

24. Handretinger R., Schumm M., Lang P. et al. Transplantation of megadoses of purified haploidentical stem cells. *Ann NY Acad Sci* 1999;872:351—61; discussion 361—2.

25. Gluckman E., Broxmeyer H.A., Auerbach A.D. et al. Hematopoietic reconstitution in patient with Fanconi anemia by means of umbilical cord blood from an HLA-identical sibling. *N Engl J Med* 1989;321(17):1174—8.

26. Gluckman E., Rocha V., Boyer-Chamard A. et al. Outcome of cord-blood transplantation from related and unrelated donors. Eurocord Transplant Group and the European Blood and Marrow Transplantation Group. *N Engl J Med* 1997;337(6):373—81.

27. Zhang Y., Li C., Jiang X. et al. Human placenta-derived mesenchymal progenitor cells support culture expansion of long-term culture-initiating cells from cord

blood CD34+ cells. *Exp Hematol* 2004;32(7): 657—64.

28. McNiece I., Harrington J., Turney J. et al. Ex vivo expansion of cord blood mononuclear cells on mesenchymal stem cells. *Cytotherapy* 2004;6(4):311—7.

29. Rubinstein P.T., Stevens C.E. Placental blood for bone marrow replacement: the New York Blood Center's program and clinical results. *Blood* 2001;98:814a; abstr 3382.

30. Kalland T., Alm G., Stalhandshe T. Augmentations of mouse natural killer cell activity by LS 2626, a new immunomodulator. *J Immunol* 1985;134(6):3956—61.

31. Barnes D.W.H., Corp M.J., Loutit J.F. Treatment of murine leukemia with x rays and homologous bone marrow. *BMJ* 1956;ii:626.

32. Marmont A.M., Horowitz M.M., Gale R.P. et al. T-cell depletion of HLA-identical transplants in leukemia. *Blood*

1991;78(8):2120—30.

33. Weaver C.H., Clift R.A., Deeg H.J. et al. Effect of graft-versus-host disease prophylaxis on relapse in patients transplanted for acute myeloid leukemia. *Bone Marrow Transplant* 1994;14(6):885—93.

34. Choi S.J., Lee J.H., Kim S. et al. Treatment of relapse acute myeloid leukemia after allogeneic bone marrow transplantation with chemotherapy followed by G-CSF-primed donor leukocyte infusion: a high incidence of isolated extramedullary relapse. *Leukemia* 2004;18(11):1789—97.

35. Levine J.E., Braun T., Penza S.L. et al. Prospective trial of chemotherapy and donor leukocyte infusions for relapse of advanced myeloid malignancies after allogeneic stem-cell transplantation. *J Clin Oncol* 2002;20(2):405—12.

## ПУПОВИННАЯ КРОВЬ — ИСТОЧНИК СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК

В.В. Гришина

РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва

**Ключевые слова:** высокодозная химиотерапия, трансплантация гемопоэтических стволовых клеток, источники стволовых клеток, пуповинная кровь

В последние годы для лечения злокачественных новообразований (как солидных, так и гематологических) и ряда неопухолевых заболеваний (наследственные болезни, болезни обмена, системные заболевания соединительной ткани) стали достаточно широко использоваться сверхинтенсивные курсы химиотерапии (высокодозная химиотерапия) с последующим восстановлением кроветворения трансплантацией гемопоэтических стволовых клеток (ГСК).

ГСК для трансплантации могут быть получены у одной-двойной близнеца (сингенная трансплантация), родственного или неродственного донора, совместимого по основным антигенам HLA (аллогенная трансплантация), или у самого больного (аутологичная трансплантация). До недавнего времени во всех вышеперечисленных случаях ГСК получали из костного мозга (КМ) и/или периферической крови (ПК) [1], однако данные методики не лишены существенных недостатков. В связи с риском развития смертельно опасной реакции «трансплантат против хозяина» (РТПХ) при проведении аллогенной трансплантации необходимо наличие HLA-совместимого донора. В этом отношении идеальными донорами ГСК являются HLA-идентичные доноры-близнецы. Такая возможность имеется лишь у единичных больных. Совместимого по основным локусам HLA-системы родственного донора имеют лишь 30—40% больных, а подбор неродственного донора еще более ограничен. В Европе и США созданы регистры добровольных HLA-типированных доноров КМ для лечения больных, нуждающихся в трансплантации. Несмотря на увеличивающееся число зарегистрированных доноров КМ, которое составляет более 8 млн во всем мире, некоторым пациентам невозможно подобрать донора для трансплантации в связи с чрезвычайным полиморфизмом системы HLA [2]. Только 1/3 больных, нуждающихся в аллотрансплантации, возможно подобрать неродственного донора [3]. Для этнических меньшинств вероятность нахождения HLA-совместимого неродственного донора чрезвычайно мала — менее 10% [4]. Поиск донора представляет собой дли-

тельный процесс, и иногда, в случае агрессивного течения опухолевого процесса, пациент не доживает до трансплантации.

Для больных, у которых нет гистосовместимого донора, возможной альтернативой является аутологичная трансплантация КМ и периферических стволовых клеток. Использование аутологичных ГСК, полученных в период уже существующей болезни, несет в себе потенциальную опасность — возможную контаминацию опухолевыми клетками при ретрансфузии. Кроме того, отсутствует реакция «трансплантат против опухоли», что делает малоэффективным использование аутоотрансплантата при ряде опухолей. Вышеупомянутые трудности и ограничения использования ГСК, полученных из КМ и ПК, диктуют необходимость поиска новых источников гемопоэтических стволовых клеток, пригодных для проведения трансплантации.

В настоящее время значительно возрос интерес к пуповинной крови как к альтернативному источнику репопулирующих ГСК [4, 5]. Данные клинических исследований на сегодняшний день показали, что пуповинную кровь можно эффективно использовать для трансплантации после проведения высокодозной химиотерапии по поводу многих тяжелых заболеваний крови и наследственных нарушений метаболизма [5—7].

Уже в 1970-е годы было показано, что пуповинная кровь содержит намного больше клеток-предшественников кроветворения, чем обычная кровь детей и взрослых [5], а уже в начале 1980-х годов были успешно проведены первые экспериментальные трансплантации пуповинной крови у животных [8].

Первая трансплантация ГСК, полученных из пуповинной крови сестры (сблинга), была произведена в 1988 г. шестилетнему ребенку, страдающему анемией Фанкони [9]. В 1993 г. была осуществлена первая успешная трансплантация пуповинной крови от неродственного донора [10]. К настоящему времени по всему миру произведено более 5000 неродственных и около 400 родственных трансплантаций ГСК пуповинной крови как детям, так и взрослым.

В литературе в основном приводятся данные о проведенных аллогенных трансплантациях [11]. Аутологичную транс-

плантацию ГСК пуповинной крови некоторые авторы рассматривают лишь как теоретически возможную [5]. Однако уже существуют единичные клинические наблюдения об эффективном ее применении [12]. По мнению большинства авторов [7, 13], заготовка и хранение ГСК пуповинной крови непосредственно для самого донора является обоснованной при наличииотягощенного семейного анамнеза (онкологические заболевания и болезни кроветворной системы, иммунные и обменные нарушения).

На сегодняшний день трансплантация клеток пуповинной крови была произведена пациентам с самыми различными заболеваниями опухолевой и неопухолевой природы [14]:

- лейкозами (острыми и хроническими);
- миелодиспластическим синдромом;
- миеломной болезнью;
- неходжкинской лимфомой;
- болезнью Ходжкина;
- нейробластомой, ретибластомой;
- липосаркомой;
- апластической анемией;
- врожденными анемиями Фанкони и Даймонда — Блекфена;

— некоторыми врожденными заболеваниями (дефицит адгезии лейкоцитов; синдром Бара, или синдром атаксии — телеангиэктазии; болезнь Понтера, или уропорфирия эритропоэтическая; синдром Харлера — форма мукополисахаридоза; талассемии.

В России, по данным литературы, выполнено 6 трансплантаций пуповинной крови детям в возрасте от 2 до 14 лет с диагнозами [15]: хронический миелолейкоз (2), анемия Фанкони (3), острый недифференцированный лейкоз (1). Приживление трансплантата было зарегистрировано у всех больных (13–38-й день). Развитие острой РТПХ отмечено в пяти случаях, хронической — в двух. В настоящее время 4 из 6 больных живы и находятся в ремиссии основного заболевания.

В НИИ детской онкологии и гематологии РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН была выполнена комбинация двух последовательных аллогенных родственных трансплантаций (пуповинной крови и ГСК ПК) ребенку с нейробластомой IV стадии [16].

По данным Евророта (Eurocord — международный регистр), наиболее часто выполняются аллогенные неродственные трансплантации пуповинной крови [2]. Большинство пациентов составляют дети, но число взрослых пациентов с каждым годом увеличивается.

При проведении трансплантаций пуповинной крови детям от близкородственных доноров общая выживаемость за 1 год составила 64%, болезнь «трансплантат против хозяина» 0–I степени выявлена в 24% случаев и II–IV степени — в 7% случаев, приживление нейтрофилов (количество нейтрофилов в ПК пациента более  $5 \times 10^6/\text{л}$ ) происходило в среднем на 28-й день (8–49-й день), приживление тромбоцитов (количество тромбоцитов в ПК пациента более  $5 \times 10^{10}/\text{л}$ ) происходило в среднем на 48-й день (4–180-й день).

При проведении трансплантаций пуповинной крови детям от неродственных доноров общая выживаемость за 1 год составила  $48 \pm 6\%$ , болезнь «трансплантат против хозяина» 0–I степени выявлена в 38% случаев, II–IV степени — в 37%, приживление нейтрофилов происходило в среднем на 29-й день (10–60-й день).

При проведении трансплантаций пуповинной крови взрослым от неродственных доноров (в настоящее время информация о трансплантациях пуповинной крови взрослым крайне неоднородна и касается больных с совершенно различными заболеваниями) болезнь «трансплантат против хозяина» выявлена у 44 человек из 108 (степень 0–I) и у 43 человек из 108 (степень II–IV), приживление нейтрофилов происходило в среднем на 32-й день (13–57-й день), тромбоцитов — на 129-й день (26–176-й день).

Средний срок восстановления гранулоцитопоеза при трансплантации пуповинной крови и ГСК ПК различается и составляет 28 и 15 дней соответственно. Еще более значительные различия выявляются при сравнении сроков восстановления тромбоцитопоеза (48 и 16 дней соответственно). Из приведен-

ных данных видно, что при трансплантации пуповинной крови происходит значительно более позднее приживление трансплантата, чем при использовании стандартных источников ГСК (КМ, ГСК ПК). При родственной трансплантации пуповинной крови взрослым смертность через 180 дней выше, чем при родственной трансплантации детям (56 и 38% соответственно), что обусловлено недостаточным количеством ядросодержащих клеток на 1 кг массы тела реципиента [11]. Для решения проблемы малого количества клеток в настоящее время клиницистами изучается эффективность трансплантации нескольких единиц пуповинной крови взрослым пациентам [17].

Однако использование пуповинной крови для трансплантации имеет ряд преимуществ по сравнению с другими источниками ГСК [4, 18], а именно:

— сбор пуповинной крови — безопасная, технически легко выполняемая процедура, не представляющая угрозы для здоровья матери или новорожденного (донора) и не требующая анестезии при сборе [19];

— замороженные образцы пуповинной крови, находящиеся в банках крови, уже тестируемые и типированные по HLA-системе, могут быть сразу использованы для трансплантации. Таким образом исключаются задержки, возникающие при поиске, сборе и типировании КМ донора, которые могут быть фатальными для больных злокачественными заболеваниями крови [20];

— увеличивается вероятность нахождения редких HLA-типов трансплантатов для этнических меньшинств [21];

— значительно снижается риск передачи некоторых латентных инфекций, передаваемых трансмиссивным путем, поскольку вероятность их нахождения в пуповинной крови значительно ниже, чем в крови взрослых [20];

— частота развития и тяжесть течения болезни «трансплантат против хозяина» при трансплантации ГСК пуповинной крови ниже, чем при трансплантации КМ [7];

— выявлена большая возможность (по сравнению с КМ) использования не полностью совместимых по HLA-системе трансплантатов (болезнь «трансплантат против хозяина» вызывается реакцией Т-клеток в трансплантате на HLA-антигены реципиента; незрелые лимфоциты в пуповинной крови не могут осуществить эту реакцию) [2, 20].

Недостатками пуповинной крови можно считать:

— больший, чем при использовании КМ, потенциальный риск передачи генетической болезни [21];

— замедленное приживление трансплантата;

— малое количество ГСК, получаемых при единичной заготовке;

— невозможность повторного сбора.

По мнению специалистов, в клинической практике, где для поиска донора время является критическим показателем, а подбор трансплантата, полностью совпадающего по HLA-системе, затруднителен, пуповинную кровь можно использовать как наиболее предпочтительный источник ГСК [22].

Успешный исход трансплантации ГСК пуповинной крови зависит от количества ядросодержащих клеток, приходящихся на 1 кг массы тела реципиента, и от степени совместимости по HLA-системе.

В своей работе V. Rocha и соавт. [23] дали рекомендации по использованию стволовых клеток пуповинной крови:

— наилучшие результаты достигаются, когда трансплантация осуществляется на ранней стадии заболевания;

— основными критериями при выборе образцов пуповинной крови должно быть количество собранных клеток, совместимость ABO, совместимость HLA.

#### **Сбор пуповинной крови**

До начала сбора пуповинной крови беременная должна дать информированное согласие на сбор и хранение пуповинной крови ее новорожденного ребенка. Тщательно изучается соматический, акушерско-гинекологический и семейный анамнез у беременной для выявления возможных генетических нарушений и инфекционных заболеваний, передающихся гематоген-

ным путем [5]. По международным стандартам каждую беременную обязательно обследуют на носительство HBS-Ag, наличие антител к возбудителям гепатита С, ВИЧ-инфекции, сифилиса, Т-клеточного лейкоза человека и цитомегаловирусной инфекции. В то же время в России согласно приказу МЗ № 325 обязательным является лишь обследование беременной на гепатиты и ВИЧ-инфекцию, а вышеуказанные тесты рекомендовано проводить непосредственно из проб образцов пуповинной крови. По мнению некоторых исследователей, для выявления инфекционных заболеваний следует производить исследование крови беременной, а не самой пуповинной крови. Это обосновано тем, что, во-первых, применяемые современные тесты основаны на выявлении антител к возбудителям, а антитела матери не проникают через плаценту, и исследование пуповинной крови может дать ложно отрицательный результат, во-вторых, использование пуповинной крови для тестирования уменьшает объем пуповинной крови, пригодный для трансплантации [5]. При выявлении положительных серологических реакций у беременной сбор пуповинной крови противопоказан.

Из-за увеличения риска бактериального обсеменения пуповинной крови не рекомендуется также производить ее эксфузию при наличии любого инфекционно-септического заболевания роженицы [24].

#### Методы забора пуповинной крови

Сбор пуповинной крови осуществляется после рождения ребенка и отделения его от последа (перевязка и пересечение пуповины) путем пункции пупочной вены (плацентарной части) [18]. Следует отметить, что при кесаревом сечении забор пуповинной крови следует осуществлять незамедлительно. Это связано с тем, что во время операции при ручном отделении плаценты от слизистой матки нередко происходит массивное повреждение маточной поверхности последа, что запускает механизм массивного внутрисосудистого свертывания крови. В таких случаях пуповинная кровь может свернуться еще до начала эксфузии [24].

Существуют закрытый и открытый способы заготовки пуповинной крови [5]. При открытом способе сбор пуповинной крови осуществляется в контейнер, антикоагулянт в который добавляют вручную непосредственно перед эксфузией, что увеличивает риск микробной контаминации получаемого материала. При использовании открытого способа сбора пуповинной крови микробная контаминация отмечается в 12,5–30% случаев [4]. В связи с этим в настоящее время в большинстве зарубежных клиник для сбора пуповинной крови используют специальные закрытые трансфузионные системы, содержащие антикоагулянт (гепарин, кислотный-цитрат-декстроза — ACD, цитрат-фосфат-декстроза — CPD или цитрат-фосфат-декстроза-адренин — CPDA) и оснащенные дренажной иглой [4]. Риск микробной контаминации при закрытом способе забора пуповинной крови составляет лишь 3,3% [25].

По данным литературы, объем получаемой пуповинной крови зависит от совокупности факторов, таких как масса тела новорожденного, время пересечения пуповины, срок беременности, длина пуповины [18].

Время наложения зажимов на пуповину после рождения ребенка имеет выраженное влияние на объем получаемой пуповинной крови. F. Bertolini и соавт. [25] показали, что если пуповину клеммируют в течение 30 с после рождения ребенка, то объем собираемой крови в среднем составляет  $77 \pm 23$  мл, а если позже 30 с, то объем получаемой пуповинной крови уменьшается как минимум вдвое. Опыт нескольких учреждений свидетельствует, что пережатие пуповины и забор пуповинной крови во время отхождения плаценты (при этом используется сжимающее действие сокращающихся мышц матки) позволяет забрать больший объем крови (в среднем 90–100 мл), чем пережатие пуповины и забор крови после отхождения плаценты (обычно около 50–60 мл) [26].

По результатам большинства исследователей, редко удается получить более 100 мл пуповинной крови, максимальный же объем пуповинной крови может составить 200 мл [18].

#### Краткосрочное хранение пуповинной крови

Длительное хранение пуповинной крови осуществляется в специальных банках пуповинной крови, которые сконцентрированы в крупных гематологических или онкологических центрах. В связи с этим актуален вопрос о хранении пуповинной крови до момента ее криоконсервирования или трансплантации (время и температура хранения).

Данные об оптимальном времени хранения пуповинной крови разноречивы, что во многом обусловлено различием в методиках оценки жизнеспособности стволовых клеток. A. Shlebak и соавт. [27] изучали способность клеток пуповины к колониеобразованию (сохранность КОЕ-ГМ и КОЕ-Г) и показали, что время хранения пуповинной крови не должно превышать 9 ч. Однако Н. Вгохтеуег и соавт. [8] отмечают, что можно хранить пуповинную кровь при комнатной температуре (22°C) в течение 48–72 ч без существенных потерь стволовых клеток. С. В. Юрасов и соавт. [28] также показали, что при хранении пуповинной крови при 22°C или при 4°C в течение 24–48 ч жизнеспособность клеток принципиально не снижалась и составляла 92 и 88% соответственно. При хранении образцов крови в течение 3 сут отмечалось значительное снижение жизнеспособности ядросодержащих клеток. A. Abdel-Mageed и соавт. [22] и W. Hubl и соавт. [29] отмечают, что при хранении пуповинной крови в течение 2–3 сут при комнатной температуре или 4°C прежде всего страдает жизнеспособность гранулоцитов, а не ГСК.

#### Предварительное исследование пуповинной крови

Согласно международным рекомендациям и приказу МЗ РФ №325, каждый образец пуповинной крови, поступивший в банк, прежде всего оценивается как источник ГСК, пригодный для трансплантации [5]. Для этого производят:

- взвешивание образца, определение объема материала;
- определение группы крови и резус-фактора;
- определение количества ядросодержащих клеток, CD34+;
- HLA-типирование.

Ряд авторов дополнительно рекомендуют определение КОЕ-ГМ [30].

Для безопасной трансплантации клеток пуповинной крови все образцы должны быть исследованы для исключения инфекций, передаваемых гематогенным и половым путем [31]. Для этого осуществляют бактериологическое исследование пуповинной крови, серологическое исследование на ВИЧ-инфекцию, HbsAg, вирусный гепатит С, цитомегаловирус, HTLV-I и -II (Т-клеточный лейкоз человека), сифилис и токсоплазмоз [30].

Некоторые авторы рекомендуют исследовать пуповинную кровь на выявление ряда генетических заболеваний:  $\alpha$ -талассемии, серповидноклеточной анемии, дефицита аденозиндезаминазы, агаммаглобулинемии Брутона, болезней Харлера и Понтера.

#### Оценка потенциала ГСК

Среди клеток-предшественников, содержащихся в пуповинной крови, выделяют стволовые клетки — наиболее незрелые, которые относятся к длительно живущим популяциям клеток и способны поддерживать свою численность за счет пролиферации, а также прогениторные клетки, коротко живущие, которые быстро дифференцируются и дают начало функционально активным клеткам крови и иммунной системы. После трансплантации более близкие к конечной дифференцировке прогениторные клетки отвечают за скорость восстановления гемопоэза, в то время как стволовые клетки ответственны за формирование и поддержание долговременного гемопоэза, сохраняющегося на протяжении всей жизни реципиента [5].

Многие исследователи также отмечают, что пролиферативная способность ГСК пуповинной крови превосходит пролиферативную способность клеток КМ или ПК взрослых [32]. 100-миллилитровая единица пуповинной крови содержит 1/10 числа ядросодержащих клеток (ЯСК) и клеток-предшественников (CD34+), присутствующих в 1000 мл КМ, но поскольку они быстро пролиферируют, стволовые клетки в одной единице пуповинной крови могут воссоздать всю кроветворную систему [33].

В пуповинной крови также определенная роль принадлежит Т-лимфоцитам, имеющим иммунофенотип CD3+. Эти клетки ответственны за развитие РТПХ и оказывают противоопухолевое действие [6]. Но так как Т-лимфоциты пуповинной крови являются незрелыми и продуцируют меньше цитокинов [34], то частота развития и тяжесть течения РТПХ при трансплантации ГСК пуповинной крови ниже, чем при трансплантации КМ [35].

Успешный исход трансплантации ГСК пуповинной крови зависит от количества ЯСК, приходящихся на 1 кг массы тела реципиента. Количество ядросодержащих ГСК на 1 кг массы тела определяет скорость восстановления нейтрофилов и тромбоцитов у реципиента, что имеет принципиальное значение для восстановления защитной и гемостатической функций больного после химиотерапевтической миелоабляции. По данным Р. Rubinstein и соавт. [26], благоприятные исходы при аллогенной неродственной инфузии ГСК пуповинной крови отмечались у пациентов, получивших не менее  $3,7 \times 10^7$  ЯСК на 1 кг массы тела.

В 2001 г. E. Gluckman показала, что количество ЯСК, необходимое для трансплантации, в экссудате пуповинной крови должно составлять не менее  $2 \times 10^7$  на 1 кг массы тела реципиента [11]. J. Vargese и J. Wagner [21] предлагают, исходя из последних данных, считать нижним пределом дозу  $1,5 \times 10^7$  ЯСК на 1 кг для трансплантации пуповинной крови от неродственного донора, такая же доза может быть применена в случае трансплантации от донора-сисба.

Количество ГСК CD 34+ при трансплантации пуповинной крови может быть на порядок ниже, чем при использовании ГСК ПК:  $1,7-2,3 \times 10^6/\text{кг}$  против  $2 \times 10^6/\text{кг}$  [36].

Число КОЕ-ГМ в пуповинной крови примерно  $1 \times 10^4/\text{мл}$ . Многие исследователи пытались рассчитать гемопоэтический потенциал пуповинной крови. Эти расчеты остаются примерными прикидками, и в конечном итоге единственным доказательством правильности расчетов являются результаты трансплантаций [18].

#### Выделение стволовых клеток из пуповинной крови

Для уменьшения общего объема крови и удаления эритроцитов и гранулоцитов для криоконсервирования с целью дальнейшего использования клеток как трансплантата ГСК в настоящее время применяют различные методы и вещества для выделения ЯСК из пуповинной крови, такие как:

- седиментация желатином или гидроксипроцеллюлозой (гранулоциты при данном методе не удаляются) [13, 26];
- выделение ЯСК в градиенте плотности на основе фикола или перколлы [13]. Сепарация в градиенте плотности позволяет получить преимущественно мононуклеарные клетки, но приводит к значительным потерям гемопоэтических предшественников (до 30–50%) [37];
- фракционирование пуповинной крови при помощи центрифугирования (эффективен для наиболее свежих образцов) [25, 38];
- лизис эритроцитов хлоридом аммония. Лизис эритроцитов практически не используют в связи с большими объемами рабочего раствора [39].

Недавно в литературе появились данные о результатах использования для фракционирования пуповинной крови специ-

ального сепаратора клеток (Sepax, Biosafe SA., Eysins-s/Nyon, Швейцария). Аппарат практически исключает использование ручного труда, однако доля выделенных ЯСК и удаленных эритроцитов составляет  $78,6 \pm 28,6$  и  $47,5 \pm 9,1\%$  соответственно [38].

#### Криоконсервирование ГСК пуповинной крови

Основная цель криоконсервирования пуповинной крови — сохранение жизнеспособности кроветворных клеток при ультранизких температурах для дальнейшего использования как трансплантата ГСК [40]. Этапами криоконсервирования биоматериала являются:

- добавление криопротектора;
- глубокое охлаждение суспензии клеток (замораживание);
- длительное хранение при низких и ультранизких температурах;
- размораживание.

Криоконсервирование стволовых клеток заключается в добавлении ДМСО к клеточной суспензии в финальной концентрации 5–10% и замораживании в среднем на  $1-3^\circ\text{C}$  в 1 мин и хранении в жидком азоте или парах жидкого азота [41].

Протоколы криоконсервирования для пуповинной крови в основном базируются на методиках, разработанных для КМ и стволовых клеток ПК.

Максимальное время хранения криоконсервированной пуповинной крови в настоящее время неизвестно, но при устойчивых условиях хранения ГСК, вероятно, останутся жизнеспособными в течение многих десятилетий [4]. Недавние работы E. Broxmeyer и соавт. показали, что после 15 лет хранения в замороженном состоянии стволовые клетки пуповинной крови сохраняют свою пролиферативную активность и поэтому остаются пригодными для трансплантации.

Размораживание стволовых клеток пуповинной крови осуществляется непосредственно перед инфузией при температуре  $37^\circ\text{C}$  в водяной бане [5].

#### Осложнения при трансплантации стволовых клеток пуповинной крови

##### Ближайшие осложнения:

- инфузионные реакции — реакция больного на криопротектор, продукты распада эритроцитов, не полностью удаленные при сепарации. Проявляются повышением температуры, ознобом, тошнотой, рвотой, тахикардией, затрудненным дыханием и головной болью. Частота этих осложнений существенно снижается при проведении премедикации, включающей антипиретические, антигистаминные и противорвотные препараты;
- острая РТПХ.

##### Отдаленные осложнения:

- неприживаемость трансплантата;
- хроническая РТПХ.

В целом, пуповинную кровь в настоящее время следует рассматривать как богатый источник ГСК, пригодных для трансплантации. Создание банков замороженной пуповинной крови поможет в решении проблемы поиска подходящего трансплантата и может рассматриваться как форма биологического страхования жизни.

## Л и т е р а т у р а

1. Румянцев А.Г., Аграненко В.А. Гемотрансфузионная терапия в педиатрии и неонатологии. М., МАКС Пресс; 2002. с. 316–39.
2. Gluckman E., Rocha V. Umbilical cord blood transplantation. In: Clinical bone marrow and blood stem cell transplantation. NY, Cambridge University Press; 2004. p. 1057–73.
3. Forte K.J. Alternative donor sources in pediatric bone marrow transplantation.

- J Pediatr Oncol Nurs 1997;14(4):213–24.
4. Kurtzberg J. Umbilical Cord Blood Banking and Transplantation. In: C.D. Hillyer et al. (eds). Blood banking and transfusion medicine. 2003. p. 593–8.
5. Scott R., Burger. Umbilical Cord Blood Stem Cells. In: Handbook of transfusion medicine. NY, Academic Press; 2001. p. 171–8.
6. Алексеев И.В., Волюнец М.Д., Владимирская Е.Б. и др. Плацентарная

- кровь: альтернативный источник гемопоэтических стволовых клеток для трансплантации. Создание банков пуповинной крови. Гематол и трансфузиол 1996;41(2):16–8.
7. Rocha V., Cornish J., Sievers E. L. et al. Comparison of outcomes of unrelated bone marrow and umbilical cord blood transplants in children with acute leukemia. Blood 2001;97:2962–71.
8. Broxmeyer H.E., Kurtzberg J.,

- Gluckman E. et al. Umbilical cord blood hematopoietic stem and repopulating cells in human clinical transplantation. *Blood Cells* 1991;17(2):313—29.
9. Gluckman E., Broxmeyer H.E., Auerbach A.D. et al. Hematopoietic reconstitution in a patient with Fanconis anemia by means of umbilical-cord blood from HLA-identical sibling. *N Engl J Med* 1989;321(17):1174—78.
10. Kurtzberg J., Laughlin M., Graham M.L. et al. Placental blood as a source of hematopoietic stem cells for transplantation into unrelated recipients. *N Engl J Med* 1996;335(3):157—66.
11. Gluckman E., Broxmeyer H.E. Hematopoietic stem-cell transplants using umbilical-cord blood. *N Engl J Med* 2001;344(24):1860—61.
12. Harris D.T. Experience in autologous and allogeneic cord blood banking. *J Hematother* 1996;5(2):123—8.
13. Denning-Kendall P., Donaldson C., Nicol A. et al. Optimal processing of human umbilical cord blood for clinical banking. *Exp Hematol* 1996;24(12):1394—401.
14. Watt S.M., Contreras M. Stem cell medicine: umbilical cord blood and its stem cell potential. *Semin Fetal Neonatal Med* 2005;10(3):209—20.
15. Трахтман П.Е., Балашов Д.Н., Щипцина И.П. и др. Использование пуповинной крови при проведении аллогенной трансплантации гемопоэтических клеток у детей со злокачественными и незлокачественными заболеваниями системы крови. *Клеточная трансплантология и тканевая инженерия* 2006;1(1):80—3.
16. Долгополов И.С., Субботина Н.Н., Бояринов В.К. и др. Опыт применения комбинации стволовых клеток пуповинной и периферической крови от частично-совместимых родственных доноров у больного нейробластомой IV стадии. *Клеточная трансплантология и тканевая инженерия* 2006;1(1):78—9.
17. Barker J.N., Weisdorf D.J., DeFor T.E. et al. Transplantation of two partially HLA-matched umbilical cord blood units to enhance engraftment in adults with hematologic malignancy. *Blood* 2005;105(3):1343—7.
18. Falkenburg J.H.F., Lim F.T.H. Использование пуповинной крови вместо костного мозга для аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток. *PMЖ* 1996;3(4):24—31.
19. Wall D.A., Winn H.N., Noffsinger J.M., Mueckl K.A. et al. Feasibility of an obstetrician-based cord blood collection network for unrelated donor umbilical cord blood banking. *J Matern Fetal Med* 1997;6(6):320—3.
20. Wall D.A. The case for umbilical cord blood as the unrelated donor hematopoietic stem cell source of choice. *Blood therapies in medicine* 2001;1(3):81—3.
21. Barcer J.N., Wagner J.E. Umbilical cord blood transplantation: current of the art. *Curr Option Oncol* 2002;14:160—4.
22. Abdel-Mageed A., Rosalio M.L.U., Hutcheson C.E. Effect of temperature variation on cell number, viability and clonogenic potential. *Blood* 1997;90(10):321b (4194).
23. Rocha V., Wagner J.E., Sobocinski K.A. et al. Graft-versus-host disease in children who have received a cord-blood or bone marrow transplant from an HLA-identical sibling. *Eurocord and International Bone Marrow Transplant Registry Working Committee on Alternative Donor and Stem Cell Sources*. *N Engl J Med* 2000;342(25):1846—54.
24. Абдулкадыров К.М. Заготовка, хранение и лабораторное тестирование пуповинной крови. В кн.: К.М. Абдулкадыров. *Гематология. Новейший справочник*. М., Эксмо: 2004. с. 890—901.
25. Bertolini F., Battaglia M., De Iulio C. et al. Placental blood collection: effects on newborns. *Blood* 1995;85(11):3361—2.
26. Rubinstein P., Dobrila L., Rosenfield R.E. et al. Processing and cryopreservation of placental/umbilical cord blood for unrelated bone marrow reconstitution. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92(22):10119—22.
27. Shlebak A.A., Marley S.B., Roberts I.A. et al. Optimal timing for processing and cryopreservation of umbilical cord haematopoietic stem cells for clinical transplantation. *Bone Marrow Transplant* 1999;23(2):131—36.
28. Юрасов С.В., Владимирская Е.Б., Румянцев А.Г. и др. Выделение гемопоэтических стволовых клеток из пуповинной крови человека для трансплантации. *Гематол и трансфузиол* 1997;42(2):10—5.
29. Hubl W., Iturraspe J., Hutcheson C.E. et al. Effect of storage on stem cell concentration and viability in cord blood. *Blood* 1997;90(10):326b.
30. Tichelli A., Surbek D., Huxol H. et al. [Establishing an umbilical cord blood bank for unrelated allogeneic stem cell transplantation]. *Schweiz Med Wochenschr* 1998;128(42):1598—601.
31. Turner M.L., McClelland D.B., Franklin I.M. Hemopoietic progenitor cell harvesting processing and storage: Global regulation to ensure the quality of products for patients. *Br J Haematol* 1997;99:715—8.
32. Mayani H., Lansdorp P.M. Biology of human umbilical cord blood-derived hematopoietic stem/progenitor cells. *Stem Cells* 1998;16:153—65.
33. Noort W.A., Falkenburg I.H.F. Hematopoietic content of cord blood. In: *Cord blood characteristics. Role in stem cell transplantation*. S.B.A. Cohen, E. Gluckman, A. Madrigal, P. Rubinstein (eds). 2000. p. 13—37.
34. Garderet L., Dulphey N., Douay C. et al. The umbilical cord blood and T cell repertoire: characteristics of a polyclonal and naive but completely formed repertoire. *Blood* 1998;91:340—6.
35. Rocha V., Cornish J., Sievers E. L. et al. Comparison of outcomes of unrelated bone marrow and umbilical cord blood transplants in children with acute leukemia. *Blood* 2001;97:2962—71.
36. Bradley M.D., Cairo M.S. Cord blood immunology and stem cell transplantation. *Human Immunol* 2005;6:431—46.
37. Broxmeyer H.E., Gordon G.W., Hangoc G. et al. Human umbilical cord blood as a potential source of transplantable hematopoietic stem/progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86:3828—32.
38. Zingsem J., Strasser E., Weisbach V. et al. Cord blood processing with an automated and functionally closed system. *Transfusion* 2003;43(6):806—13.
39. Bradley M.D., Cairo M.S. Cord blood immunology and stem cell transplantation. *Human Immunol* 2005;6:431—46.
40. Szer J. Cryopreservation and functional assessment of harvested bone marrow and blood stem cells. In: *Clinical bone marrow and blood stem cell transplantation*. NY, Cambridge University Press; 2004. p. 450—6.
41. Gee A.P. Bone marrow processing and purging: a practical guide. 1991. p. 332—7.