

ОСОБЕННОСТИ ЛЕЙКОЦИТАРНОГО ПУЛА КОНЦЕНТРАТА КЛЕТОК ПУПОВИННОЙ КРОВИ, ЗАГОТОВЛЕННОГО ДЛЯ ДОЛГОСРОЧНОГО КРИОХРАНЕНИЯ

Тюмина О.В.^{1, 2}, Овчинников П.А.¹, Трусова Л.М.¹, Тюмин И.В.^{1, 3},
Давыдкин И.Л.²

¹ ГБУЗ «Самарский областной медицинский центр «Династия», г. Самара, Россия

² ФГБОУ ВО «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Самара, Россия

³ Медицинский радиологический научный центр имени А.Ф. Цыба — филиал ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Министерства здравоохранения РФ, г. Обнинск, Россия

Резюме. Аллогенная трансплантация гемопоэтических клеток входит в стандарт лечения пациентов с острым лейкозом высокого риска. Пуповинная кровь (ПК) является альтернативным источником аллогенных стволовых гемопоэтических клеток для пациентов, которые нуждаются в трансплантации, но не имеют родственного донора. Цель исследования: изучение особенностей лейкоцитарного пула (клеточного состава, иммунофенотипа) концентрата клеток пуповинной крови (ПК), которые заготавливаются для публичного долгосрочного криохранения для нужд трансплантологии. Проведено исследование 1096 образцов пуповинной крови доношенных новорожденных до и после процессинга (выделения концентрата гемопоэтических стволовых клеток (ГСК)). Показано, что при использовании критерия обработки образцов ПК с количеством лейкоцитов не менее 15×10^8 лейкоцитов в пересчете на объем заготовленного образца ПК до обработки с антикоагулянтом среднее количество клеток в концентрате ГСК ПК объемом 25 мл, находящегося на долгосрочном криохранении составляет: лейкоцитов — $17,41 \pm 0,36 \times 10^8$, ГСК с иммунофенотипом (CD34⁺) — $5,25 \pm 3,6 \times 10^6$, натуральных киллерных клеток (CD3⁺CD16⁺CD56⁺) — $1,65 \pm 0,7 \times 10^8$. Изучена субпопуляционная структура НК-лимфоцитов в концентрате ГСК ПК: иммунофенотип CD56^{dim}CD16^{dim} клеток встречался в большинстве случаев — $45,15 \pm 18,1\%$, а минорные субпопуляции CD56^{dim}CD16^{bright}, CD56⁺CD16⁺, CD56^{bright}CD16 составили $0,27 \pm 0,2$, $1,33 \pm 0,7$ и $0,99 \pm 0,4\%$ соответственно. При анализе популяции NKT-клеток было выявлено $6,22 \pm 2,1\%$ клеток с иммунофенотипом CD3⁺CD16/CD56⁺, количество CD3⁺CD56⁺ клеток составило $3,69 \pm 2,4\%$, количество CD3⁺CD16⁺ — $2,53 \pm 1,2\%$. В пуле NKT-клеток выявлены $5,15 \pm 2,1\%$ CD56⁺CD16⁺ клеток, также определены две минорные субпопуляции, которые отличаются по экспрессии антигенов CD56 и CD16: уровень CD56⁺CD16⁺ составил $2,91 \pm 1,2\%$, а CD56⁺CD16⁺ оказалось равным $0,69 \pm 0,3\%$. Полученные данные о количестве и характеристике иммунофенотипа клеток, также гетерогенности популяции НК- и NKT-лимфоцитов в концентрате ГСК ПК, заложенных

Адрес для переписки:

Тюмина Ольга Владимировна
ГБУЗ «Самарский областной медицинский центр
«Династия»
443095, Россия, г. Самара, ул. Ташкентская, 159.
Тел.: 8 (902) 291-27-88.
E-mail: centr123@bk.ru

Address for correspondence:

Olga V. Tyumina
Samara Regional Dynasty Medical Center
159 Tashkentskaya St
Samara
443095 Russian Federation
Phone: +7 (902) 291-27-88.
E-mail: centr123@bk.ru

Образец цитирования:

О.В. Тюмина, П.А. Овчинников, Л.М. Трусова,
И.В. Тюмин, И.Л. Давыдкин «Особенности
лейкоцитарного пула концентрата клеток пуповинной
крови, заготовленного для долгосрочного криохранения»
// Медицинская иммунология, 2024. Т. 26, № 3.
С. 617-624. doi: 10.15789/1563-0625-FOT-2900

© Тюмина О.В. и соавт., 2024

Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

O.V. Tyumina, P.A. Ovchinnikov, L.M. Trusova, I.V. Tyumin,
I.L. Davydkin "Features of the leukocyte pool of umbilical cell
blood cell concentrate prepared for long-term cryostorage",
Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya,
2024, Vol. 26, no. 3, pp. 617-624.
doi: 10.15789/1563-0625-FOT-2900

© Tyumina O.V. et al., 2024

The article can be used under the Creative
Commons Attribution 4.0 License

DOI: 10.15789/1563-0625-FOT-2900

на долгосрочное криохраниение, необходимо учитывать для подбора концентрата ГСК ПК с целью трансплантации при онкогематологических заболеваниях.

Ключевые слова: пуповинная кровь, стволовые гемопоэтические клетки, концентрат ГСК ПК, NK-лимфоциты, NKT-лимфоциты, субпопуляции лимфоцитов

FEATURES OF THE LEUKOCYTE POOL OF UMBILICAL CELL BLOOD CELL CONCENTRATE PREPARED FOR LONG-TERM CRYOSTORAGE

Tyumina O.V.^{a, b}, Ovchinnikov P.A.^a, Trusova L.M.^a, Tyumin I.V.^{a, c}, Davydkin I.L.^b

^a Samara Regional Dynasty Medical Center, Samara, Russian Federation

^b Samara State Medical University, Samara, Russian Federation

^c A. Tsyb Medical Radiological Research Center, Branch of National Medical Research Center of Radiology, Obninsk, Russian Federation

Abstract. Allogeneic hematopoietic cell transplantation is the standard of care for patients with high-risk acute leukemia. Cord blood (UCB) is an alternative source of allogeneic hematopoietic stem cells for patients who need transplantation but do not have a related donor. The purpose of our study was to evaluate the characteristics of leukocyte pool (cellular composition, immunophenotype) of umbilical cord blood (UCB) cell concentrates, which were harvested for public long-term cryostorage for the needs of transplantology. A study of 1096 samples of umbilical cord blood of full-term newborns before and after processing [isolation of hematopoietic stem cells (HSC) concentrate] was carried out. The number of cells in the pooled concentrate of HSC at a volume of 25 mL, after long-term cryostorage was as follows: leukocytes, $17.41 \pm 0.36 \times 10^8$; HSCs with CD34⁺ immunophenotype, $5.25 \pm 3.6 \times 10^6$; natural killer cells (CD3⁺CD16⁺CD56⁺), $1.65 \pm 0.7 \times 10^8$. Analysis of the NKT cell population revealed $6.22 \pm 2.1\%$ of cells with CD3⁺CD16/CD56⁺ immunophenotype. The contents of CD3⁺CD56⁺ cells was $2.69 \pm 2.4\%$, the relative amount of CD3⁺CD16⁺ was $2.53 \pm 1.2\%$. In the pooled NKT cell preparations, $5.15 \pm 2.1\%$ of CD56⁺CD16 cells were detected, and two minor subpopulations were also identified, which differ in CD56 and CD16 antigen expression: the level of CD56⁺CD16⁺ was $2.91 \pm 1.2\%$, and the ratio of CD56⁺CD16⁺ cells was $0.69 \pm 0.3\%$. The obtained data on relative amounts and characteristics of cellular immunophenotype as well as the heterogeneity of the NK and NKT cell population in the HSC UCB concentrate, subjected to long-term cryostorage must be taken into account when selecting the HSC UCB concentrates for the purpose of transplantation in oncohematological diseases.

Keywords: cord blood, hematopoietic stem cells, stem cell concentrate, NK, NK lymphocytes, NKT lymphocytes, lymphocyte subpopulations

Введение

Аллогенная трансплантация гемопоэтических стволовых клеток (алло-ГСК) — терапия, направленная на излечение пациентов с лейкемией, рефрактерной ко всем другим видам стандартной химиотерапии. Эффективность Алло-ГСК обеспечивается за счет двух причин: использования высоких дозы химиотерапии и эффекта аллогенной реакции «трансплантат против лейкемии», которая опосредована донорскими лимфоцитами. Только около одной трети всех пациентов, которым требуется алло-ГСК, будут иметь подходящего родственного донора. Пуповинная кровь

(ПК) является альтернативным источником гемопоэтических стволовых клеток. Преимущества ПК включают быструю доступность и менее строгие требования соответствия подбора по системе лейкоцитарных антигенов, что приводит к подбору единиц ПК для большинства пациентов, кроме того преимуществом ПК является низкий риск передачи инфекции от донора к реципиенту [7, 9].

Рецидив лейкоза остается значительным препятствием для успеха алло-ГСК. Единица ПК содержит как минимум в 10-100 раз меньше лимфоцитов, чем трансплантат стволовых клеток костного мозга или периферической крови.

Учитывая данное обстоятельство были опасения относительно способности клеток ПК вызывать аллогенную реакцию «трансплантат против лейкемии». Однако частота рецидивов лейкемии после трансплантации единиц ПК аналогична другим источникам клеток [13, 15]. Учитывая, что реакция «трансплантат против лейкемии», возникает рано после алло-ГСК и что естественные клетки-киллеры (NK) характеризуются способностью быстро восстанавливаться [8], такие клетки могут играть важную роль в этой реакции после трансплантации алло-ГСК ПК.

Цель исследования — представить характеристику лейкоцитарного пула, включая иммунофенотип концентрата клеток пуповинной крови, заготавливаемых в государственном банке ПК для целей трансплантаций, чтобы понять их сильные и слабые стороны при их применении в клинической медицине.

Материалы и методы

Материалом для исследования служила пуповинная кровь 1096 доношенных новорожденных, которую заготавливали после подписания добровольного информированного согласия матери при физиологических родах с учетом отсутствия противопоказаний. Срок гестации, родившихся детей 37-41 недель (Me — 40,2 недели). В третьем периоде родов после рождения ребенка пережимали и пересекали пуповину, затем производили пункцию сосудов пуповины специальной системой для забора ПК, содержащей 35,5 мл антикоагулянта CPDA. Сбор крови осуществляли в течение 5-15 мин после родов, до отделения плаценты. Полученный материал доставляли в термоконтейнере при комнатной температуре и подвергали анализу не позднее 24 ч. после процедуры сбора.

В соответствии с приказом МЗ РФ от 25 июля 2003 г. № 325 «О развитии клеточных технологий», международным стандартом NETCORD и Российским стандартом РУСКОРД все образцы пуповинной крови, поступившие в лабораторию банка пуповинной крови ГБУЗ «МЦ Династия», прежде всего оценивались как источник ГСК, на его пригодность для трансплантации [2, 5]. Для этого производили: взвешивание образца, определение объема материала; определение группы крови и резус-фактора; определение клеточного состава, количества гемопоэтических стволовых клеток с иммунофенотипом CD34⁺; обследование на наличие гемотрансмиссивных инфекций (ВИЧ, HbsAg, вирусный гепатит С, сифилис, цитомегаловирус, герпес, токсоплазмоз); бактериологическое исследование крови на стерильность. В результате лабораторного скрининга отбирали для дальнейшей обработки образцы ПК с содер-

жанием лейкоцитов не менее 10×10^9 /л, объемом не менее 120 мл пуповинной крови с антикоагулянтом, а также образцы ПК с отрицательными результатами на гемотрансмиссивные инфекции, которым далее проводилось HLA-типирование средним разрешением по локусам A, B, C, DRB1, DQA1.

Затем каждый образец ПК подвергался процедуре процессинга: выделению концентрата лейкоцитов, содержащего в том числе гемопоэтические стволовые клетки, при этом для уменьшения общего объема крови и удаления эритроцитов использовался 10% гидроксипропилкрахмал и метод двойного центрифугирования.

В результате процедуры выделения концентрата ГСК первоначальный объем собранного образца ПК 120 ± 35 мл уменьшился до 25 мл, для криохранения использовались контейнеры Масо Biotec с магистральями портами, полимерными иглами и переходниками «Луер» для криоконсервирования, хранения и транспортировки стволовых клеток (арт. GSR0501AU) (Masopharma, Франция).

Далее образец ГСК ПК подвергался криоконсервации после добавления ДМСО к клеточной суспензии в финальной концентрации 10% и замораживании в автоматизированном комплексе Биоархив в течение 30 мин, снижение температуры проводилось средним на 1-3 °С в 1 мин и дальнейшего хранения концентрата ГСК ПК проводилось в парах жидкого азота.

Определение численности клеточных популяций до и после обработки образцов ПК проводилось на гематологическом анализаторе Mindray BC 5300 в режиме автоматической аспирации, определялось 26 параметров, включая распределение лейкоцитов по пяти параметрам: лимфоциты, моноциты, нейтрофилы, эозинофилы, моноциты.

Идентификация специфичных рецепторов, экспрессирующихся на поверхности лейкоцитарных и гемопоэтических стволовых клеток пуповинной крови, проводилась после процессинга пуповинной крови, то есть получения концентрата ГСК. Исследуемые образцы анализировались методом проточной цитометрии на цитофлуориметре BDFACS Canto™ II (США), реагенты Becton, Dickinson and Company (США), программное обеспечение — BD FACSDiva v. 9.0.1.

В ходе проточной цитофлуориметрии устанавливалось процентное содержание изучаемой популяции от числа всех лейкоцитов, гейтируемых на цитометре по экспрессии мембранных маркеров (CD — кластер дифференцировки) в реакции прямой иммунофлуоресценции с моноклональными антителами. При помощи па-

нели моноклональных антител было проведено определение уровня экспрессии поверхностных маркеров лимфоцитов CD34, CD45, CD3, CD4, CD8, CD19, CD14, CD16, CD56. Статистический анализ проводили с использованием программы Statistica 7.

Результаты и обсуждение

Всего было проанализировано 1096 образцов пуповинной крови. В таблице 1 представлены данные о клеточном составе образцов ПК до процессинга (выделения концентрата ГСК), с учетом корректировки на объем антикоагулянта. Дальнейшему процессингу подвергались только образцы ПК с высокой концентрацией лейкоцитов, не менее $10 \times 10^9/\text{л}$ или 15×10^8 в пересчете на объем заготовленного образца ПК до обработки с антикоагулянтом.

В результате проведения процедуры выделения ГСК в процессе седиментации эритроцитов под действием гидроксипропилоккрахмала происходит значимое повышение доли лимфоцитов с 31,9% до 35,6%, снижение доли эозинофилов и базофилов почти 2 раза с 5,0% до 2,9% и с 1,9% до 1,0% соответственно, при этом доля нейтрофилов не изменяется (47,2% и 47,0% после выделения концентрата ГСК) (табл. 2). Кроме того, происходит деплеция 85% эритроцитов, сохранение 91% лейкоцитов и 70% тромбоцитов в концентрате клеток после обработки.

Концентрация клеток в конечном криомешке, зависит от его объема, в таблице 3 приведены данные о клеточном составе концентрата ГСК пуповинной крови объемом 25 мл, заготовленного для долгосрочного криохранения.

В концентрате ГСК ПК объемом 25 мл выявлено среди всех лейкоцитов: нейтрофилов — 46,9% ($8,16 \pm 0,42 \times 10^8$), лимфоцитов 35,6% ($6,49 \pm 0,25 \times 10^8$), моноцитов — 13,4% ($2,34 \pm 0,14 \times 10^8$), эозинофилов — 2,8% ($0,48 \pm 0,03 \times 10^8$), базофилов — 1,08% ($0,18 \pm 0,02 \times 10^8$).

Иммунологическая характеристика лейкоцитов пуповинной крови оценивалась после обработки, выделения объемом 25 мл концентрата ГСК ПК, выявлено: Т-лимфоцитов — $3,8 \pm 0,13 \times 10^8$ (22,01%), В-лимфоцитов — $1,43 \pm 0,43 \times 10^8$ (8,21%), Т-лимфоцитов хелперов — $2,66 \pm 0,11 \times 10^8$ (15,33%), Т-цитотоксических лимфоцитов — $0,95 \pm 0,13 \times 10^8$ (5,43%), натуральных киллеров — $1,6 \pm 0,7 \times 10^6$, 25,9±0,36% от всех лимфоцитов. Количество гемопоэтических стволовых клеток с фенотипом CD34⁺ в концентрате ГСК ПК оценивалось по двум параметрам: процент от общего количества лимфоцитов, что составило $0,81 \pm 0,16\%$, и абсолютное количество в концентрате ГСК ПК в объеме 25 мл, что составило $5,25 \pm 1,2 \times 10^6$ клеток, на 1 мл соответственно — $0,21 \pm 0,15 \times 10^3/\text{мм}^3$. Одна из важных характеристик концентрата ГСК ПК — это количество натуральных киллерных клеток (NK клетки — CD3⁺CD16⁺CD56⁺), их абсолютное количество в концентрате ГСК ПК

ТАБЛИЦА 1. КЛЕТОЧНЫЙ СОСТАВ ОБРАЗЦОВ ПУПОВИННОЙ КРОВИ (n = 1096) ДО ОБРАБОТКИ ($\times 10^9/\text{л}$)

TABLE 1. CELLULAR COMPOSITION OF UMBILICAL CORD BLOOD SAMPLES (n = 1096) BEFORE PROCESSING ($\times 10^9/\text{L}$)

	Лейкоциты WBC	Нейтрофилы NEW	Лимфоциты LYM	Моноциты MON	Эозинофилы EOS	Базофилы BAS	Эритроциты RBC	Тромбоциты PLT
Среднее значение Average value	18,17	8,57	5,81	2,53	0,91	0,35	4510,1	281,6
Медиана Median	17,35	8,01	6,01	2,12	0,55	0,17	4345,2	295,2
Стандартное отклонение Standard deviation	3,24	3,23	1,92	1,02	0,35	0,18	125,1	24,6
Стандартная ошибка среднего Standard error of the mean	0,15	0,10	0,05	0,05	0,02	0,01	26,1	5,1
Минимальное значение Minimum value	10,91	5,11	4,85	0,68	0,07	0,03	4023,1	195,2
Максимальное значение Maximum value	42,91	24,2	18,65	13,78	2,64	2,12	4642,2	354,3

ТАБЛИЦА 2. КЛЕТОЧНЫЙ СОСТАВ КОНЦЕНТРАТА (n = 1096) ГСК ПУПОВИННОЙ КРОВИ ДЛЯ ДОЛГОСРОЧНОГО КРИОХРАНЕНИЯ ($\times 10^9/\text{л}$)

TABLE 2. CELLULAR COMPOSITION OF THE CONCENTRATE (n = 1096) UMBILICAL CORD BLOOD HSCs FOR LONG-TERM CRYOPRESERVATION ($\times 10^9/\text{L}$)

	Лейкоциты WBC	Нейтрофилы NEW	Лимфоциты LYM	Моноциты MON	Эозинофилы EOS	Базофилы BAS	Эритроциты RBC	Тромбоциты PLT
Среднее значение Average value	72,57	35,51	25,83	8,39	2,14	0,43	2320,1	656,3
Медиана Median	73,25	36,31	24,21	8,92	2,55	0,51	2345,2	691,6
Стандартное отклонение Standard deviation	17,54	9,43	7,82	2,02	0,45	0,31	105,1	22,8
Стандартная ошибка среднего Standard error of the mean	0,56	0,32	0,35	0,06	0,02	0,03	0,62	0,17
Минимальное значение Minimum value	62,51	29,37	22,25	6,82	1,79	0,32	2123,1	507,1
Максимальное значение Maximum value	137,85	64,6	47,96	15,81	3,02	0,82	2649,7	965,2

ТАБЛИЦА 3. КЛЕТОЧНЫЙ СОСТАВ КОНЦЕНТРАТА (n = 1096) ГСК ПУПОВИННОЙ КРОВИ ОБЪЕМОМ 25 мл ДЛЯ ДОЛГОСРОЧНОГО КРИОХРАНЕНИЯ ($\times 10^8/\text{л}$)

TABLE 3. CELLULAR COMPOSITION OF THE CONCENTRATE (n = 1096) CORD BLOOD HSCs WITH A VOLUME OF 25 mL FOR LONG-TERM CRYOPRESERVATION ($\times 10^8/\text{L}$)

	Лейкоциты WBC	Нейтрофилы NEW	Лимфоциты LYM	Моноциты MON	Эозинофилы EOS	Базофилы BAS	Эритроциты RBC	Тромбоциты PLT
Среднее значение Average value	17,41	8,16	6,19	2,34	0,48	0,18	550,1	176,5
Медиана Median	18,05	8,91	7,11	1,99	0,55	0,15	505,2	176,2
Стандартное отклонение Standard deviation	4,44	1,23	2,12	0,52	0,15	0,11	10,1	12,8
Стандартная ошибка среднего Standard error of the mean	0,36	0,42	0,25	0,14	0,03	0,02	0,22	0,17
Минимальное значение Minimum value	12,31	5,71	4,3	1,02	0,31	0,32	490,1	156,4
Максимальное значение Maximum value	37,82	17,76	13,26	4,17	1,02	1,82	675,7	265,2

составляет $1,65 \pm 0,7 \times 10^8$ или $25,9 \pm 0,36\%$ от всех лимфоцитов.

Была исследована гетерогенность популяции натуральных киллерных клеток в концентрате ГСК ПК в пересчете на лейкоциты ($CD45^+CD3^-$): в популяции NK-лимфоцитов было выявлено $21,0 \pm 12,1\%$ $CD3^-/CD16/CD56^+$ антиген-положительных клеток, с фенотипами $CD3^-CD56^+$ и $CD3^-CD16^+$ было, соответственно, $17,69 \pm 8,9$ и $13,53 \pm 6,3\%$ клеток. Анализируя субпопуляционную структуру, выявлено, что NK-клетки представлены в основном пулом $CD56^{dim}CD16^{dim}$ клеток — $45,15 \pm 18,1\%$. При этом минорные субпопуляции $CD56^{dim}/CD16^{bright}$, $CD56^-CD16^+$, $CD56^{bright}/CD16^-$ составили $0,27 \pm 0,2$; $1,33 \pm 0,7$ и $0,99 \pm 0,4\%$ соответственно.

Анализируя популяции $CD45^+CD3^+$ лимфоидных клеток, популяция NKT-клеток с иммунофенотипом $CD3^+CD16/CD56^+$ выявляется в $6,22 \pm 2,1\%$ антиген-положительных клеток, количество $CD3^+CD56^+$ клеток составило $3,69 \pm 2,4\%$, количество $CD3^+CD16^+$ — $2,53 \pm 1,2\%$. В пуле NKT-клеток выявлены $CD56^+CD16^-$ клетки, количество которых $5,15 \pm 2,1\%$ среди $CD3^+$ лимфоцитов. При этом определены две минорные субпопуляции, которые отличаются по экспрессии антигенов CD56 и CD16: уровень $CD56^-CD16^+$ составил $2,91 \pm 1,2\%$, а $CD56^+CD16^+$ оказалось равным $0,69 \pm 0,3\%$.

В результате проведенных исследований была получена характеристика клеточного состава, а также иммунологическая характеристика клеток в концентрате ГСК пуповинной крови, заготовленного для долгосрочного хранения для целей трансплантаций онкогематологическим пациентам.

Количество лейкоцитов, ГСК является важной характеристикой концентрата ГСК ПК, находящегося в международной поисковой донорской базе для подбора реципиентам ГСК по степени HLA-совместимости. Чем больше лейкоцитов и ГСК в концентрате ПК, тем выше вероятность подбора образца для целей трансплантации. В Самарском банке пуповинной крови образцы ПК с содержанием в образце менее 15×10^8 лейкоцитов в пересчете на объем заготовленного образца ПК до обработки с антикоагулянт подвераются утилизации, при этом на долгосрочное криохраниение закладываются только концентрат ГСК ПК с высокой клеточностью: с количеством ГСК $CD34^+$ не менее $1,0 \times 10^6$, при этом в концентрате ГСК ПК среднее количество $CD34^+$ составляет $5,3 \pm 3,6 \times 10^6$ в образце, среднее количество лейкоцитов $17,41 \pm 0,76 \times 10^8$ в образце.

Полученные данные по общему количеству лейкоцитов в концентрате ГСК ПК без пересчета на объем, хранящегося образца, значимо

отличаются от данных Банка стволовых клеток департамента здравоохранения г.Москвы [4]: $72,57 \pm 0,56 \times 10^9/\text{л}$ против $39,00 \pm 0,48 \times 10^9/\text{л}$, соответственно значимая разница и по количеству популяций лейкоцитов. В нашем исследовании количество нейтрофилов в концентрате ГСК ПК: $35,51 \pm 0,56 \times 10^9/\text{л}$ против $18,30 \pm 0,32 \times 10^9/\text{л}$ и лимфоцитов в концентрате: $25,83 \pm 0,56 \times 10^9/\text{л}$ против $13,10 \pm 0,35 \times 10^9/\text{л}$ соответственно [4].

Выявленные значимые различия в содержании лейкоцитарного пула в концентрате ГСК ПК объясняются разными критериями, установленным к обработке образцов ПК в банках, а также % выхода (сохранения) лейкоцитов после процессинга. В Самарском банке образцы ПК с низким содержанием лейкоцитов не подвергаются процессингу. Минимальное значение лейкоцитов в нашем исследовании до процессинга ПК в образце $10,91 \times 10^9/\text{л}$ против $5,83 \times 10^9/\text{л}$, поэтому образцы ПК, заложенные на долгосрочное криохраниение, отличаются высоким содержанием в концентрате ГСК ПК $CD34^+$ клеток: $5,25 \pm 3,6 \times 10^6$ в образце, что составляет $0,210 \times 10^3/\text{мм}^3$.

Для реализации эффекта трансплантат против лейкоза свою решающую роль играют натуральные киллеры [3, 9, 14]. Поэтому иммунологическая характеристика концентрата ГСК ПК также является важной. В целом пуповинная кровь по данным авторов хорошо охарактеризована [3, 4, 11, 12]. Иммунологическая характеристика концентрата ГСК ПК, полученная в ходе исследования, согласуется с данными Румянцев С.А. [4], а также зарубежными авторами [4, 10, 15].

Изучая субпопуляционную структуру NK-лимфоцитов в концентрате ПК выявлено, что иммунофенотип $CD56^{dim}CD16^{dim}$ клеток встречался в большинстве случаев — $45,15 \pm 18,1\%$, а минорные субпопуляции $CD56^{dim}CD16^{bright}$, $CD56^-CD16^+$, $CD56^{bright}CD16^-$ составили $0,27 \pm 0,2$; $1,33 \pm 0,7$ и $0,99 \pm 0,4\%$ соответственно. Полученные данные согласуются с результатами, опубликованными Табаковым Д.В. [6], где также выявлено, что основной пул NK-клеток у взрослых доноров составили клетки с иммунофенотипом $CD56^{dim}CD16^{dim}$ — $52,3 \pm 19,9\%$, и аналогичные показатели минорных субпопуляций NK-клеток [11, 15].

В нашем исследовании показано, что популяция NKT-клеток в концентрате ГСК ПК с иммунофенотипом $CD3^+CD16/CD56^+$ выявляется в $6,22 \pm 2,1\%$ от лимфоцитов, исследование субпопуляционной структуры NKT-лимфоцитов в концентрате ГСК ПК аналогичны данным, полученным Табаковым Д.В. [6] и другими исследователями [1, 15].

Заключение

Таким образом, мы представили характеристику лейкоцитарного пула, включая иммунофенотип клеток в концентрате ГСК ПК, заготавливаемых в государственном банке ПК для целей трансплантаций. Для повышения востребованности образцов ГСК ПК важно заготавливать образцы ПК с высоким содержанием лейкоцитов, ГСК с иммунофенотипом CD34⁺ и натуральных киллерных клеток (CD3⁺CD16⁺CD56⁺).

При применении критерия обработки образцов ПК с количеством лейкоцитов не менее 15×10^8 лейкоцитов в пересчете на объем заготовленного образца ПК до обработки с антикоагулянтом среднее количество клеток в концентрате ГСК ПК объемом 25 мл, находящегося на долгосрочном криохраниении составляет: лейкоцитов – $17,41 \pm 0,36 \times 10^8$, ГСК с иммунофенотипом (CD34⁺) – $5,25 \pm 3,6 \times 10^6$, натуральных киллерных клеток (CD3⁺CD16⁺CD56⁺) – $1,65 \pm 0,7 \times 10^8$.

Полученные данные о количестве и характеристике иммунофенотипа клеток, а также гетерогенности популяции NK- и NKT-лимфоцитов в концентрате ГСК ПК, заложенных на долгосрочное криохраниении, необходимо учитывать для подбора концентрата ГСК ПК с целью трансплантации при онкогематологических заболеваниях.

Вклад авторов

Написание текста статьи, концепция и дизайн иммунологического исследования, анализ полученных данных – Тюмина О.В., проведение иммунологического исследования – Труслова Л.М., сбор биологического материала, процессинг, анализ лабораторных данных – Овчинников П.А., сбор и анализ литературных источников, статистическая обработка материала – Тюмин И.В., сбор и анализ данных, концепция исследования, редактирование текста статьи – Давыдкин И.Л.

Список литературы / References

1. Абакушина Е.В. Метод проточной цитометрии для оценки NK-клеток и их активности // Клиническая лабораторная диагностика, 2015. № 11. С. 37-44. [Abakushina E.V. Flow cytometry method for assessing NK cells and their activity. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika = Russian Clinical Laboratory Diagnostics*, 2015, Vol. 11, no. 37-44. (In Russ.)]
2. Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации от 25 июля 2003 г. № 325 «О развитии клеточных технологий». [Order of the Ministry of Health of the Russian Federation dated July 25, 2003 No. 325 "On the development of cell technologies"].
3. Ремизова И.И., Чистякова Г.Н., Ляпунов В.А., Черешнев В.А., Устьянцева Л.С., Газиева И.А. Особенности фенотипического состава и функциональной активности иммунокомпетентных клеток пуповинной крови в зависимости от гестационного возраста // Медицинская иммунология, 2016. Т. 18, № 3. С. 291-298. [Remizova I.I., Chistyakova G.N., Lyapunov V.A., Chereshev V.A., Ustyantseva L.S., Gazieva I.A. Features of the phenotypic composition and functional activity of umbilical cord blood immunocompetent cells depending on gestational age. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2016, Vol. 18, no. 3, pp. 291-298. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2016-3-291-298.
4. Румянцев С.А., Боякова Е.В., Шутьева А.Б., Майорова О.А., Панков Д.Д., Сахаровская Е.Л. Состав лейкоцитарного пула и гемопоэтических стволовых клеток пуповинной крови доношенных новорожденных // АГ-инфо, 2011. № 2. С. 6-11. [Rumyantsev S.A., Boyakova E.V., Shutieva A.B., Mayorova O.A., Pankov D.D., Sakharovskaya E.L. Composition of the leukocyte pool and hematopoietic stem cells cord blood of full-term newborns. *AG-info = AG-info*, 2011, no. 2, pp. 6-11. (In Russ.)]
5. РУСКОРД. Ассоциация Рускорд открывает новую веху стандартизации для банков пуповинной крови в России. [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://ruscord.com/bez-kategorii/assocziacziya-ruskord-otkryvaet-novuyu-vehu-standartizaczii-dlya-bankov-pupovinnnoj-krovi-v-rossii/> [RUSCORD. Ruscord Association opens a new standardization milestone for cord blood banks in Russia. [Electronic resource]. Access mode: <https://ruscord.com/bez-kategorii/assocziacziya-ruskord-otkryvaet-novuyu-vehu-standartizaczii-dlya-bankov-pupovinnnoj-krovi-v-rossii/>].
6. Табаков Д.В., Заботина Т.Н., Борунова А.А., Панчук И.О., Короткова О.В., Кадагидзе З.Г. Гетерогенность популяций NK- и NKT-лимфоцитов у здоровых доноров // Медицинская иммунология, 2017. Т. 19, № 4. С. 401-408. [Tabakov D.V., Zabolina T.N., Borunova A.A., Panchuk I.O., Korotkova O.V., Kadagidze Z.G. Heterogeneity of NK and NKT lymphocyte populations in healthy donors. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2017, Vol. 19, no. 4, pp. 401-408. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2017-4-401-408.
7. Тюмина О.В., Волчков С.Е., Овчинников П.А. Применение гемопоэтических стволовых клеток пуповинной крови // Гены и Клетки, 2019. Т. 14, № 3. С. 236-237. [Tyumina O.V., Volchikov S.E., Ovchinnikov P.A. Application of cord blood hematopoietic stem cells. *Geny i Kletki = Genes and Cells*, 2019, Vol. 14, no. 3, pp. 236-237. (In Russ.)]
8. Abu-Ghosh A., Goldman S., Slone V., van de Ven C., Suen Y., Murphy L., Sender L., Cairo M. Immunological reconstitution and correlation of circulating serum inflammatory mediators/ cytokines with the incidence of acute

graft-versus-host disease during the first 100 days following unrelated umbilical cord blood transplantation. *Bone Marrow Transplant.*, 1999, Vol. 24, pp. 535-544.

9. Barker J.N., Wagner J.E. Umbilical-cord blood transplantation for the treatment of cancer. *Nat. Rev. Cancer*, 2003, Vol. 3, pp. 526-532.

10. Biron C.A., Nguyen K.B., Pien G.C., Cousens L.P., Salazar-Mather T.P. Natural killer cells in antiviral defense: function and regulation by innate cytokines. *Annu. Rev. Immunol.*, 1999, Vol. 17, pp. 189-220.

11. Dalle J.H., Menezes J., Wagner E., Blagdon M., Champagne J., Champagne M.A., Duval M. Characterization of cord blood natural killer cells: implications for transplantation and neonatal infections. *Pediatr. Res.*, 2005, Vol. 57, pp. 649-655.

12. Damele L., Spaggiari G.M., Parodi M., Mingari M.C., Vitale M., Vitale C. Cord blood-derived natural killer cell exploitation in immunotherapy protocols: more than a promise? *Cancers*, 2022, Vol. 14, 4439. doi: 10.3390/cancers14184439.

13. Eapen M., Rubinstein P., Zhang M.-J., Stevens C., Kurtzberg J., Scaradavou A., Loberiza F.R., Champlin R.E., Klein J.P., Horowitz M.M., Wagner J.E. Outcomes of transplantation of unrelated donor umbilical cord blood and bone marrow in children with acute leukaemia: a comparison study. *Lancet*, 2007, Vol. 369, pp. 1947-1954.

14. Escobedo-Cousin M., Jackson N., Laza-Briviesca R., Ariza-McNaughton L., Luevano M., Derniame S., Querol S., Blundell M., Thrasher A., Soria B., Cooper N., Bonnet D., Madrigal A., Saudemont A. Natural killer cells improve hematopoietic stem cell engraftment by increasing stem cell clonogenicity in vitro and in a humanized mouse model. *PLoS One*, 2015, Vol. 10, e0138623. doi: 10.1371/journal.pone.0138623.

15. Verneris M.R., Mille J.S. The phenotypic and functional characteristics of umbilical cord blood and peripheral blood natural killer cell. *Br. J. Haematol.*, 2009, Vol. 147, no. 2, pp. 185-191.

Авторы:

Тюмина О.В. — д.м.н., директор ГБУЗ «Самарский областной медицинский центр «Династия»; профессор кафедры госпитальной терапии ФГБОУ ВО «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Самара, Россия

Овчинников П.А. — заведующий отделением заготовки крови и ее компонентов ГБУЗ «Самарский областной медицинский центр «Династия», г. Самара, Россия

Трусова Л.М. — заведующая лабораторией иммунологического типирования ГБУЗ «Самарский областной медицинский центр «Династия», г. Самара, Россия

Тюмин И.В. — аспирант отделения клинической иммунологии, Медицинский радиологический научный центр имени А.Ф. Цыба — филиал ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Министерства здравоохранения РФ, г. Обнинск; врач-онколог ГБУЗ «Самарский областной медицинский центр «Династия», г. Самара, Россия

Давыдкин И.Л. — д.м.н., профессор, заведующий кафедрой и клиникой госпитальной терапии с курсом поликлинической терапии и трансфузиологии, проректор по научной работе ФГБОУ ВО «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Самара, Россия

Authors:

Tyumina O.V., PhD, MD (Medicine), Director, Samara Regional Dynasty Medical Center; Professor, Department of Hospital Therapy, Samara State Medical University, Samara, Russian Federation

Ovchinnikov P.A., Head, Department of Blood Banking, Samara Regional Dynasty Medical Center, Samara, Russian Federation

Trusova L.M., Head, Department of Immunology, Samara Regional Dynasty Medical Center, Samara, Russian Federation

Tyumin I.V., Postgraduate Student, Department of Clinical Immunology, A. Tsyb Medical Radiological Research Center, Branch of National Medical Research Center of Radiology, Obninsk; Oncologist, Samara Regional Dynasty Medical Center, Samara, Russian Federation

Davydkin I.L., PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Department of Hospital Therapy with Transfusiology, Vice-Rector for Research, Samara State Medical University, Samara, Russian Federation

Поступила 11.08.2023

Отправлена на доработку 04.10.2023

Принята к печати 05.10.2023

Received 11.08.2023

Revision received 04.10.2023

Accepted 05.10.2023