приналежність.

Після змішування з розчином кріопротектора в замкненій системі та переведення зависі клітин у контейнер для заморожування обов'язковими методами оцінки якості зразка є оцінка стерильності, бактеріальні анаеробні, аеробні, фунгальні дослідження. Додатково проводять підрахунок вмісту ЯВК з метою визначення концентрації клітин у суспензії

для заморожування. Одночасно здійснюється відбір проб у кріопробірки малого об'єму для заморожування сателітів-супутників разом з основним кріоконтейнером, у тому числі для подальшого контролю додержання умов зберігання.

На етапі низькотемпературного зберігання критерієм відбору, з огляду на встановлені норми втрати життєздатності і вмісту ЯВК при різних режимах кріоконсервування, є вміст ЯВК не нижче ніж $0,3 \cdot 10^9$ (загальна кількість), а також життєздатність не нижче 80%. Зразки з такою кількістю клітин можуть бути застосовані тільки для реципієнтів, які мають вагу 15 кг і менше (за критерієм мінімальної необхідної кількості від $2 \cdot 10^7$ ЯВК на 1 кг маси реципієнта), тому не має сенсу збереження зразків з нижчою загальною кількістю ЯВК.

На етапі перед розморожуванням трансплантата для конкретного реципієнта необхідно проводити визначення загального вмісту ЯВК та КУО-ГМ з перерахунком дози на 1 кг маси реципієнта, а також контроль життєздатності клітин. При цьому доза, що міститься в повному об'ємі зразка, є основним критерієм якості, від якого залежить рівень мієлоїдного приживлення за умови збігу за системою гістосумісності пари донор-реципієнт.

Висновки

Таким чином, основним механізмом забезпечення клінічних потреб належним матеріалом є впровадження системи контролю якості ядровмісних клітин пуповинної крові в роботу банків довгострокового зберігання гемопоетичної тканини. Спектр необхідних і достатніх методів морфологічної та функціональної оцінки пуповинної крові як на етапах підготовки до кріоконсервування, так і в процесі заморожування-відтаювання, є одним з основних компонентів забезпечення контролю якості. Використання порядку його проведення із застосуванням відбору зразків послідовно на всіх етапах технологічного процесу кріоконсервування стане механізмом вирішення основного завдання — забезпечення майбутнього реципієнта матеріалом, який містить достатню для виконання функції трансплантата кількість ядровмісних клітин та клітин-попередників гемопоезу, а також матиме економічний ефект від раціонального використання ресурсів донорських банків гемопоетичної тканини.

Література

1. Інструкція із забезпечення якості та безпеки при роботі з органами, тканинами та клітинами [Текст] / Публікація Ради Європи: українська версія. — Благодійний фонд «Медицина майбутнього», 2005. — 102 с.
2. Техническое руководство Американской ассоциации банков крови / В.Венглер-Тайлер, К.Бенсон, Р.Д.Бранч и др.— 12-е изд., 1996. Пер. с англ. / Под ред. проф. Ю.Н. Токарева. — Милан: Европейская школа трансфузионной медицины, 2000. — 1056 с.
3. Критерії відбору якісних зразків пуповинної крові на етапі їх реєстрації в кріобанку / П.М.Перехрестенко, Т.О.Калиниченко, Г.Т.Глухенька та ін. // Зб. наук. пр. співробітників НМАПО ім. П.Л.Шупика. — К.: НМАПО ім. П.Л.Шупика, 2008. — Вип. 17, кн. 2. — С. 459-465.
4. Контроль якості компоненту ядровмісних клітин пуповинної крові на етапах процесу кріоконсервування: матеріали науково-практичної конференції «Актуальні питання клінічної трансфузіології», присвяченої 70-річчю заснування Харківської обласної станції переливання крові, 23-24 квітня 2009 р., м. Харків / П.М.Перехрестенко, Г.Т.Глухенька, Т.О.Калиниченко та ін. // Міжвідомчий зб. «Гематологія і переливання крові». — Х.: СПД ФОП Шльоміч С.Ф., 2009. — Вип. 34 (додатковий). — С. 198-201.

П.М.Перехрестенко, Т.О.Калиниченко, Г.Т.Глухенька, Р.П.Павлюк, Г.П.Гащук, Н.К.Скачкова, А.П.Настенко, М.К.Алгазинова, В.О.Посысаев. Системный подход к контролю качества криоконсервированных клинических образцов гемопоэтической ткани пуповинной крови. Киев, Украина.

Ключевые слова: пуповинная кровь, гемопоэтическая ткань, криоконсервирование, система контроля качества, критерии качества.

В работе представлена система контроля качества ядродержащих клеток пуповинной крови для стандартных условий их хранения. Определены критерии качества образцов пуповинной крови на этапах процесса криоконсервирования (фракционирования, замораживания, хранения, оттаивания, подготовки к введению в организм реципиента).

P.M.Perehrestenko, T.O.Kalinichenko, G.T.Hluhenka, R.P.Pavlyuk, G.P.Haschuk, N.K.Skachkova, O.P.Nastenko, M.K.Algazinova, V.A.Posysayev. A systemic approach to quality control of clinical samples of cryopreserved cord blood hematopoietic tissue. Kyiv, Ukraine.

Key words: umbilical cord blood, hemopoietic tissue, cryopreservation, quantity system control, quality craters.

The system of quality of nuclear cells of umbilical cord blood for standard conditions of storage has been presented in the work. The quality craters have been worked out for the umbilical cord blood unites on the cryopreservation processing stages (separation, freezing, storage, thawing out, preparing for introduction into recipient's organism).

Надійшла до редакції 01.03.2010 р.