

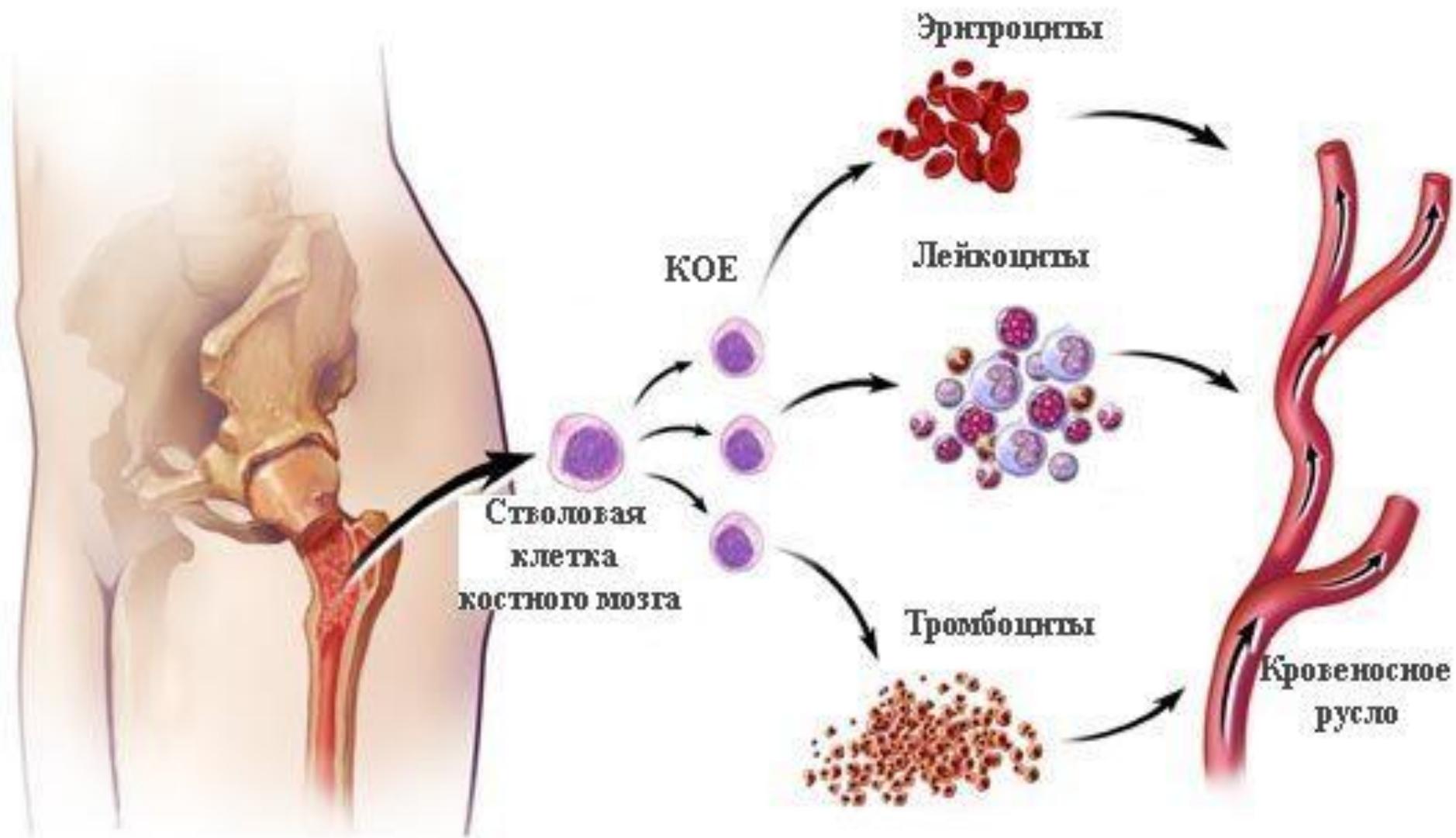
***оценка транспланта и  
криоконсервирование  
стволовых  
гемопоэтических клеток***

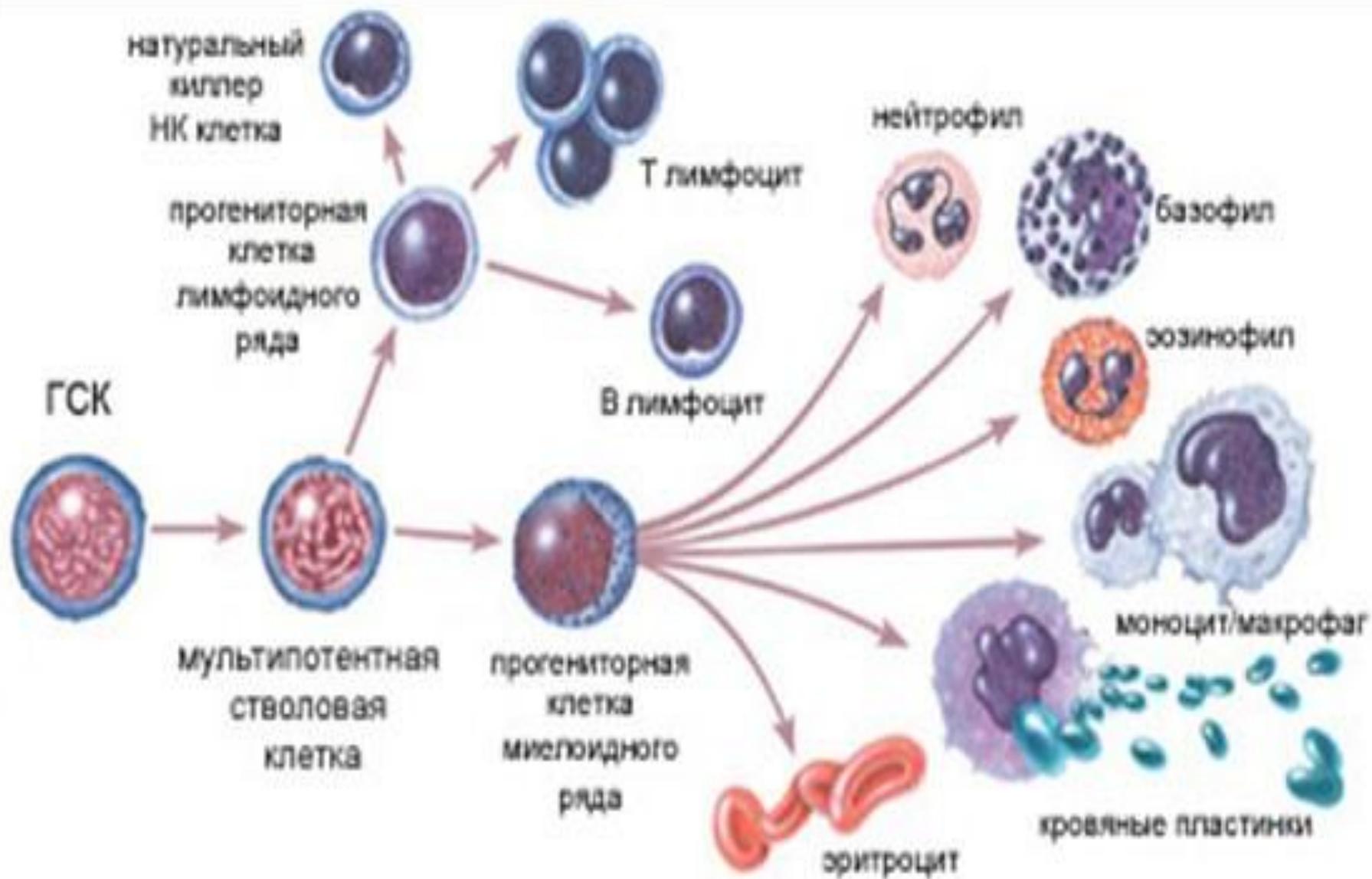
## Александр Александрович Максимов (1874-1928)



1909 год: «Лимфоцит как общая стволовая клетка разнообразных элементов крови в эмбриональном развитии и постфетальной жизни млекопитающих»

*Der Lymphozyt als gemeinsame Stammzelle der verschiedenen Blutelemente in der embryonalen Entwicklung und im postfetalen Leben der Säugetiere. Folia Haematologica 8.1909, 125-134. — Leipzig, Klinghardt, 1909).*





- Конец XIX в Brown-Sequard и d'Arsonaval
- 1939 г публикация о лечении апластической анемии
- 1950-е гг Jacobson, Lorenz эксперименты на животных
- 1959 г Впервые приживление трансплантата **Dr.T.Thomas**
- 1970-е гг значение гистосовместимости  
Robert Good – первая успешная трансплантация КМ от родственного донора( сиблинга) на основании подбора по HLA- системе
- Конец 1990-х гг ок.40 000 ТКМ по всему миру

# *Источники гемопоэтических клеток*

*Костный мозг  
(КМ)*



*Пуповинная кровь  
(ПК)*



*Стволовые клетки  
периферической крови  
(СКПК)*



# **трансплантация стволовых гемопоэтических клеток**

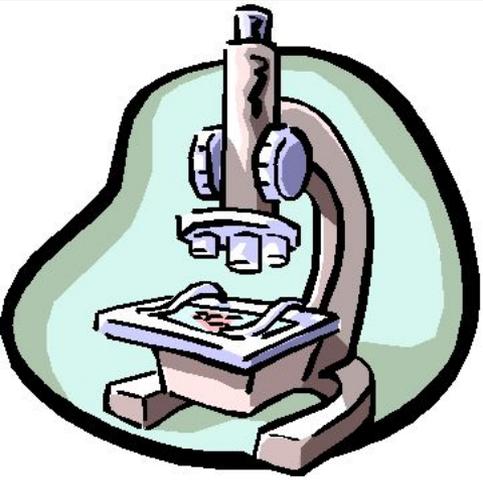
**аутологичная**

**аллогенная**

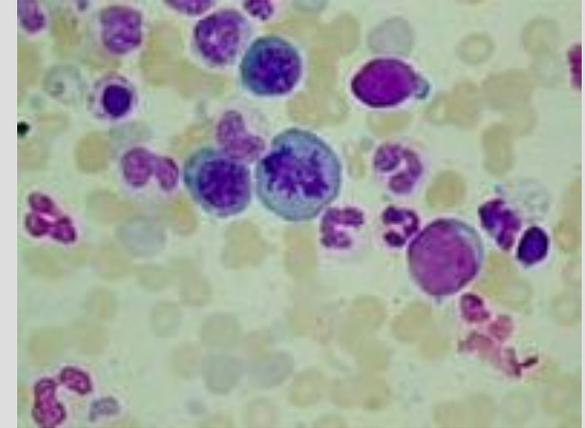
**КМ, СКПК**

**КМ, СКПК,  
ПК**

# Методы оценки



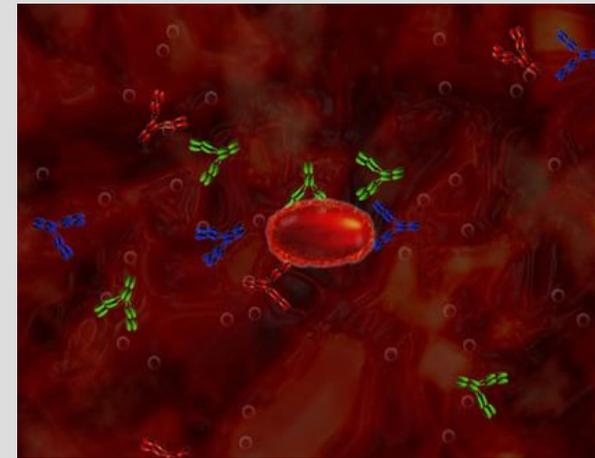
*Микроскопический*



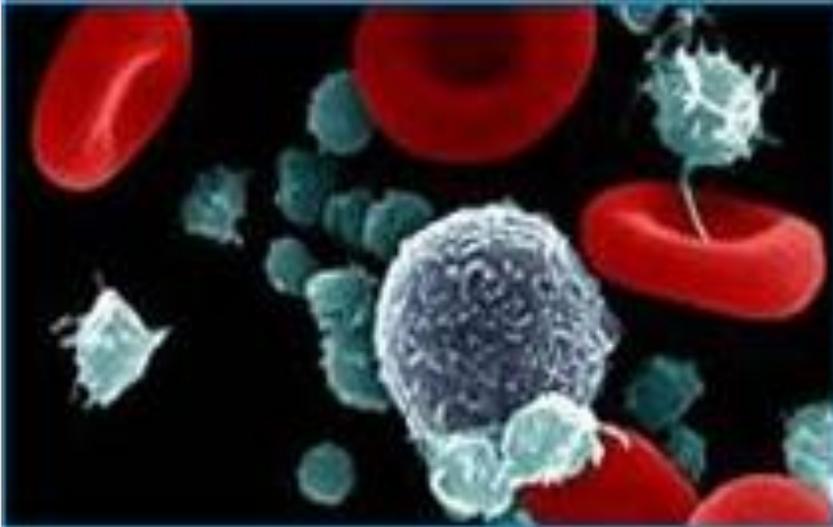
*Культуральный*



*Иммунологический*



**Основная цель оценки трансплантата –  
определение *количества* и *качества*  
гемопоэтических клеток**



***экспрессирует CD34***

***формирует колонии в  
полутвердой среде  
(CFU-GM)***

# ***Параметры оценки***

***концентрация и количество  
ЯСК***

***количество CD34+***

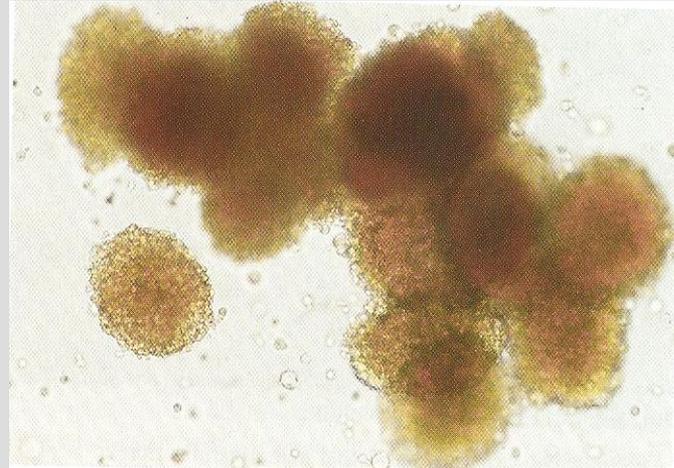
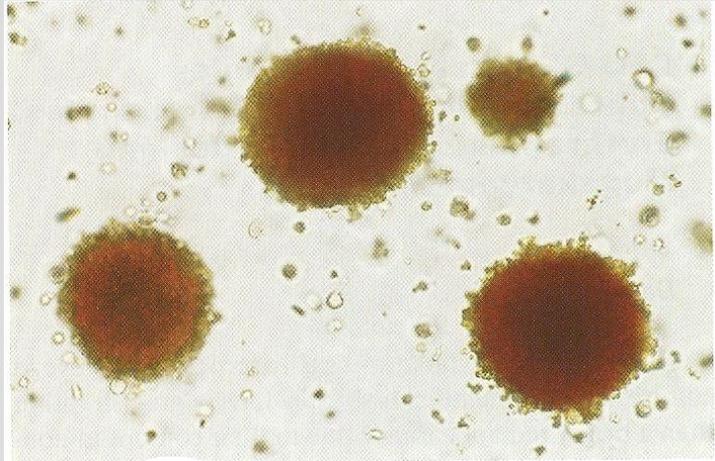
***число CFU-GM***

# Культивирование

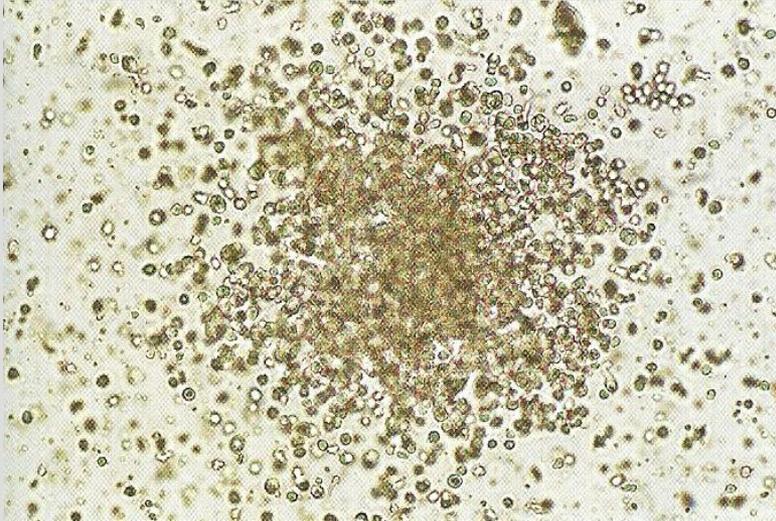




# **БОЕ-ЭР**



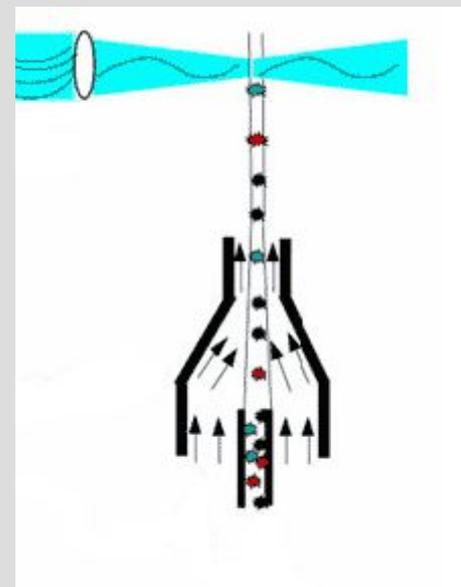
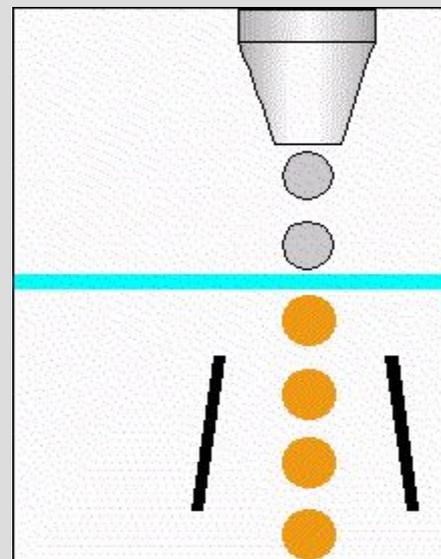
# ***ΚΟΕ-ΓΜ***



# Иммунологический метод



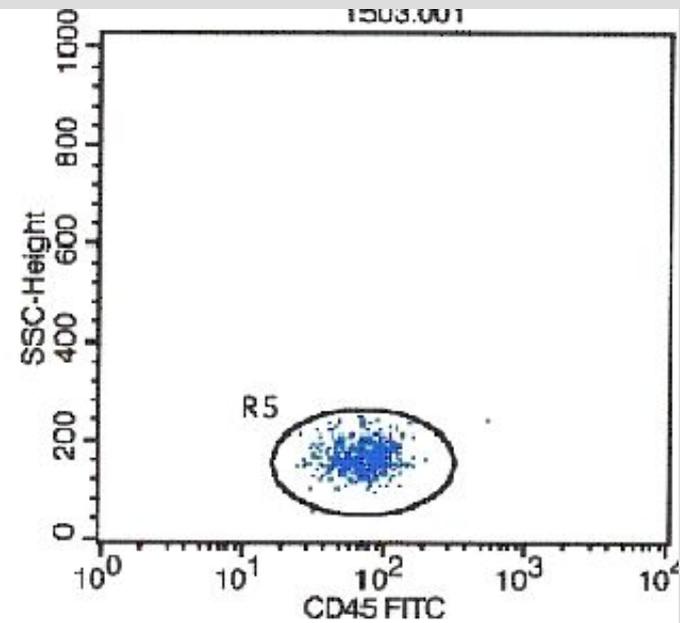
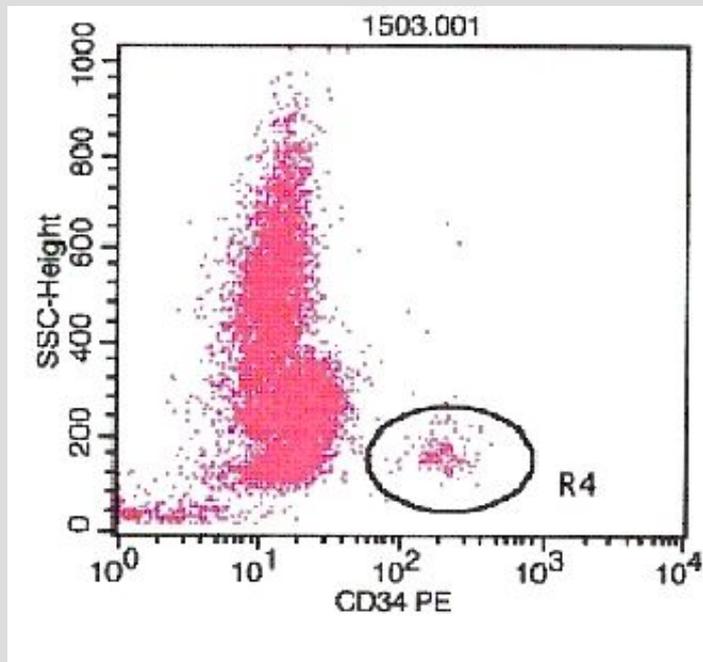
***BD FACSCalibur***



# CD 34+

✦ мембранный маркер

✦ характеризует иммунофенотип



# Дополнительный параметр оценки ГСК

активность  
АЛДГ



*NAD-содержащий цитоплазматический фермент*

- окисляет альдегиды и *N*-гетероциклические субстраты.
- участвует в промежуточных этапах метаболизма катехоламинов и витамина А

**обеспечивает устойчивость к циклофосфамидам**

- 1980-е гг. Kohn FR, Sladek NE Biochem. Pharmacol., 1985. 34: 3465-71

*Aldehyde dehydrogenase activity as the basis for the relative insensitivity of murine pluripotent hematopoietic stem cells to oxazaphosphorines*

АЛДГ обеспечивает резистентность клеток к циклофосфамидам

- 1990-е гг. .Kastan M.B. et al. Blood, 1990. 75: 1947-50

*Direct demonstration of elevated aldehyde dehydrogenase in human hematopoietic progenitor cells.*

повышенный уровень АЛДГ в гемопоэтических клетках человека.

1995 г Jones RJ, Barber JP et al. Blood. 1995 May 15;85(10):2742-6

*Assessment of aldehyde dehydrogenase in viable cells.*

методика определения АДГ в живых клетках.

2005 г Lioznov M, Freiburger P, Kröger N, Zander AR, Fehse B. Bone Marrow Transplant., 2005;35(9)909-14

ALDH activity as a marker for the quality of hematopoietic stem cell transplants

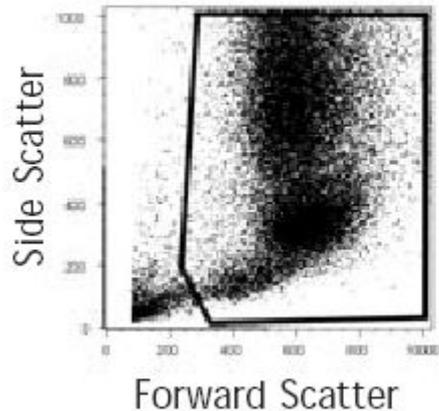
# Оценка альдегиддегидрогеназной активности

## Aldefluor – принцип метода

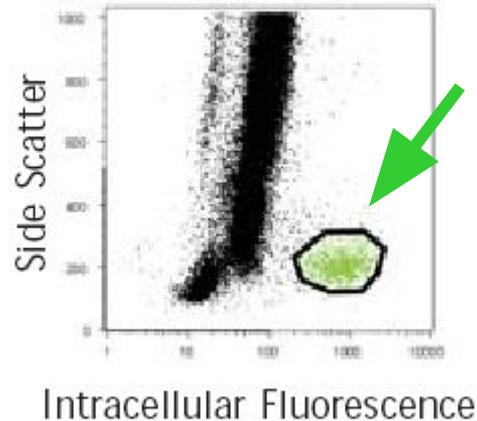
ALDH конвертирует субстрат BAAA (Bodipy™ – aminoacetaldehyde) во флюоресцирующий продукт BAA (Bodipy™ – aminoacetate), флюоресценция регистрируется при помощи цитометра, таким образом, клетки могут быть идентифицированы, количественно определены и сортированы.



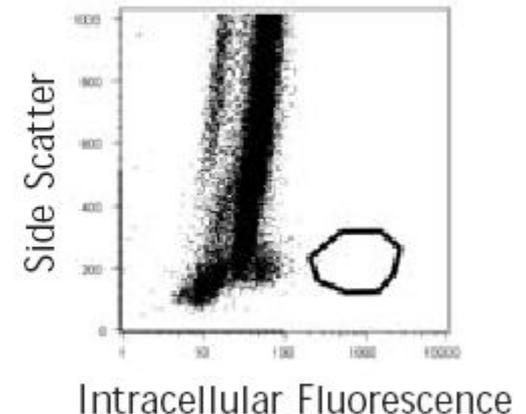
Live cell gate (based on scatter)



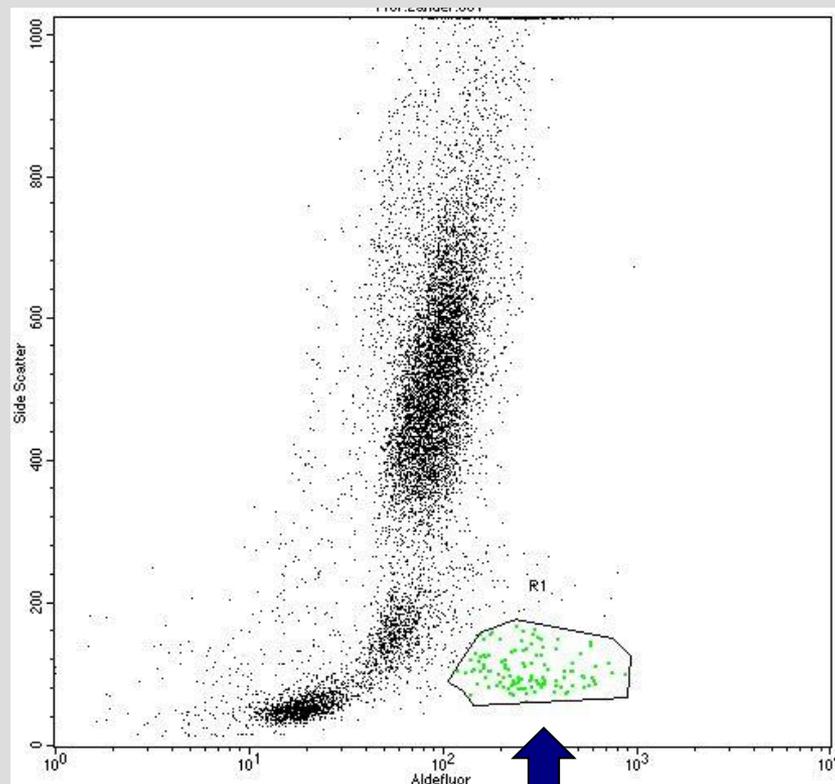
ALDEFLUOR



ALDEFLUOR + ALDH enzyme inhibitor (negative control)



# в проточной цитометрии



$SSC^{lo} ALDH^{br}$

***Lioznov M, Freiburger P, Kröger N, Zander AR, Fehse B. Bone Marrow Transplant., 2005; 35(9) 909-14***

***ALDH activity as a marker for the quality of hematopoietic stem cell transplants***

Возможность хранения гемопоэтических клеток костного  
мозга при комнатной температуре

(max 72 ч)

Обязательное хранение гемопоэтических клеток  
периферической крови при t +4<sup>0</sup> С +8<sup>0</sup>С

(max 72 ч)

## АУТОЛОГИЧНАЯ ТРАНСПЛАНТАЦИЯ

106 / кг	CD34+	>	2,0x
104 / кг	CFU-GM	>	10,0x
106 / кг	ALDH	>	2,0x

## АЛЛОГЕННАЯ ТРАНСПЛАНТАЦИЯ

106 / кг	CD34+	>	5,0x
104 / кг	CFU-GM	>	10,0x
106 / кг	ALDH	>	5,0x

**КОЕ-ГМ**

**АЛДГ**

**ЯСК**

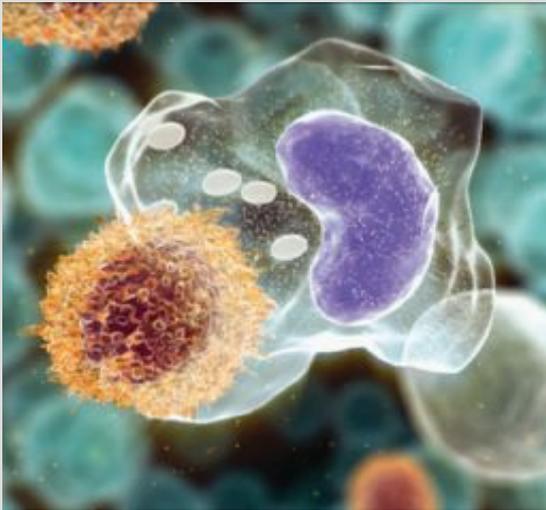


**CD3+**

**CD34+**

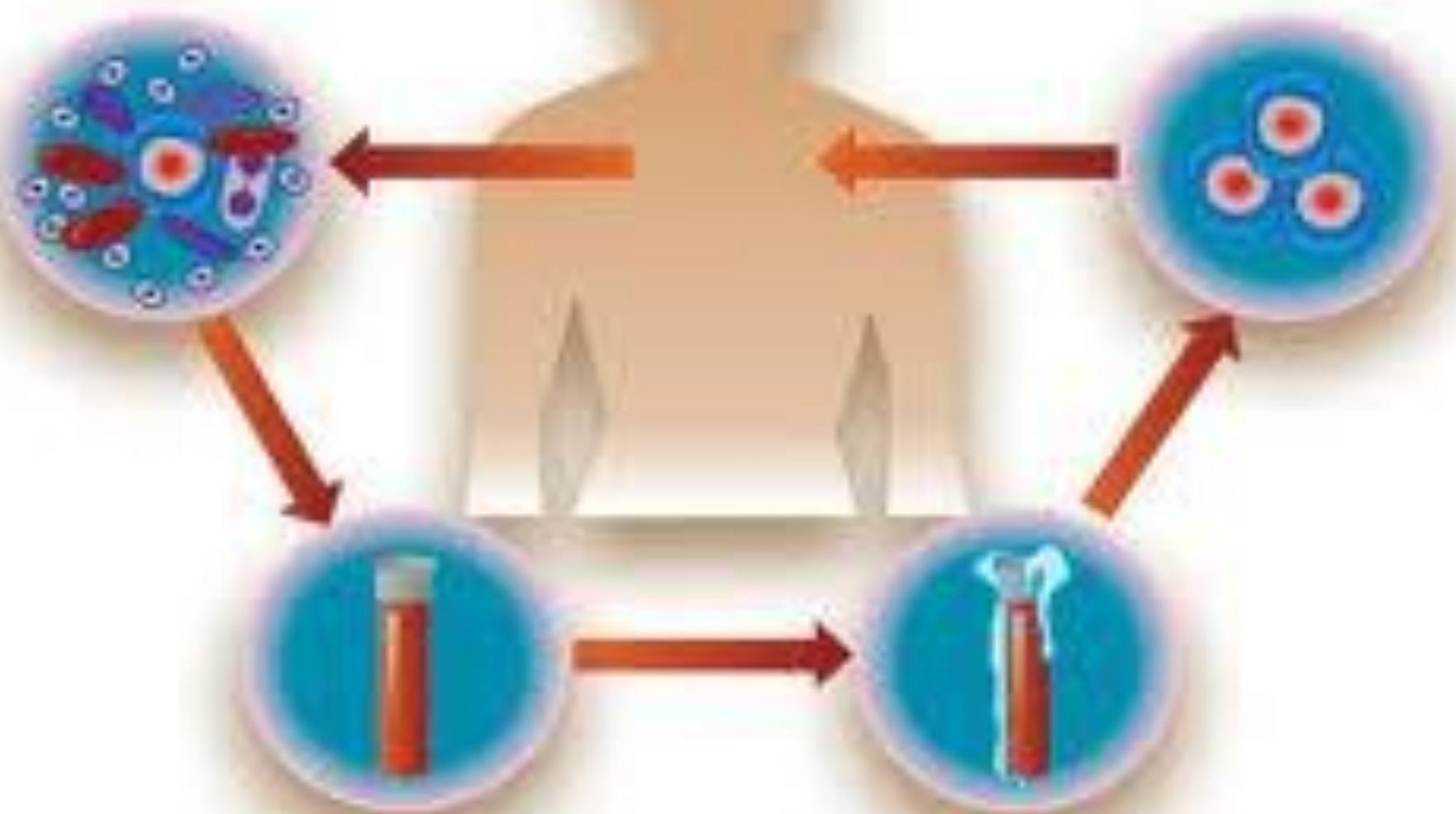
**Криобиология** – (греч. κρύος+ *bios* + *logos* )  
раздел биологии, в котором изучаются  
эффекты воздействия низких температур на  
живые организмы

**Криоконсервация**- низкотемпературное хранение  
**ЖИВЫХ**  
биологических объектов с возможностью  
восстановления  
их биологических функций после размораживания



Collection

Reinfusion



Processing

Cryopreservation

# ***повреждающие факторы***



***формирование  
внутриклеточного льда***



***обезвоживание***

## ***цель криоконсервирования***

***достичь внутриклеточной  
витрификации, не допуская  
образования внутриклеточного  
льда***



# ***криопротекторы***

вещества, защищающие живые объекты от повреждающего действия замораживания.

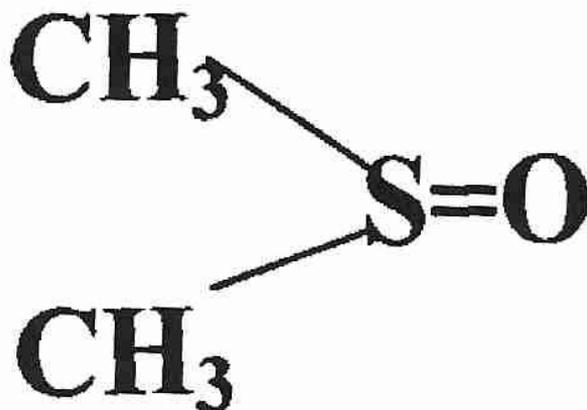
***проникающие***

***глицерин***  
***пропиленгликоль***  
***этиленгликоль***  
***диметилсульфоксид***

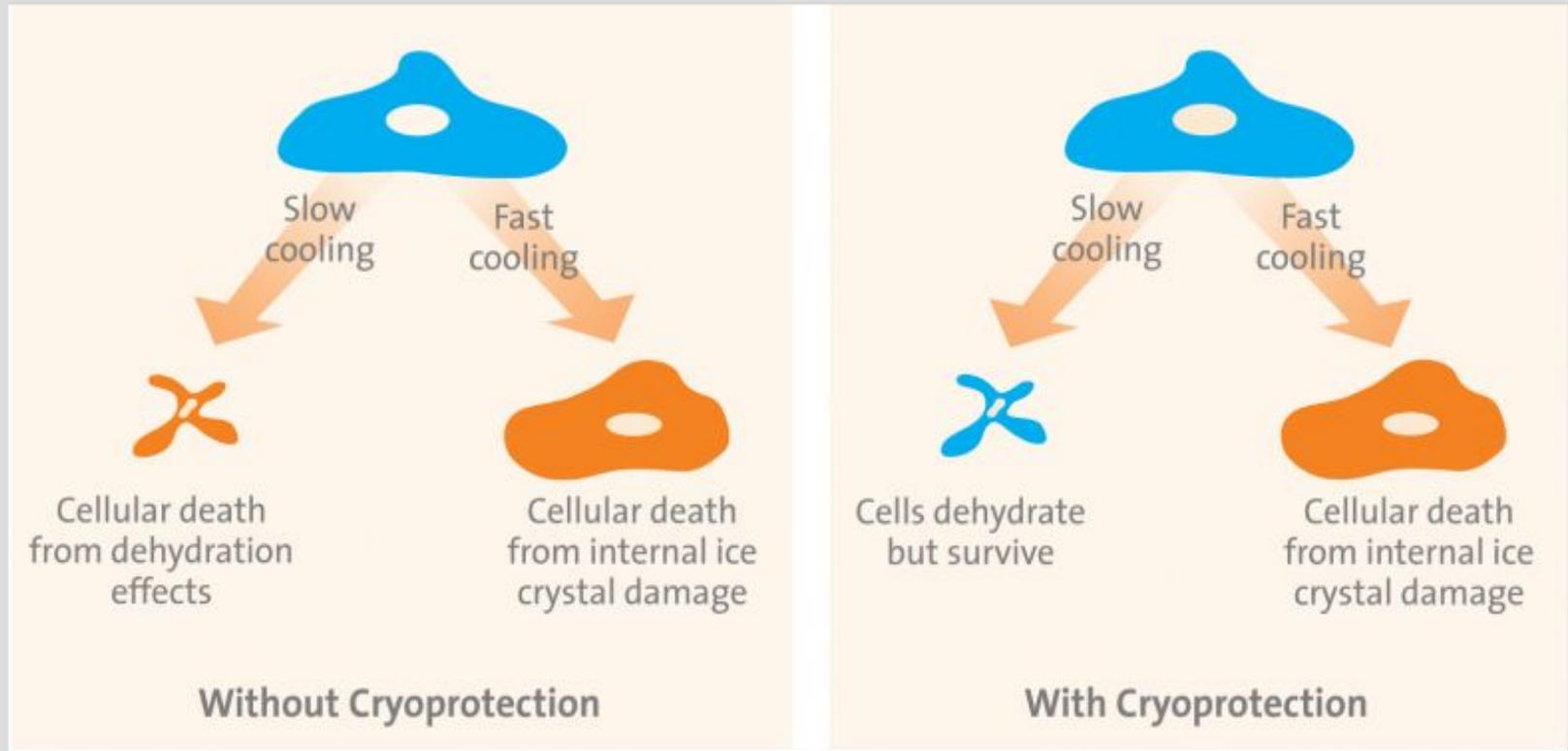
***непроникающие***

***сахароза***  
***трегалоза***

*Диметилсульфоксид (ДМСО) — (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO.*



dimethylsulfoxide (DMSO)



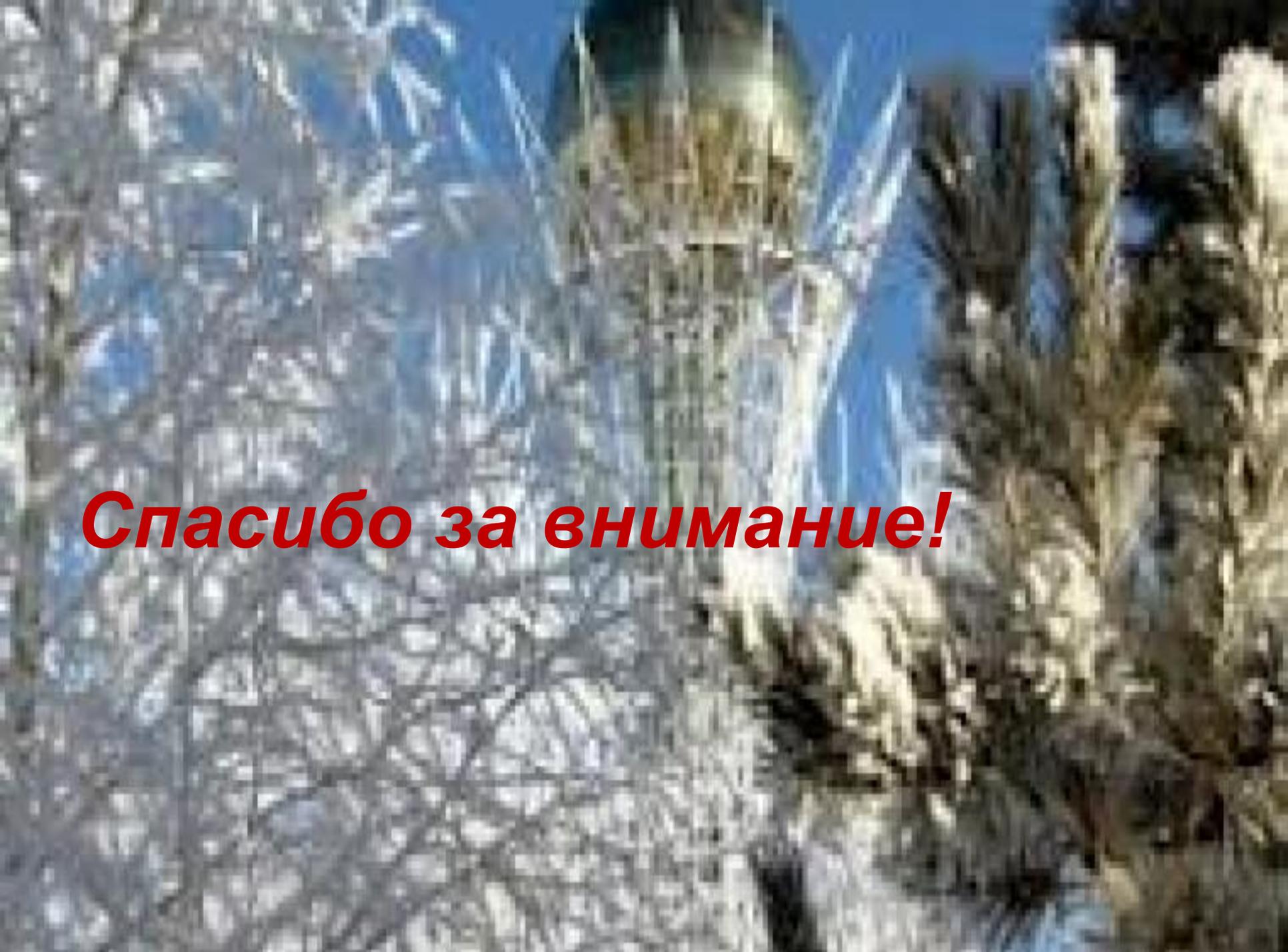
**Figure 1.** Effects of Freezing Rates on Cells

## *рекомендации по криоконсервированию*

**! один трансплантат- два  
криоконтейнера**

**! концентрация ЯСК  $\leq 300 \times 10^6$  / мл**

**! объем замораживаемой взвеси  
зависит от пациента**

An aerial photograph of a city, likely in the Alps, showing a winding river through a valley. The city is built on a hillside, and the background features snow-capped mountains under a clear blue sky. The text "Спасибо за внимание!" is overlaid in red, italicized font across the middle of the image.

***Спасибо за внимание!***