

## Оцінка якості зразка пуповинної крові та її місце в трансфузіології

П.М. ПЕРЕХРЕСТЕНКО, Г.Т. ГЛУХЕНЬКА, Т.О. КАЛИНИЧЕНКО, Р.П. ПАВЛЮК, Г.П. ГАШУК, Н.К. СКАЧКОВА

*Інститут гематології та трансфузіології АМН України, м. Київ*

### Assessment of Umbilical Cord Blood Sample's Quality and Its Place in Transfusiology

P.M. PEREKHRESTENKO, G.T. GLUKHEN'KA, T.O. KALINICHENKO, R.P. PAVLYUK, G.P. GASCHUK, N.K. SKACHKOVA

*Institute of Hematology and Transfusiology of Academy of Medical Sciences of Ukraine, Kyiv, Ukraine*

Суспільні банки пуповинної крові (ПК) необхідні для забезпечення потреб хворих з депресіями імуногемопоезу різного ступеня тяжкості. Їх функціонування не можливе без розробки і прийняття єдиних стандартів якості заготівлі та кріоконсервування ПК, що повинні співпадати з правилами і стандартами України в галузях трансплантології і трансфузіології.

З огляду на те, що ПК як тканина є, насамперед, кров'ю, що залишилась у вені пуповини і плаценті після відокремлення новонародженого від матері, розробка стандартів у галузі її заготівлі сприяє вирішенню однієї з проблем трансфузіології як самостійного розділу медицини в національній системі охорони здоров'я, а саме – управління функціями організму за допомогою парентерального введення трансфузійних середовищ, якими є компоненти крові та кровотворна тканина. Зазначена проблема є одним з пріоритетних напрямів трансфузіології в контексті розробки нових методів консервування компонентів крові, у складі яких є гемопоетичні клітини, та впровадження немедикаментозних методів лікування за допомогою кріоконсервованих трансфузіологічних засобів.

Мета роботи – визначити критерії відбору зразків пуповинної крові для кріоконсервування.

Об'єкт досліджень – ядровмісні клітини (ЯВК) ПК і сироватка крові породіллі. Вилучення матеріалу проводилося в „замкненій” системі після отримання інформованої згоди при фізіологічних пологах. Зразки ПК, стабілізовані розчином CPDA-1, зберігали в термоізоляційному контейнері при температурі  $(21,5 \pm 3,5)^\circ\text{C}$ .

Оцінку зразків клітин ПК проводили на основі морфологічних, імунологічних і функціональних методів, а також зовнішніх характеристик.

Визначено критерії відбору якісних зразків ПК для кріоконсервування на етапі їх реєстрації в кріобіологічному відділенні за зовнішніми (візуальними) і кількісними параметрами. Встановлено, що до спектра методів оцінки якості зразків ПК на тканинному та клітинному рівнях перед початком процедури підготовки до заморожування слід віднести такі обов'язкові методи, як зважування з метою визначення об'єму крові, визначення життєздатності ЯВК експресним методом суправітального забарвлення, підрахунок загальної кількості ЯВК, і загальної кількості мононуклеарів, визначення вмісту CD34-позитивних клітин; тестування крові породіллі на відсутність збудників трансмісивних інфекцій або антитіл до них; а також додаткові: метод морфологічного дослідження, вмісту клітин, що розпадаються, апоптотичних клітин при світловій мікроскопії мазків, визначення вмісту неочікуваних антитіл до еритроцитарних антигенів в сироватці крові породіллі, фагоцитарної функції нейтрофільних гранулоцитів, вмісту гранулоцитарно-макрофагальних колонієутворюючих одиниць.

Public banks of umbilical cord blood (UCB) are necessary to meet the needs of patients with immune hemopoietic depressions of different severity levels. Their functioning is impossible without designing and admitting the common qualitative standards for UCB procurement and cryopreservation, that should agree with transplantology and transfusiology rules and standards of Ukraine.

Due to the fact that the UCB as tissue is, primarily, the blood, left in umbilical cord vein and placenta after newborn separating from mother, the elaborating of standards for its procurement contributes to solve one of the problems of transfusiology as an independent section of medicine in the national system of health care, namely the controlling of organism's functions by means of parenteral introduction of such transfusion media as blood components and hemopoietic tissue. The mentioned problem is one of the priority directions of transfusiology in designing new methods of blood component preservation, comprising hemopoietic cells, and introducing non-medicamentous therapeutic methods via cryopreserved transfusiological means.

The research aim was to determine the selective criteria for umbilical blood samples to be cryopreserved.

The UCB nucleated cells (NCs) and puerpera's blood serum were the research object. Material was procured in a "closed" system after obtaining an informed consent under physiological labour. UCB samples, stabilised with CPDA-1 solution, were stored into a thermoisolated container at  $(21.5 \pm 3.5)^\circ\text{C}$ .

The UCB cell samples were assessed, basing on morphological, immunological and functional methods, as well as external characteristics.

There has been determined the criterion for selecting UB qualitative samples to be cryopreserved at the stage of their recording in cryobiological department by the external (visual) and quantitative parameters. It was established, that to the range of methods for UCB sample quality estimation at tissue and cell levels before beginning the preparation procedure to freezing, should be referred such mandatory methods as weighing for blood volume determination, NCs viability determination by express-method of supravital staining, NCs and mononuclear total amount counting, determination of CD34-positive cells; testing puerpera's blood for the absence of either transitive infection agents or their antibodies; as well as additional ones: method of morphological study, content of dissociated cells, apoptotic ones under light microscopy of smears, determination of content of unexpected antibodies to erythrocyte antigens in puerpera's blood serum, phagocyte function of neutrophil granulocytes, content of granulocyte-macrophage colony-forming units.

## Инфицированность пуповинной крови и эмбрионов ранних сроков гестации, гемопоэз в эмбриональной печени

Г.С. ЛОБЫНЦЕВА, И.В. ВОРОЖКА, А.В. СИТНИКОВА  
Институт клеточной терапии, г. Киев

## Infectioning of Umbilical Cord Blood and Embryos of Early Gestation Terms and Hemopoiesis in Embryonic Liver

G.S. LOBYNTSEVA, I.V. VOROZHKA, A.V. SITNIKOVA  
Institute of Cell Therapy, Kiev, Ukraine

Во время беременности иммунная система матери проявляет толерантность к антигенным структурам плода, благодаря чему не происходит его отторжения. Это связано с наличием плацентарного барьера, с низкой плотностью антигенов гистосовместимости на клетках трофобласта, а также с супрессорной направленностью иммунных реакций в системе мать-плод. Высокое потребление кислорода растущими тканями препятствует размножению и проникновению в эмбрион РНК-содержащих вирусов. Однако ДНК-содержащие вирусы могут встраиваться в геном клеток и находиться в них латентно в течение длительного времени. В более поздние сроки развития при переключении на анаэробный цикл с умеренным синтезом белка создаются условия для размножения РНК-содержащих вирусов и может развиваться острая или хроническая инфекция плаценты. При исследовании тканей abortивных эмбрионов установлено, что патогены могут проникать в эмбрион еще до полного формирования плаценты. Наиболее распространенной инфекцией является микоплазмоз (17%), возбудитель выявляется с 6 по 12 неделю внутриутробного развития в тканях печени, почек, сердца, мозга и кроветворных клетках эмбрионов, 5% эмбрионов поражены хламидиями, 6% – уреоплазмой, 4% – гепатитом С, 2,5% – EBV.

Многими авторами было показано, что первичное развитие В-лимфоцитов и окончательная их дифференцировка в секреторирующие клетки происходят в эмбриональной печени. Т-клетки обнаружены в эмбриональной печени задолго до появления тимуса и становления клеточного иммунитета. Однако реакция этих клеток на митогены и лимфоциты в СКЛ очень слабая. Повидимому, в ответ на инфекционный агент включается механизм врожденного иммунитета, который стимулирует миелопоэз, отсутствующий в норме на данном этапе развития эмбриона, запускает в пролиферацию клетки-предшественники грануломоноцитопоэза. При сравнительном морфологическом анализе чистых и инфицированных образцов обнаружено достоверное увеличение количества моноцитов, макрофагов, появляются гранулоциты и эозинофилы, которые также участвуют в процессе фагоцитоза. Фагоцитирующие клетки играют ключевую роль во всех фазах защиты человека от инфекции. Участвуют ли НК-клетки в ранней фазе защиты эмбриона трудно сказать, однако они присутствуют в инфицированных образцах в виде больших гранулярных лимфоцитов (12–15 мкм в диаметре) с азурофильными гранулами в цитоплазме. Их способность убивать определенные опухолевые клетки *in vitro* без предварительной активации и вирусы, особенно *Herpes virus* и *Listeria monocytogenes*, была доказана.

During pregnancy the mother's immune system is tolerant to antigen structures of fetus, thereby preventing its rejection. This is associated to the presence of placental barrier with a low density of histocompatibility antigens on fibroblast cells, as well as to a suppressive orientation of immune responses in the mother-fetus system. High oxygen consumption by growing tissues prevents the reproduction and penetration of RNA-containing viruses into an embryo. However the DNA-containing viruses may be built into a cell genome and be present there latently for a long time. Under later terms of development when transferring to an anaerobic cycle with a moderate protein synthesis, the conditions for RNA-containing viruses are created and either an acute or chronic placenta infection may develop.

When studying the tissues of abortion embryos, the pathogens were established as capable to penetrate into an embryo even before complete placenta formation. The most spread infection is mycoplasmosis (17%), the pathogen is found-out from the 6<sup>th</sup> to 12<sup>th</sup> week of prenatal development in tissues of liver, kidney, heart, brain and embryo's hemopoietic cells, 5% of embryos are contaminated with chlamydia, 6% with ureaplasma, 4% with hepatitis C, 2.5% with EBV.

Many authors have demonstrated that a primary development of B-lymphocytes and their final differentiation in secreting cells occur in embryonic liver. The T-cells are found-out in embryonic liver long before thymus appearance and cell immunity formation. However the response of these cells to mytogens and lymphocytes in MLC is very slight. Apparently, in response to an infectious agent, there is involved the mechanism of congenital immunity, that stimulates myelopoiesis, normally being absent at this stage of embryo development and triggers progenitor cells of granulomonocytopenesis in proliferation. At a comparative morphological analysis of intact and infected samples, a statistically significant increase in a number of monocytes, macrophages, appearance of granulocytes and eosinophiles, participating in phagocytosis, were revealed. Phagocytosing cells play a key role in all phases of human protection against infection. It is difficult to tell whether NK-cells participate in early phase of embryo protection, but they are present in the infected samples as big granular lymphocytes (12–15 µm in diameter) with azurophil granules in cytoplasm. Their capability to kill the certain cancer cells *in vitro* with no preliminary activation and viruses, especially *Herpes virus* and *Listeria monocytogenes*, has been proved.

## **Опыт банкирования гемопоэтических стволовых клеток из пуповинной крови в США, Европе, Азии и России**

В.С. МЕЛИХОВА, А.А. ИСАЕВ, А.В. ПРИХОДЬКО

*Институт стволовых клеток человека, г. Москва*

## **Banking Experience for Hemopoietic Stem Cells Derived From Umbilical Cord Blood in USA, Europe, Asia and Russia**

V.S. MELIKHOVA, A.A. ISAEV, A.V. PRIKHODKO

*Institute of Human Stem Cells, Moscow, Russia*

В докладе сделан обзор современного состояния банкирования стволовых клеток из пуповинной крови (ПК). После краткого рассмотрения истории вопроса проведен анализ правового регулирования деятельности донорских и частных банков за рубежом. Отдельно рассмотрены лидеры США, Канады, стран Южной Америки, Африки, Европы, Азии и Австралии. Показано, что, несмотря на почти двадцатилетнюю историю банков ПК, вопросы законодательного регулирования, а также унификации методик, используемых банками, еще не решены.

Вторая часть доклада посвящена анализу работы банков в России. Первые российские банки как донорские, так и персональные, появились в 2003 году, на их пути много препятствий, в том числе административных. Освещены вопросы регулирования деятельности и лицензирования банков ПК. Главная проблема банков – отсутствие законодательной базы, обеспечивающей каждой матери право сохранить ПК.

Особенно важна эта проблема в контексте перспектив применения клеток ПК для целей клеточной терапии. По мере роста спроса на широкое использование этих клеток каждое государство должно решить, собирать ли ПК у всех новорожденных (что очень дорого) или выбирать более практичный подход – развивать общественную донорскую систему с сохранением за частными банками права на функционирование.

The report covers the review of current state of banking for stem cells from umbilical cord blood (UCB). After brief consideration of the history of this question there has been analyzed the legal regulation of activity of donor's and private banks abroad. Separately there were considered the leading ones in the USA, Canada, countries of South America, Africa, Europe, Asia and Australia. It has been shown that in spite of almost two decades' history of UCB banks, the tasks of legislation regulation as well as unification of the methods used by the banks have not been solved yet.

The second part of the report is devoted to the analysis of the functioning of the banks in Russia. The first Russian banks, both donor's and personal appeared in 2003, they have been faced many obstacles on their way, including administrative. The questions of regulating the activity and licensing have been enlightened. The main problem of the banks is the absence of legislative base, providing each mother with a right to preserve the UCB.

The task of prospective UCB cells' application for cell therapy is getting especially important. With the growing demand for a wide use of these cells each government should decide whether to collect the UCB from all the newborns (that is every expensive) or to choose more practical approach of developing the public donor's system with keeping the right of private banks to function.