

**Федеральное медико-биологическое агентство  
Федеральное государственное бюджетное учреждение  
«Российский научно-исследовательский институт гематологии и  
трансфузиологии Федерального медико-биологического агентства»**

**Метод криоконсервации гемопоэтических стволовых клеток  
для аутологичной трансплантации**

Методические рекомендации

Рег. № 14-2015

Санкт-Петербург  
2015

Настоящие методические рекомендации предназначены для использования метода криоконсервации гемопоэтических стволовых клеток в ходе проведения аутологичной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток при лечении опухолевых заболеваний кроветворной и лимфатической ткани. В них содержатся основные требования к проведению криоконсервации гемопоэтических стволовых клеток. Приведена методика проведения криоконсервации гемопоэтических стволовых клеток.

Предназначены для врачей трансфузиологов, гематологов, онкологов, трансплантологов.

Область применения: трансфузиология, гематология, трансплантология.

Авторы: С.В. Грицаев, С.С. Бессмельцев, С.А. Пономарев, В.И. Рабинович, Е.В. Коротаев, А.А. Степанов

Рецензенты: доктор медицинских наук А.А. Ганапиев

доктор медицинских наук, профессор О.А. Рукавицын

Организация-разработчик: Федеральное государственное бюджетное учреждение «Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии Федерального медико-биологического агентства»;

Учреждение – соисполнитель: Автономное учреждение Ханты-Мансийского автономного округа – Югры «Югорский научно-исследовательский институт клеточных технологий с банком стволовых клеток»

Утверждены заместителем руководителя Федерального медико-биологического агентства Е.Ю. Хавкиной 27.02.2015, Рег.№14-2015

## Содержание

Введение	4
Обозначения и сокращения	6
Нормативные ссылки	7
Основные нормативные положения	8
1 Современное представление о криоконсервации ГСК	8
1.1 Общие принципы криоконсервации	8
1.2 Криопротекторы	9
1.3 Методы криоконсервации	12
1.4 Криопакеты	14
1.5 Лабораторный контроль качества	16
1.6 Принципиальные технологические и организационные требования к проведению криоконсервации ГСК	18
2 Методические принципы криоконсервации ГСК	23
2.1 Общая этапная схема проведения криоконсервации ГСК	23
2.2 Методика криоконсервации ГСК	25
2.2.1 Методика подготовки к замораживанию ГСК	25
2.2.2 Методика замораживания ГСК	30
Заключение	34
Приложение А (рекомендуемое) Перечень оборудования и расходных материалов для регистратуры. Требования к персоналу	35
Приложение Б (рекомендуемое) Перечень оборудования и расходных материалов для лабораторий гематологической и культивирования. Требования к персоналу	36
Приложение В (рекомендуемое) Перечень оборудования и расходных материалов для асептического помещения. Требования к персоналу	37
Приложение Г (рекомендуемое) Перечень оборудования и расходных материалов для криохранилища. Требования к персоналу	38
Библиография	39

## Введение

Несколько десятилетий для лечения онкогематологических заболеваний широко применяют высокодозную химиотерапию (ВДХТ) с трансплантацией гемопоэтических стволовых клеток (ТГСК). Трансплантация гемопоэтических стволовых клеток является высокоспециализированным методом лечения, который предполагает инфузию гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) с целью предупреждения длительного периода цитопении, во время которого существует высокая вероятность развития тяжелых осложнений. Основными источниками ГСК для трансплантации являются костный мозг, мобилизованные гемопоэтические стволовые клетки периферической крови и пуповинная кровь. По данным отчета Европейской группы трансплантации клеток крови и костного мозга в 2011 году в Европе было выполнено 32075 трансплантаций. Из них 58% составила аутологичная трансплантация гемопоэтических стволовых клеток (АутоТГСК), соответственно 42% – аллогенные ТГСК. В России на сегодняшний день АутоТГСК составляют около 90% от всех ТГСК. Причиной преимущественного применения АутоТГСК является проблема подбора гистосовместимого донора для аллогенной ТГСК.

Одним из главных критериев успеха проведения АутоТГСК является количество и функциональное состояние ГСК, предварительно заготовленных у пациента и в последующем ему трансплантированных. При этом основным негативным фактором, влияющим на количество и функциональное состояние заготовленных ГСК, является их замораживание на срок проведения ВДХТ. Считается, что при замораживании большая часть повреждений ГСК связана с образованием внутриклеточных кристаллов льда. В тоже время, криопротектор, применяемый для того, чтобы предупредить и уменьшить повреждение клеток во время замораживания, при смешивании с ГСК может разрушать их. Следовательно, доза ГСК для трансплантации после размораживания может оказаться существенно ниже заготовленной. Снижение дозы трансплантированных ГСК может сопровождаться существенным удлинением периода восстановления кроветворения, что ведет к развитию тяжелых инфекционных и геморрагических осложнений, нередко приводящих к летальному исходу. Поэтому, одним из условий эффективной АутоТГСК является лабораторный контроль количества и функциональных свойств ГСК на этапах их заготовки, криоконсервации и трансплантации пациенту. Выбор оптимальной скорости замораживания трансплантационного материала и соблюдение условий работы с криопротектором нивелируют отрицательное воздействие криоконсервации на ГСК.

Представленные рекомендации обобщают опыт криоконсервации более 500 образцов лейкоконцентрата ГСК в Автономном учреждении Ханты-Мансийского автономного округа – Югры

«Югорский научно-исследовательский институт клеточных технологий с банком стволовых клеток» при осуществлении 64 операций АутоТГСК.

## Обозначения и сокращения

АутоТГСК	– аутологичная трансплантация гемопоэтических стволовых клеток
ВДХТ	– высокодозная химиотерапия
ГМБТОЭМ	– гексаметиленбистетраоксиэтилмочевина
ГСК	– гемопоэтические стволовые клетки
ДМАЦ	– диметилацетамид
ДМСО	– диметилсульфоксид
КОЕ-ГМ	– колониеобразующая единица грануломоноцитопоза
ПВП	– поливинилпирролидон
ПЭО	– полиэтиленоксид
ТГСК	– трансплантация гемопоэтических стволовых клеток
ЯСК	– ядродержащие клетки
ЭВА	– этиленвинилацетат
7AAD	– 7-амино-актиномицин

## Нормативные ссылки

В настоящем документе использованы ссылки на следующие нормативные документы:

Приказ Минздрава России от 25.12.1997 № 380 «О состоянии и мерах по совершенствованию лабораторного обеспечения диагностики и лечения пациентов в учреждениях здравоохранения Российской Федерации».

Приказ Минздрава России от 25.07.2003 N 325 «О развитии клеточных технологий в Российской Федерации».

ГОСТ ИСО 14644-1-2002 Чистые помещения и связанные с ними контролируемые среды. Часть 1. Классификация чистоты воздуха.

ГОСТ Р 52539-2006 Чистота воздуха в лечебных учреждениях. Общие требования.

ГОСТ Р 52938-2008 Кровь донорская и ее компоненты. Контейнеры с консервированной кровью или ее компонентами. Маркировка.

СанПиН 2.1.3.2630-10 Санитарно-эпидемиологические требования к организациям, осуществляющим медицинскую деятельность.

## Основные нормативные положения

### 1 Современное представление о криоконсервации ГСК

#### 1.1 Общие принципы криоконсервации

Криоконсервация – технологический процесс, включающий замораживание и последующее хранение тканей или клеток при сверхнизких температурах с сохранением их жизнеспособности после размораживания.

Криоконсервация широко применяется для сохранения генетического разнообразия в сельском хозяйстве и микробиологии, а также в медицине – в программах вспомогательных репродуктивных технологий и при заготовке крови и ее компонентов.

Современная эра медицинской криобиологии начинается с 1949 г., когда В. Луэт опубликовал первые результаты опыта криоконсервации эритроцитов [1]. Уже тогда многие исследователи основное внимание сосредоточили на изучении механизмов разрушения клеток в момент их замораживания.

Замораживание водных растворов происходит в две стадии: сначала кристаллизуется вода, затем растворенное вещество [1]. При понижении температуры раствора, образующиеся кристаллы поглощают воду. При этом концентрация растворенных в незамерзшей пока воде веществ повышается и требуется дальнейшее снижение температуры для кристаллизации незамерзшей части раствора [2]. В связи с наличием в клеточной структуре и межклеточном веществе значительного количества воды, процесс кристаллизации при замораживании клеточных суспензий протекает аналогично процессам в водных растворах. Поэтому фазовый переход воды из жидкого в твердое состояние при замораживании клеток происходит в широком температурном диапазоне – от температуры начала кристаллизации до полного замерзания [3]. Динамика изменения температуры в этом интервале влияет на характер кристаллизации.

В результате исследований выяснилось, что основная масса повреждений клеточных структур в процессе замораживания связана с образованием кристаллов льда [2, 3]. В процессе замораживания кристаллизация воды начинается во внеклеточном пространстве и с ростом кристаллов, приводит к нарастанию концентрации солей внеклеточного раствора. Высокие концентрации солей во внеклеточной среде приводят к возникновению на плазматической мембране клетки градиента осмотического давления, приводя к дегидратации клеток [3].

В 1976 году была выдвинута гипотеза холодовой деструкции клеток, согласно которой, клеточная мембрана является первичной мишенью действия кристаллов льда и осмотических фак-



торов при замораживании, что впоследствии влияет на жизнеспособность самих клеток [4]. Понижение температуры оказывает влияние на взаимодействия между белками и двойным липидным слоем клеточной мембраны, что приводит к нарушению мембранного транспорта и может вызвать гибель клеток [4, 5, 6].

Таким образом, по мере охлаждения меняется характер метаболических процессов в клетках, и нарушаются жизненно важные процессы. Замедляются движение различных молекул и оргanelл в клетках, изменяется вязкость и физико-химические свойства растворов, белковых и др. комплексов, снижается скорость течения биохимических реакций, нарушается активность ферментов, изменяется регуляция внутриклеточного обмена [3].

Способами сохранения жизнеспособности клеток в процессе замораживания является управление охлаждением и применение криопротекторов.

## 1.2 Криопротекторы

Криопротекторы – вещества, обладающие способностью предупреждать развитие криоповреждений биологических объектов и обеспечивать их жизнеспособность после размораживания [3].

Впервые криозащитное свойство глицерина было обнаружено Н.А. Максимовым в 1913 г. Первые успешные результаты замораживания спермы петуха с использованием криопротектора – глицерина получили С. Polge, А. Smith, L. Parkes в 1949 г. [7]. Позднее для криоконсервации клеток крови и костного мозга в 1959 г. J. Lovelock предложил использовать ДМСО [8].

К настоящему времени выявлено около 120 органических веществ, обладающих криопротекторными свойствами [7].

Классификация криопротекторов:

- **эндоцеллюлярные** – проникающие через клеточную мембрану вещества с молекулярной массой до 101 г/моль [39];

- **экзоцеллюлярные** – не проникающие через клеточную мембрану вещества с молекулярной массой более 400 г/моль [8];

- **смешанного действия** – вещества с молекулярной массой от 102 до 400 г/моль [1].

Эндоцеллюлярные криопротекторы считаются наиболее эффективными, однако, благодаря высокой проницаемости, они обладают и наибольшей токсичностью [7]. Свойства наиболее распространенных криопротекторов представлены в таблице 1.

Общий принцип действия криопротекторов при замораживании заключается в связывании воды, что приводит к снижению скорости кристаллизации и замедлению роста кристаллов льда, что позволяет уберечь клетку от осмотического лизиса.

Таблица 1 – Свойства наиболее распространенных криопротекторов.

Наименование	Молекулярная масса, г/моль	Механизм действия	Полулетальная доза ЛД <sub>50</sub> , г/кг	Эмпирическая формула
ДМСО	78,13	эндоцеллюлярный	3,80±0,1	C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> SO
ДМАЦ	87	эндоцеллюлярный	4,2 (2,5-3,9)	C <sub>4</sub> H <sub>9</sub> NO
Глицерин	92,1	эндоцеллюлярный	4,57±0,14	C <sub>3</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>
ГМБТОЭМ	378	смешанное	15,5±0,6	-
ПЭО	400	смешанное	12,5	HO(CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> O) <sub>n</sub> H
ПВП	12600	экзоцеллюлярный	не токсичен	(C <sub>6</sub> H <sub>9</sub> NO) <sub>n</sub>

Механизм действия эндоцеллюлярного криопротектора реализуется в связывании внутриклеточной воды при быстром проникновении через мембрану. Экзоцеллюлярный криопротектор связывает внеклеточную воду и при замораживании замедляет рост внеклеточных кристаллов льда, обволакивает клетки и препятствует воздействию на них уже сформировавшихся кристаллов [1].

Следует отметить, что до настоящего времени не существует универсальных принципов подбора и синтеза криопротектора. Выбор криопротектора осуществляется эмпирически, индивидуально для каждой клеточной фракции [9].

Тем не менее, можно сформулировать основные общие требования к криопротектору:

- сохранять клетки в жизнеспособном состоянии;
- при минимальной концентрации обеспечивать криозащитное действие;
- быть малотоксичным на клеточном и организменном уровнях;
- хорошо растворяться в воде.

На протяжении последних 40 лет применяли разные виды криопротекторов для криоконсервации ГСК (см. таблицу 1), однако использование ДМСО на сегодня дает лучшие результаты [1].

ДМСО был получен методом окисления диметилсульфида русским химиком А.М. Зайцевым в 1867 г. Первое сообщение о криопротективных свойствах ДМСО появилось в 1959г., когда J.

E.Lovelock и M.W. Vishorиспользовали это вещество в качестве криопротектора при замораживании эритроцитов человека [8].

ДМСО – прозрачная, бесцветная жидкость слегка горьковатого вкуса. ДМСО представляет собой небольшую амфифильную молекулу с гидрофильной группой сульфоксида и двумя гидрофобными метил-группами [10], молекула ДМСО высокополярна. Отрицательный полюс диполя находится на атоме кислорода. Жидкий диметилсульфоксид (температура плавления – 18,5°C, температура кипения – 189°C) обладает упорядоченной структурой, которая разрушается в интервале температур 40-60°C.

ДМСО является дипольным апротонным супер растворителем, образует стабильные растворы путем диполь-дипольных взаимодействий через гидрофобные связи. Благодаря способности устанавливать стабильные водородные связи с молекулами воды, ДМСО растворяется в ней в любых пропорциях [1]. При смешивании ДМСО с водой выделяется теплота. ДМСО хорошо проникает через плазматические и внутриклеточные мембраны, образуя комплексы с водой, солями и высокомолекулярными биологическими веществами [3].

Для успешного замораживания различных популяции клеток требуется оптимальная концентрация ДМСО. При этом необходимо учитывать влияние ДМСО на клеточную мембрану при его добавлении в клеточную взвесь еще до начала замораживания.

Известно, что различная концентрация ДМСО по-разному влияет на процесс кристаллизации [1]. Моделирование бислойных систем клеточной мембраны показало, что влияние ДМСО на двойной липидный слой, зависит от концентрации ДМСО в растворе. При проникновении молекул ДМСО внутрь фосфолипидного бислоя мембраны клетки, при концентрации ДМСО от 2,5 до 7,5 % включительно, наблюдается уменьшение его толщины. При концентрациях ДМСО от 10% и выше, помимо уменьшения толщины бислоя наблюдается формирование гидрофильных пор и дефектов в клеточной мембране. Концентрация ДМСО, превышающая 20%, ведет к полному разрушению липидного бислоя мембраны [10].

Для криоконсервирования ГСК конечная концентрация ДМСО – 10% является наиболее распространенной [11,12,13]. При этом в ряде исследований сообщается, что при использовании концентрации ДМСО от 5% до 10% сохранность ГСК практически не отличалась [14]. В то же время, была показана лучшая сохранность КОЕ-ГМ при использовании 10% ДМСО в сравнении с 5% [15]. Установлено, что снижение концентрации ДМСО ниже 5% приводит к значительным потерям ГСК, а концентрация выше 10% не приводит к повышению сохранности ГСК, но опасна для пациента [16]. Таким образом, минимальная безопасная концентрация ДМСО для ГСК может быть компромиссной – 7,5% [17].

Помимо выбора оптимальной концентрации криопротектора, актуальными является и условия его введения. Известно, что процесс гидратирования ДМСО сопровождается экзотермической реакцией, которая может привести к гибели ГСК при их смешивании с криопротектором. Поэтому добавление ДМСО рекомендовано проводить на ледяной бане в предварительно охлажденный до +4°C лейкоконцентрат [1,2]. В то же время, есть рекомендации, исключающие охлаждения трансплантационного материала и использование ледяной бани при введении ДМСО [17].

В состав криопротектора, для снижения токсического действия ДМСО, часто вводят препараты декстрана [3]. Декстран проявляет свойства экзоцеллюлярного криопротектора и дополнительно защищает клетку при замораживании.

Технология криоконсервации ГСК постоянно совершенствуется и ее эффективность во многом зависит не только от криопротектора, но и от методики замораживания.

### **1.3 Методы криоконсервации**

Скорость замораживания ГСК давно и широко обсуждается. На сегодняшний день считаются стандартом протоколы криоконсервации ГСК с использованием контролируемого замораживания, которые основаны на медленной скорости замораживании образца до -120°C с последующим погружением его в жидкий азот [11, 12,15,18,19,20]. При контролируемом замораживании ГСК используют скорость охлаждения 1-2°C/мин до температуры около -40°C. Затем процесс замораживания продолжают со скоростью около 3-5°C /мин до температуры -120°C. [18, 20]. Для контролируемого замораживания ГСК используют программные замораживатели – приборы, которые позволяют создавать необходимую температуру в камере в установленный отрезок времени с использованием встроенного программного обеспечения. Дозированная подача паров азота в камеру программного замораживателя обеспечивается из сосуда Дьюара с жидким азотом. Программное обеспечение замораживателя позволяет осуществлять контроль температуры в биоматериале с использованием датчиков, устанавливаемых в криопакет с биоматериалом. Необходимо отметить, что датчики не рекомендуется устанавливать в трансплантационный материал ввиду его возможной контаминации. Использование датчиков в криопакете с опытным материалом оправдано при предварительных испытаниях программ замораживания.

Начиная с 80-х годов прошлого века, исследовали возможность неконтролируемого замораживания образцов костного мозга, а затем и периферической крови при температуре -80°C, используя низкотемпературные холодильники [21–26, 28]. При этом, криопакет с трансплантационным материалом и криопротектором сразу помещается в камеру морозильника при -80°C. Было установлено, что неконтролируемый метод является безопасным и показывает результа-

ты, сопоставимые с контролируемым замораживанием ГСК костного мозга, периферической крови и пуповинной крови [19, 27]. В то же время есть сведения, что при использовании контролируемого замораживания, обеспечивается лучшая сохранность КОЕ-ГМ [26].

До сих пор не существует единого мнения о значимости компенсации выделения латентного тепла при кристаллизации клеточной взвеси (рисунок 1).

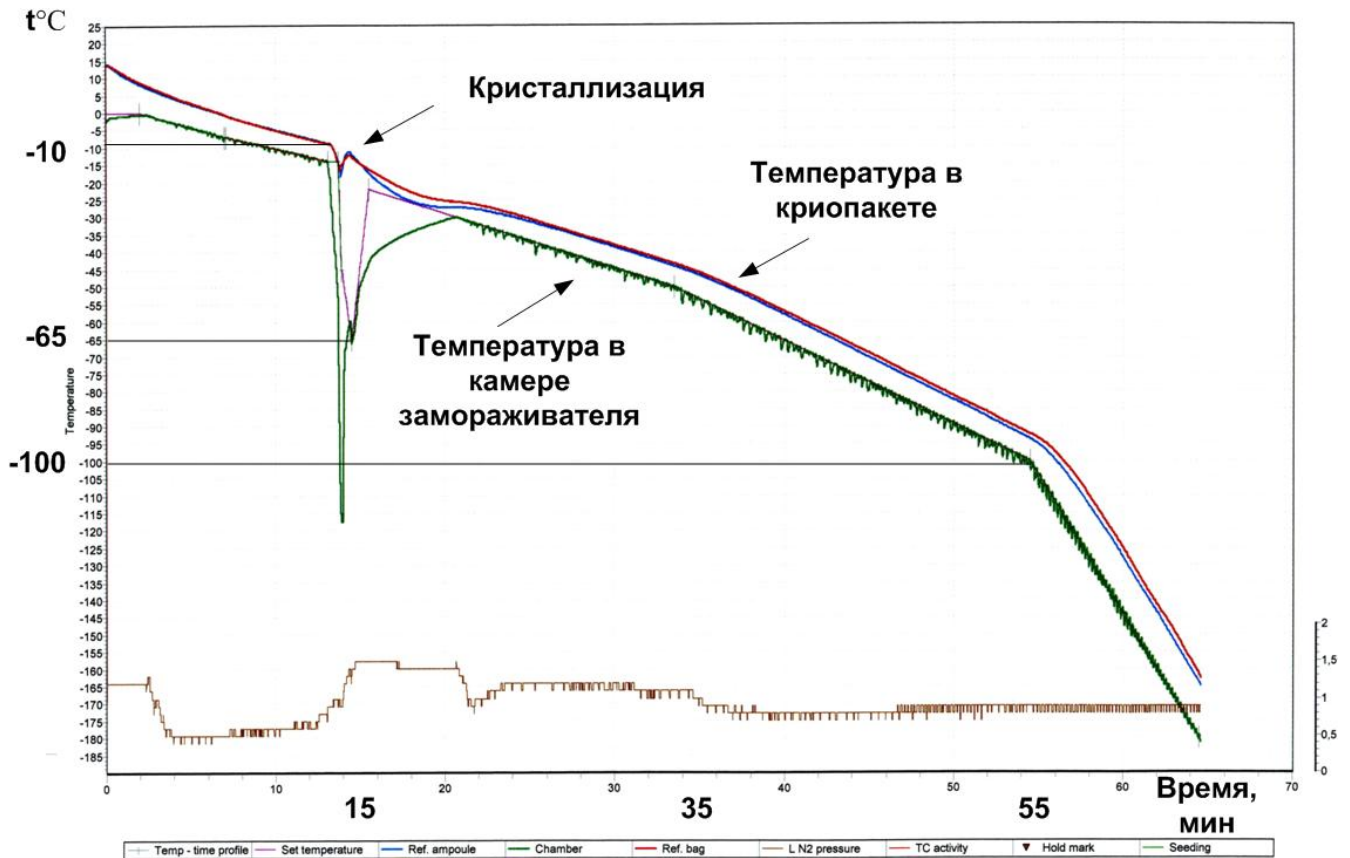


Рисунок 1 – Кривая программного замораживания с компенсацией выделения латентного тепла при кристаллизации клеточной взвеси

Тем не менее, Valintetalv в своем исследовании подчеркнули важность такой компенсации. Авторы установили, что пятиступенчатый протокол замораживания ГСК с контролируемой скоростью и компенсацией выделения тепла наиболее эффективен и позволяет обеспечить максимальное восстановление КОЕ-ГМ.

Помимо скорости замораживания, на сохранность ГСК влияет концентрация клеток в материале [29, 30]. Было показано, что снижение сохранности ГСК в ходе криоконсервации наблюдается при концентрации ЯСК в лейкоконцентрате выше  $150 \times 10^9 / \text{л}$ . Поэтому при концентрации ЯСК в материале более  $150 \times 10^9 / \text{л}$ , рекомендуется его разведение аутоплазмой.

## 1.4 Криопакеты






В настоящее время, криоконсервирование и долгосрочное хранение трансплантационного биоматериала осуществляется в одноразовых стерильных пластиковых системах – криопакетах. К ним предъявляются следующие требования: материалы, из которых изготовлены криопакеты, должны обладать максимальной химической инертностью, иметь большую теплопроводность и обеспечивать равномерное охлаждение всего объема биологического материала, достаточную механическую прочность и герметичность для хранения при температуре до  $-196^{\circ}\text{C}$  [3].

Наибольшее распространение получили криопакеты из специального пластика – этилвинилацетата– ЭВА [18], обладающего химической инертностью, прочностью и устойчивостью к ультранизким температурам в сочетании с прозрачностью и эластичностью, а также стойкостью к ударам и прокалываниям. Этилвинилацетат обладает повышенной адгезивностью к форменным элементам крови, при этом, адгезивные свойства ЭВА зависят от содержания винилацетата, который придает эластичность, прозрачность, плотность и улучшает механические свойства ЭВА. Производители криопакетов из ЭВА нашли удачный баланс химического состава, позволяющего уменьшить адгезивные свойства с сохранением механических свойств, а широкое использование данных криопакетов при криоконсервации компонентов крови доказало их эффективность и надежность при экономической цене.

Необходимо отметить, что наряду с наиболее распространенными криопакетами из ЭВА, для изготовления криопакетов применяется каптон/тефлон. Каптон (поли 4,4'-оксидифенилен-пиромеллитимид) – полиимидная пленка, химически инертна. Тефлон – политетрафторэтилен (фторполимер– полимер тетрафторэтилена) – по своей химической стойкости превосходит все известные синтетические материалы и благородные металлы.

Криопакеты из каптон/тефлона отличаются высокой устойчивостью к механическим деформациям при низких температурах и химической инертностью. Криопакеты из материала каптон/тефлона тоньше, чем криопакеты из ЭВА, что позволяет обеспечивать более равномерное охлаждение биоматериала при криоконсервации. В силу цветовых особенностей каптона, криопакеты имеют оранжевый прозрачный цвет.

Таблица 2 – Наиболее распространенные криопакеты, применяемые для криоконсервации ГСК.

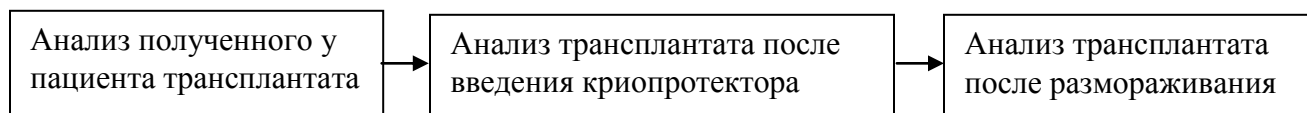
№	Внешний вид криопакета	Наименование	Производитель	Материал	Объем заполнения, мл (мин. – макс.)
1		CryoMACS Freezing Bag	Miltenyi Biotec GmbH (Германия)	ЭВА	10-20 30-70 55-100 80-190 125-270
2		Cryostore EVA bag	OriGen Biomedical (США)	ЭВА	10-30 30-70 55-100 80-190 120-275 180-450
3		Hemofreez bag	Fresenius Medical Care (Германия)	каптон/тефлон	350 500 700 1000
4		MACO BIOTECH Freezing - EVA BAGS	MacoPharma (Франция)	ЭВА	10-30 30-70 60-100 100-180 80-150 140-280 120-250
5		CordBlood Freezing Bag	Pall Corporation (США)	ЭВА	25

Для исключения перекрестной контаминации образцов при нарушении целостности крио-пакета, применяют герметичные оберточные контейнеры из такого же материала, что и криопакет. Оберточные контейнеры запаивают специальным вакуумным запаивателем перед замораживанием материала.

Выбор криопакета связан с типом применяемого криогенного оборудования.

### 1.5 Лабораторный контроль качества

Криоконсервация трансплантационного материала, содержащего ГСК, состоит из ряда последовательных манипуляций. Существующие методики не исключают риск потери ГСК на любом этапе криоконсервации. Для снижения данного риска целесообразен лабораторный контроль трансплантационного материала на каждом из этих этапов.



В первые десятилетия внедрения клеточных технологий в клиническую практику, качество трансплантационного материала оценивалось путем анализа количества ядросодержащих клеток (ЯСК). Было определено, что трансплантационная доза, достаточная для успешной АутоТГСК, составляет  $4-8 \times 10^8$  ЯСК/кг массы тела [31]. Несмотря на то, что данный параметр лишь косвенно характеризует способность трансплантационного материала восстанавливать кроветворение, определение концентрации ЯСК по-прежнему актуально [32, 40].

Современные лаборатории, как правило, оснащены гематологическими анализаторами, которые быстро и с высокой точностью определяют количество ЯСК в образце периферической крови. Однако на этапе криохранения лейкоконцентрат претерпевает значительные изменения, что делает его не пригодным для исследования автоматизированными методами. Например, гематологический анализатор будет занижать показатели ЯСК, если у клеток повреждена мембрана, а высокий гематокрит лейкоконцентрата часто вызывает сообщения аппарата об ошибке.

В отличие от анализатора, световая микроскопия в камере Горяева позволяет более достоверно определить ЯСК даже при значительном гемолизе, так как при микроскопии лейкоконцентрата подсчету подвергаются ядра клеток, устойчивые к действию технологических факторов. Таким образом, метод световой микроскопии для оценки лейкоконцентрата, содержащего значитель-



ное количество лизированных клеток, оказывается более точным, по сравнению с анализатором, способном учитывать только неповрежденные ЯСК при гематокрите близком к физиологическому.

В 1980-х годах стало возможным определение количества ГСК путем специфического окрашивания данных клеток флуоресцентными красителями, что позволило оценить оптимальную дозу ГСК для АутоТГСК. Было определено, что для успешного восстановления кроветворения у онкогематологических пациентов после ВДХТ необходимо трансплантировать не менее  $2 \times 10^6$  ГСК/кг массы тела [33]. В случае тандемной АутоТГСК при лечении множественной миеломы [34] потребность в трансплантационной дозе увеличивается в два раза.

На сегодняшний день стандартным методом определения количества ГСК является проточная цитофлуориметрия, однако точность и воспроизводимость результатов зависят от протокола исследования [35]. В литературе описано несколько протоколов, предполагающих различные стратегии гейтирования. Наиболее распространенным протоколом является ISHAGE (International Society for Hematotherapy and Graft Engineering), который позволяет исследовать материал, полученный из любого источника и рассчитывать абсолютное количество ГСК с помощью калибровочных частиц [36, 37, 38]. Для исключения из результата поврежденных клеток применяется маркер некроза и апоптоза 7-амино-актиномицин (7AAD). Фенотип ГСК подлежащих учету согласно данному протоколу: CD45+(слабый)/CD34+(яркий)/7AAD-.

Высокая скорость и точность метода проточной цитометрии позволяет оперативно принимать решение в соответствии с полученными результатами. К сожалению, количественная оценка ГСК по фенотипу не характеризует их способности к восстановлению кроветворения, что является непосредственной задачей трансплантации.

Оценить *invitro* способность ГСК к пролиферации в миелоидном и лимфоидном направлениях можно с помощью их культивирования на специальных средах. Методы культивирования ГСК применяются уже более 60 лет. Первые десятилетия для этих целей использовались среды, полученные из абортивного материала животных. Данные среды невозможно было стандартизировать, что затрудняло применение культуральных методов с целью количественной оценки колониеобразующей активности ГСК. В настоящее время производятся среды с точным содержанием рекомбинантных цитокинов, что необходимо для достоверной оценки *invitro* способности ГСК к пролиферации. Для успешного восстановления кроветворения у пациента после ВДХТ необходимо трансплантировать  $10-50 \times 10^4$  КОЕ-ГМ/кг массы тела [31]. Принципиальным недостатком метода культивирования является длительность получения результатов анализа – 14 суток. Однако полученные результаты имеют клиническое значение, так как прямо характеризуют пролиферативный потенциал ГСК.

Помимо лабораторного контроля количества и функциональных свойств ГСК требуется контроль возможной микробной контаминации. Перед замораживанием из материала, смешанного с криопротектором, отбирается проба для бактериологического контроля.

Таким образом, описанные лабораторные методы позволяют оценить как количественные, так и качественные параметры трансплантационного материала. Кроме того, наличие преимуществ и недостатков перечисленных методов, убедительно свидетельствует о необходимости их комплексного применения на каждом этапе работы с трансплантационным материалом.

### **1.6 Принципиальные технологические и организационные требования к проведению криоконсервации ГСК**

В соответствии с СанПиН 2.1.3.2630-10 «архитектурно-планировочные и конструктивные решения зданий и помещений для медицинской деятельности должны обеспечивать оптимальные условия для осуществления лечебно-диагностического процесса, соблюдения санитарно-противоэпидемического режима и труда медицинского персонала», а «структура, планировка и оборудование помещений должны обеспечивать поточность технологических процессов и исключать возможность перекрещивания потоков с различной степенью эпидемиологической опасности».

Криоконсервацию ГСК целесообразно проводить в последовательно расположенных рабочих зонах:

- регистратура - 1;
- лаборатория - 2;
- асептическое помещение - 3;
- криохранилище - 4.

Важно отметить, что рекомендуемая схема движения трансплантационного материала на этапах криоконсервации, представленная на рисунке 2, обеспечивает поточность перемещения материала при работе с ним.

**Регистратура** (1) предназначена для приема и регистрации заготовленного трансплантационного материала. Для помещения регистратуры применяются общие требования согласно СанПиН 2.1.3.2630-10.

Пакет, с заготовленным трансплантационным материалом, необходимо доставлять в регистратуру в термоконтейнере, предназначенном для транспортировки крови и ее компонентов. Заготовленный трансплантационный материал должен транспортироваться при температуре от +15°C

до +30°C в течение не более 24 часов согласно приказу Минздрава России № 325 «О развитии клеточных технологий в Российской Федерации».



Рисунок 2 – Рекомендуемая схема движения трансплантационного материала на этапах криоконсервации

До операции заготовки трансплантационного материала пациенту должен быть присвоен идентификационный код, который впоследствии должен присутствовать на всех этикетках, которыми маркируют пакет с заготовленным материалом, пробирки для лабораторного анализа, документацию, криopakеты. При этом рекомендуется использовать штриховое кодирование. Для штрихового кодирования необходимо оснастить все рабочие места соответствующими сканерами, а ре-

гистратуру термотрансферным принтером для печати термоустойчивых этикеток. Нанесение на этикетку штрихового кода позволяет безошибочно идентифицировать материал на любом технологическом этапе. Штриховое кодирование должно использоваться в комплексе с программным обеспечением, позволяющим формировать базу данных с подробным досье на материал. Следует отметить, что на этикетке пакета с заготовленным материалом, рекомендуется помимо идентификационного кода, отражать следующую информацию:

- фамилия, имя, отчество больного;
- группа крови по системе АВО, резус-принадлежность;
- наименование компонента крови;
- объем компонента;
- дата заготовки;
- наименование медицинской организации.

Для этикетки криопакета, в котором будет содержаться замороженный аутооттрансплантат (в соответствии с ГОСТ Р 52938-2008 «Кровь донорская и ее компоненты. Контейнеры с консервированной кровью или ее компонентами») рекомендуется помимо выше описанной информации, указать дополнительно:

- объем компонента в криопакете;
- наименование криопротектора;
- объем криопротектора, его концентрация;
- дата замораживания и температуру хранения;
- пометку - «только для аутологичной трансфузии».

Перечень оборудования и расходных материалов для регистратуры, а также требования к персоналу представлены в приложении А.

**Лаборатория** (2) предназначена для оценки качества трансплантационного материала с использованием методов указанных в разделе 1.5 настоящих рекомендаций.

Организация деятельности лаборатории осуществляется в соответствии с СанПиН 2.1.3.2630-10 и приказом Минздрава России от 25.12.1997 № 380 «О состоянии и мерах по совершенствованию лабораторного обеспечения диагностики и лечения пациентов в учреждениях здравоохранения Российской Федерации».

Отбор проб для лабораторного анализа предполагает нарушение целостности упаковки трансплантационного материала. Отбор необходимо проводить в асептических условиях в асептическом помещении (3), где осуществляется подготовка к криоконсервации. Пробы из рабочей зоны 3 через передаточный шлюз передаются в лабораторию (2).

Перечень оборудования и расходных материалов для лаборатории, а также требования к персоналу представлены в приложении Б.

**Асептическое помещение (3)** предназначено для проведения процедуры подготовки трансплантационного материала к криоконсервации.

Распределение трансплантационного материала из исходного пакета в криопакеты, а также введение ДМСО в криопакеты связаны с разгерметизацией его упаковки. Для исключения контаминации трансплантационного материала необходимо указанные манипуляции проводить в условиях бокса биологической безопасности 2 класса. Для максимального исключения риска контаминации трансплантационного материала бокс биологической безопасности рекомендуется располагать в специальном чистом помещении.

Для подобных целей рекомендуется использовать чистые помещения класса чистоты не ниже 8 ИСО в соответствии с требованиями к проведению заготовки костного мозга, плазмафереза или гемодиализа, представленными в ГОСТ 52539-2006 «Чистота воздуха в лечебных учреждениях». Использование одноразовой одежды и перчаток для персонала в комплексе с поддержанием чистоты воздуха в асептическом помещении обеспечивает максимальную защиту трансплантационного материала. Класс чистоты должен контролироваться регулярными бактериологическими исследованиями. Работа в чистых помещениях организуется в соответствии с ГОСТ 52539-2006 «Чистота воздуха в лечебных учреждениях. Общие требования», а также ГОСТ ИСО 14644-1-2002 «Чистые помещения и связанные с ними контролируемые среды».

Заготовленный трансплантационный материал, объем которого в разных случаях может составлять от 200 до 1000 мл, из исходного пакета рекомендуется равномерно распределять по нескольким криопакетам емкостью 50-100 мл. Это позволяет обезопасить весь объем трансплантационного материала при случайной разгерметизации одного из криопакетов. Характеристики наиболее часто используемых криопакетов представлены в разделе 1.4 настоящих рекомендаций.

Точный объем трансплантационного материала в исходном пакете и криопакетах имеет ключевое значение для расчета необходимого количества криопротектора. Завышение или занижение необходимого количества криопротектора может привести к гибели ГСК. Объем полученного клеточным сепаратором трансплантационного материала или контрольное взвешивание пакетов с материалом, имеют значительную погрешность. Поэтому оптимальным способом для точного измерения объема трансплантационного материала является использование точно градуированных одноразовых шприцев при распределении материала в криопакеты.

Для создания рекомендуемой конечной концентрации ДМСО в трансплантационном материале предлагается использование готового к применению криопротектора следующего состава:

55% - раствор ДМСО и 40% - раствор декстрана 40. Стоит отметить, что использование фабрично изготовленного криопротектора позволяет исключить риск контаминации при смешивании компонентов криопротектора самостоятельно.

Перечень оборудования и расходных материалов для асептического помещения, а также требования к персоналу представлены в приложении В.

**Криохранилище (4)** предназначено для замораживания трансплантационного материала.

Замораживание проводится с использованием программного замораживателя, который чаще всего располагают в самом криохранилище. Передача трансплантационного материала из асептического помещения в криохранилище осуществляется через передаточный шлюз.

В помещении криохранилища проводится замораживание и последующее хранение трансплантационного материала с использованием жидкого азота. По требованиям безопасности жидкий азот хранится в сосудах Дьюара вне здания и по термозащищенному трубопроводу подается к программному замораживателю и криохранилищам. Необходимо обеспечить бесперебойное круглосуточное поступление жидкого азота в течение всего срока эксплуатации криохранилищ.

В связи с использованием жидкого азота имеется ряд особых технических требований к помещению криохранилища. Повышенная концентрация паров жидкого азота в воздухе может вызывать отравление персонала, поэтому помещение криохранилища оборудуют кислородным газоанализатором. Содержание кислорода в воздухе должно поддерживаться не ниже 20%. Помещение криохранилища оснащают аварийной вытяжной вентиляцией с кратностью не ниже  $10 \text{ ч}^{-1}$ . Аварийная вентиляция управляется газоанализатором – при содержании кислорода в воздухе менее 20% происходит ее автоматическое включение, а звуковой сигнал предупреждает персонал об аварийной ситуации. Для удаления паров азота из помещения точки забора воздуха аварийной вытяжной вентиляции должны располагаться на расстоянии не более чем на 1 м от пола. Персонал, работающий в криохранилище, должен быть обучен работе с криогенным оборудованием и правилам безопасной эксплуатации сосудов, работающих под давлением и обеспечен средствами индивидуальной защиты – криоперчатками, криофартуком и лицевой маской.

После замораживания трансплантационный материал в криопакетах должен храниться в специально предназначенных для этого криохранилищах. Криопакет помещается в маркированную этикеткой со штрих кодом картонную или металлическую кассету и устанавливается на пронумерованную полку в пронумерованный металлический стеллаж криохранилища. Особое внимание следует уделять строгому учету места хранения трансплантационного материала, поскольку количество одновременно хранящихся в криохранилище криопакетов может варьироваться от 50 до 3500. При ручном размещении криопакетов, место их хранения после каждого размещения, пере-

мещения или извлечения материала, фиксируются в журнале и на схеме криохранилища. Использование криохранилищ с автоматизированной системой помещения и извлечения материала исключает возможность его ошибочного извлечения.

В настоящее время рекомендуют применение криохранилищ с использованием вместо жидкого азота его паров. Хранение в парах исключает возможность перекрестной контаминации между хранящимися образцами и уменьшает расход жидкого азота. Таким образом, при организации криохранилища необходимо обеспечить вышеуказанные технологические и организационные требования для безопасной работы с трансплантационным материалом.

Перечень оборудования и расходных материалов для криохранилища, а также требования к персоналу представлены в приложении Г.

## **2 Методические принципы криоконсервации ГСК**

### **2.1 Общая этапная схема проведения криоконсервации ГСК**

Криоконсервация ГСК – это цепь последовательных технологических этапов, включающих как подготовку к замораживанию, куда относится регистрация, отбор проб, распределение по криопакетам и введение ДМСО, так и замораживание с последующим долговременным хранением. Общая этапная схема проведения криоконсервации ГСК представлена на рисунке 3.

На схеме отмечено, что при получении на любом технологическом этапе криоконсервации данных о недостаточности трансплантационной дозы ГСК (менее  $2 \times 10^6$  ГСК/кг), тем не менее, трансплантат помещается на криохранение. В такой ситуации, необходимо организовать получение дополнительной дозы трансплантационного материала.

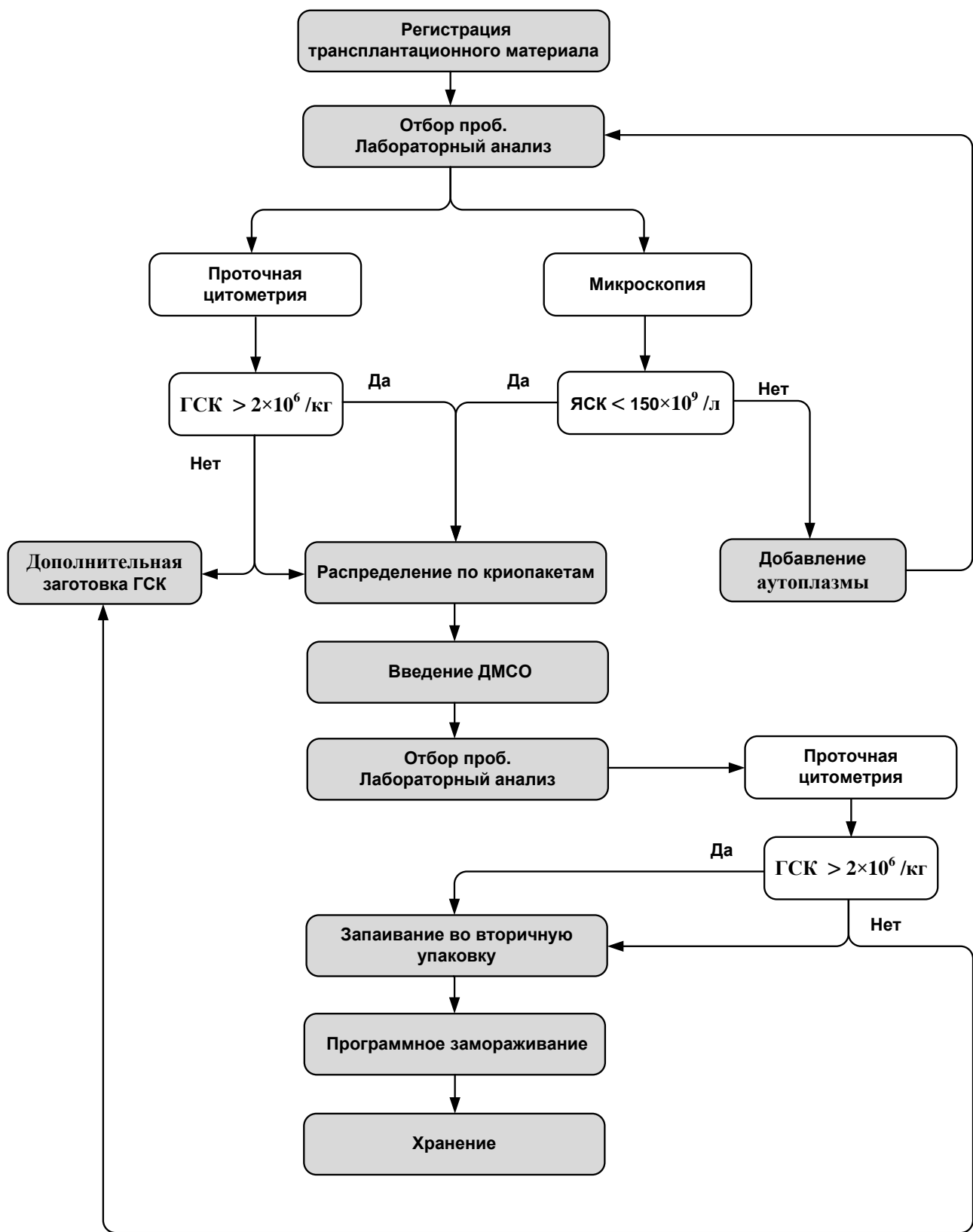


Рисунок 3 – Общая этапная схема проведения криоконсервации ГСК



## **2.2 Методика криоконсервация ГСК**

### **2.2.1 Методика подготовки к замораживанию ГСК**

#### **Регистрация**

При регистрации трансплантационного материала необходимо учитывать требования, представленные в разделе 1.6.

При поступлении в регистратуру термоконтейнера медицинская сестра должна извлечь из него пакет с трансплантационным материалом, обработать его дезинфицирующим раствором и поместить в дезинфицированный лоток.

При работе со средствами автоматической идентификации, считать сканером идентификационный штрих-код пациента на поступившем материале. Затем под этим кодом внести в электронную базу данных информацию из сопроводительной документации, зафиксировать время поступления материала, температуру транспортировки, наименование сопроводительной документации. После чего напечатать этикетки, содержащие идентификационный штрих-код для маркировки криопакетов, пробирок для лабораторного анализа и документации.

После регистрации пакет с заготовленным трансплантационным материалом передается в асептическое помещение через окно-шлюз.

#### **Отбор проб**

Перед тем как распределить трансплантационный материал по криопакетам, необходимо отобрать пробы для лабораторных анализов, перечисленных в разделе 1.5 настоящих рекомендаций. Так как отбор проб осуществляется в асептических условиях необходимо соблюдать требования, представленные в разделе 1.6.

Манипуляции с трансплантационным материалом в чистом помещении необходимо проводить двум операторам - врачу-трансфузиологу и медицинской сестре.

Перед работой в чистом помещении медицинская сестра обязана проверить документацию об асептическом состоянии помещения – результаты лабораторного и инженерного контроля, оставить отметку в журнале эксплуатации чистого помещения, проверить и пополнить комплектность расходных материалов, используемых при работе в чистом помещении. Зайдя в чистое помещение, медицинская сестра должна подготовить к работе размещенное там оборудование - бокс биологической безопасности, аппарат для соединения магистралей и аппарат для запаивания магистралей.

Операторы берут из передаточного окна-шлюза чистого помещения пакет с трансплантационным материалом, обрабатывают антисептическим раствором и помещают в стерильный лоток.

Перед отбором проб для лабораторного исследования рекомендуется выполнить следующее: к порту пакета с трансплантационным материалом присоединить (с помощью аппарата для соединения магистралей) стерильную полимерную магистраль для соединения пакетов. Перед отбором пробы необходимо промаркировать пробирку «эппендорф» этикеткой со штрих кодом.

Отбор пробы произвести в следующем порядке:

- поместить пакет с припаянной магистралью и маркированную пробирку в бокс биологической безопасности;
- перед отбором пробы тщательно перемешать материал в пакете;
- осторожно приоткрыть колпачок иглы у магистрали и зажим на пакете с материалом, заполнить магистраль самотеком (объем пробы в магистрали должен быть 1-1,5 мл), после чего закрыть колпачок;
- перепаять магистраль и отсоединить ее от пакета;
- приоткрыть колпачок иглы магистрали и перевести пробу в маркированную пробирку;
- передать маркированную пробирку через передаточный шлюз в лабораторию для проведения анализа.

При проведении анализа методом световой микроскопии необходимо оценить концентрацию ЯСК. При концентрации ЯСК более  $150 \times 10^9 / \text{л}$ , рекомендуется разведение лейкоконцентрата аутоплазмой до указанной концентрации.

### Порядок добавления аутоплазмы

Произвести расчет объема добавляемой аутоплазмы согласно нижеприведенной формуле:

$$V_{(\text{аутоплазмы})} = \frac{V_{(\text{исх. мат-ла})} \times C_{(\text{яск исх.})}}{C_{(\text{яскрекомед.})}} - V_{(\text{исх. мат-ла})} (1),$$

где  $V_{(\text{аутоплазмы})}$  – объем добавляемой аутоплазмы, мл;

$V_{(\text{исх. мат-ла})}$  – объем исходного трансплантационного материала, мл;

$C_{(\text{яск исх.})}$  – концентрация ЯСК в исходном трансплантационном материале, ЯСК  $\times 10^9 / \text{л}$ ;

$C_{(\text{яскрекомед.})}$  – рекомендуемая концентрация ЯСК в трансплантационном материале,  $150 \times 10^9 / \text{л}$ .

### Пример расчета

Заданные условия:

$$V_{(\text{исх. мат-ла})} = 300 \text{ мл}$$

$$C_{(\text{яск исх.})} = 300 \times 10^9 \text{ ЯСК /л}$$

$$C_{(\text{яскрекоменд.})} = 150 \times 10^9 \text{ ЯСК /л}$$

Рассчитать, при заданных условиях, какой объем аутоплазмы  $V_{(\text{аутоплазмы})}$  необходимо добавить к объему исходного трансплантационного материала  $V_{(\text{исх. мат-ла})}$ . Подставляя заданные значения в формулу (1) получим:

$$V_{(\text{аутоплазмы})} = \frac{300 \text{ мл} \times 300 \times 10^9 /\text{л}}{150 \times 10^9 /\text{л}} - 300 \text{ мл} = 300 \text{ мл}$$

Для добавления расчетного объема аутоплазмы необходимо:

- к порту пакета с аутоплазмой присоединить с помощью аппарата для соединения магистралей стерильный коннектор для инфузионных систем с соединением Луер-Лок;
- подсоединить к коннектору шприц соответствующего объема, после чего набрать в шприц требуемый объем аутоплазмы;
- перепаять магистраль коннектора и отсоединить его вместе со шприцем с аутоплазмой от пакета;
- с помощью аппарата для соединения магистралей присоединить магистраль коннектора вместе со шприцем с аутоплазмой к порту пакета с трансплантационным материалом;
- ввести аутоплазму в пакет с трансплантационным материалом, тщательно перемешать содержимое, после чего произвести повторный отбор пробы для контроля концентрации ЯСК по вышеописанной методике.

### **Распределение по криопакетам**

При разделении трансплантационного материала по криопакетам необходимо соблюдать требования, представленные в разделе 1.6.

Порядок действий:

- в бокс биологической безопасности поместить рассчитанное количество криопакетов, пакет с исходным трансплантационным материалом, а также шприцы соответствующего объема (от 20 до 50 мл). Расчет необходимого количества криопакетов и дозы материала для каждого криопакета произвести исходя из ориентировочного объема трансплантационного материала, зафиксированного при регистрации;

- тщательно перемешать материал в исходном пакете и забрать из исходного пакета трансплантационный материал в каждый шприц таким образом, чтобы получился одинаковый объем заполнения для каждого крио пакета;

- через соответствующий порт крио пакета ввести из каждого шприца материал в соответствующий крио пакет.

### **Введение ДМСО в трансплантационный материал**

#### *Подготовительный этап*

В настоящих рекомендациях предлагается использование ДМСО в конечной концентрации 7,5% в фабричной комбинации с декстраном 40.

Точный объем трансплантационного материала перед его введением в крио пакет измеряется при помощи шприца. Исходя из измеренного объема трансплантационного материала, производится расчет необходимого объема криопротектора.

Производят расчет необходимого объема криопротектора  $V_{(КП)}$ , содержащего раствор ДМСО с объемной концентрацией  $W_{ДМСО}=55\%$ , при условии, что конечная объемная концентрация ДМСО в соответствующем объеме  $V_{(ТМ)}$  трансплантационного материала должна составлять  $W=7,5\%$ . Расчет осуществляется по стандартной методике:

$$W (\%) = \frac{V_{(раствор. в-ва)}}{V_{(раствора)}} \times 100\% \quad (1),$$

где  $W$  – объемная доля растворенного вещества;

$V_{(раствор. в-ва)}$  – объем растворенного вещества, мл;

$V_{(раствора)}$  – объем раствора, мл.

При смешивании криопротектора и трансплантационного материала необходимо учитывать, что ДМСО в предлагаемом нами препарате содержится в растворе с декстраном, поэтому для расчета ДМСО необходимо узнать, сколько чистого (100%) ДМСО содержится в растворе:

$$V_{(раствор. в-ва)} = W_{ДМСО} \times V_{(КП)} \quad (2),$$

где  $W_{ДМСО}$  – объемная доля ДМСО (в нашем случае - 55%);

$V_{(КП)}$  – объем криопротектора, мл;

$V_{(раствор. в-ва)}$  – объем чистого ДМСО, мл.

В свою очередь при смешивании растворов криопротектора и трансплантационного материала также необходимо учитывать, что объем раствора  $V_{\text{(раствора)}}$  в формуле (1) составляет сумму смешиваемых растворов криопротектора и трансплантационного материала:

$$V_{\text{(раствора)}} = V_{\text{(ТМ)}} + V_{\text{(КП)}} \quad (3),$$

где  $V_{\text{(ТМ)}}$  – объем трансплантационного материала, мл.

$V_{\text{(КП)}}$  – объем криопротектора, мл;

Для создания концентрации криопротектора в смеси с трансплантационным материалом 7,5% ( $W=7,5\%$ ), получаем общее уравнение (4), представляющее  $(1)=(2)/(3)=7,5\%$ :

$$W (\%) = \frac{V_{\text{(раствор. в-ва)}}}{V_{\text{(раствора)}}} = \frac{0,55 \times V_{\text{(КП)}}}{V_{\text{(ТМ)}} + V_{\text{(КП)}}} \times 100\% = 7,5\% \quad (4)$$

Обобщая уравнение (4), получим формулу (5) для расчета необходимого объема криопротектора  $V_{\text{(КП)}}$  в заданном объеме трансплантационного материала  $V_{\text{(ТМ)}}$ , при условии, что конечная концентрация ДМСО должна составлять 7,5%:

$$V_{\text{(КП)}} = 0,158 \times V_{\text{(ТМ)}} \quad (5)$$

### **Пример расчета**

Заданные условия:

$$V_{\text{(ТМ)}} = 50 \text{ мл}$$

Криопротектор с раствором ДМСО с объемной концентрацией  $W_{\text{ДМСО}}=55\%$ .

Рассчитать, при заданных условиях, какой объем криопротектора  $V_{\text{(КП)}}$  необходимо добавить к объему трансплантационного материала  $V_{\text{(ТМ)}}$  при условии, что конечная концентрация ДМСО в нем должна составлять 7,5%. Подставляя заданное значение  $V_{\text{(ТМ)}}$  в формулу (5) получим:

$$V_{\text{(КП)}} = 0,158 \times 50 \text{ мл} = 7,9 \text{ мл}$$

После определения необходимого объема криопротектора для каждого криопакета, необходимо внести эти данные на этикетки каждого криопакета.

*Основной этап*

Для введения ДМСО необходимо:

- извлечь из холодильника флакон с криопротектором;
- заранее маркированную пробирку типа «эппендорф» и шприц поместить в бокс биологической безопасности;
- отобрать из флакона при помощи шприца расчетное количество криопротектора.

Введение ДМСО возможно двумя способами – ручным и с использованием шприцевого дозатора. При использовании любого способа обязательно постоянное перемешивание содержимого криопакета во время введения криопротектора.

При ручном способе необходимо:

- в криопакет с трансплантационным материалом, энергично встряхивая, медленно в течение 5 мин. ввести через соответствующий порт необходимое количество ДМСО;
- в опорожненный шприц с ДМСО несколько раз набрать и вернуть в криопакет несколько мл материала для удаления остатков ДМСО из магистрали криопакета и шприца. При этом важно удалить воздушные пузыри из криопакета и его портов;
- еще раз тщательно перемешать трансплантационный материал в криопакете. После чего в шприц, которым вводился криопротектор, набрать 3-4 мл смешанного с ДМСО материала для анализа, затем перепаять магистраль со шприцем и отсоединить ее от криопакета у основания;
- в боксе биологической безопасности перевести пробу из шприца и отпаянной магистрали в маркированную пробирку. После чего передать маркированную пробирку через передаточный шлюз в лабораторию. Пробу из пробирки использовать для проведения лабораторных анализов, перечисленных в разделе 1.5 настоящих рекомендаций и бактериологического анализа.

Криопакет с трансплантационным материалом, смешанным с ДМСО и маркированный этикеткой, рекомендуется поместить в оберточный мешок. Запаивание оберточного мешка осуществляют с использованием запаивателя. Запаянный криопакет с трансплантационным материалом немедленно передается через передаточный шлюз в помещение криоконсервации.

## **2.2.2 Методика замораживания ГСК**

### **Программное замораживание**

Замораживание трансплантационного материала проводится с использованием программного замораживателя. Необходимо отметить, что для программного замораживания существуют общепринятые параметры, описанные в разделе 1.4 настоящих рекомендаций. Однако программа замораживания не может быть универсальной, так как время кристаллизации индивидуально для различных объемов трансплантационного материала. В связи с этим рекомендуется предварительная

проверка(валидадация) программ замораживания с использованием температурного датчика в опытном трансплантационном материале, позволяющего оценить время начала кристаллизации и равномерность замораживания.

Перед закладыванием криопакетов в камеру программного замораживателя необходимо подготовить к работе замораживатель – убедиться в наличии запаса жидкого азота, запустить программное обеспечение замораживателя, выбрать программу замораживания и убедиться в бесперебойной подаче паров азота в камеру замораживателя. Подготовить алюминиевые кассеты, предназначенные для размещения в них криопакетов при замораживании.

Извлечь из передаточного шлюза криопакеты с трансплантационным материалом. Поместить криопакеты в алюминиевые кассеты и установить их в камеру программного замораживателя. Запустить заранее подготовленную программу замораживания.

Для программного замораживания ауто трансплантата ГСК в криопакетах объемом 50-60 мл рекомендуется использовать валидированную 6-ти ступенчатую программу, компенсирующую выделение тепла при кристаллизации клеток:

- 1) от 0°C до -14°C, время – 14 мин, скорость охлаждения 1°C/мин;
- 2) от -14°C до -65°C, время – 1 мин, скорость охлаждения 51°C/мин;
- 3) от -65°C до -22°C, время – 1 мин, скорость нагрева 43°C/мин;
- 4) от -22°C до -50°C, время – 18 мин, скорость охлаждения 1,5°C/мин;
- 5) от -50°C до -100°C, время – 21 мин, скорость охлаждения 2,5°C/мин;
- 6) от -100°C до -180°C, время – 10 мин, скорость охлаждения 8°C/мин.

Программный алгоритм рекомендуемой программы замораживания ГСК представлен на рисунке 4. График валидированной программы замораживания ГСК с использованием датчика в криопакете представлен на рисунке 5.

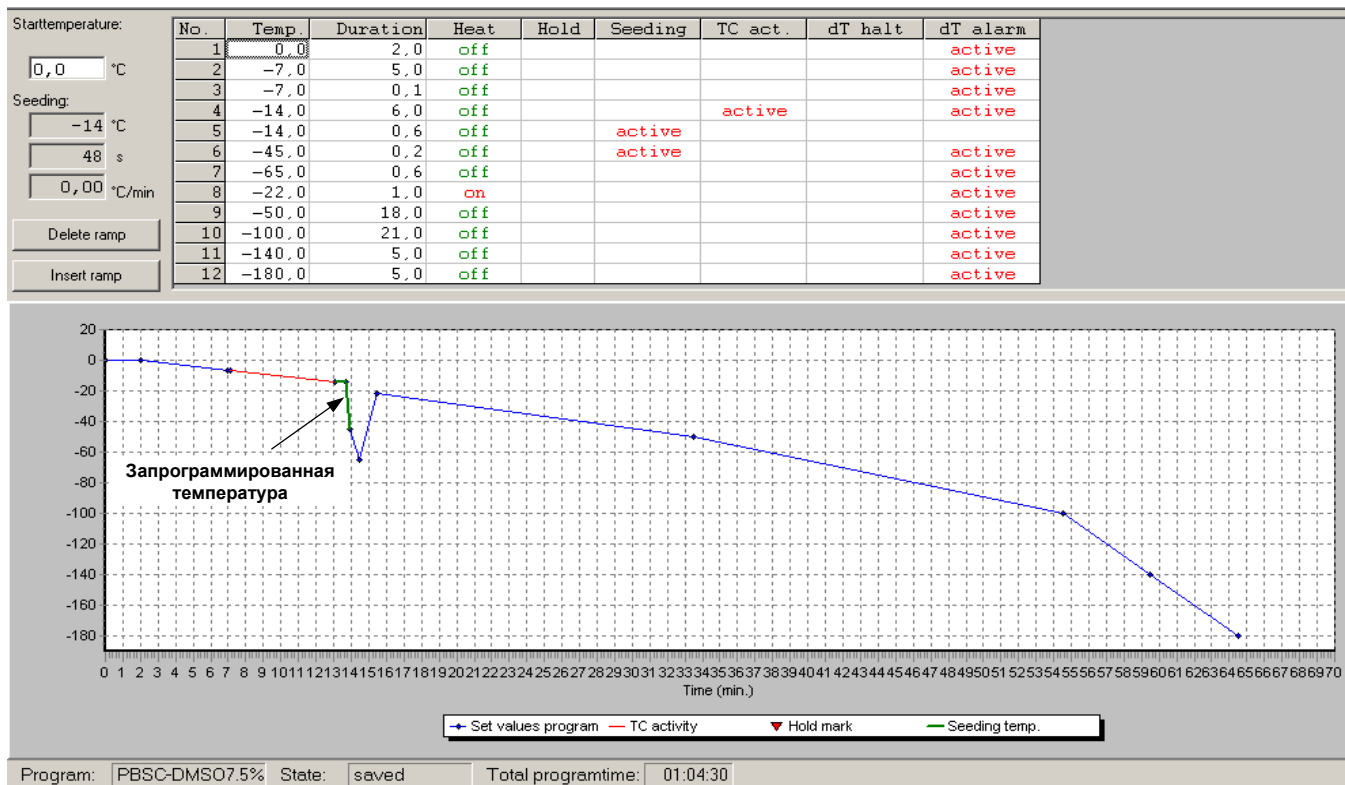


Рисунок 4 – Программный алгоритм, рекомендуемого метода замораживания ГСК

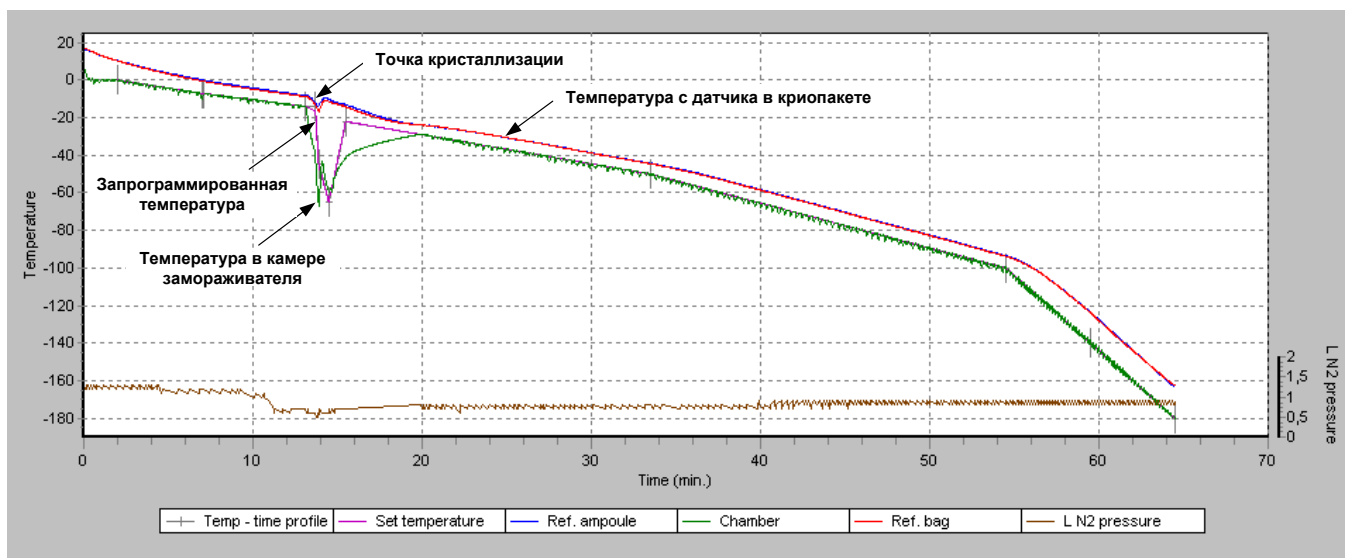


Рисунок 5 – График замораживания ГСК по валидированной программе с использованием датчика в криопакете



## **Хранение**

За время проведения программного замораживания (обычно более часа) необходимо заранее запланировать место хранения криопакетов с трансплантационным материалом в криохранилище с жидким азотом. Криопакет в криохранилище должен располагаться на индивидуальном пронумерованном месте, на стеллаже в коробке, либо в металлической кассете, в зависимости от конструктивных особенностей криохранилища.

По окончании замораживания необходимо одеть защитный лицевой щиток, фартук, криоперчатки и вынуть алюминиевую кассету с криопакетом из криогенной камеры программного замораживателя. Открыть алюминиевую кассету и быстро переместить криопакет в заранее маркированную картонную коробку или алюминиевую кассету для длительного хранения. Затем поместить кассету с криопакетом в запланированную ячейку стеллажа криогенного хранилища и опустить стеллаж в жидкий азот камеры криохранилища. Записать место хранения трансплантационного материала в журнале и на схеме криохранилища.

При извлечении материала из криохранилища персонал использует средства индивидуальной защиты и металлические крюки для извлечения систем хранения с материалом. В автоматизированных хранилищах материал помещается на хранение и извлекается автоматически.

## **Заключение**

Представленный метод криоконсервации ГСК содержит основные методические принципы, а также принципиальные технологические и организационные требования к проведению криоконсервации ГСК, соблюдение которых обеспечивает высокую сохранность ГСК и их функциональных свойств при проведении АутоТГСК.

Применение предлагаемого метода позволяет усовершенствовать работу в специализированных лечебно-профилактических учреждениях, использующих при лечении онкогематологических заболеваний АутоТГСК.

**Приложение А**  
(рекомендуемое)

**Перечень оборудования и расходных материалов для регистратуры.**

**Требования к персоналу**

Перечень оборудования:

- термоконтейнер для транспортировки компонентов крови;
- устройство мониторинга температуры в термоконтейнере;
- лоток медицинский для контейнера с материалом;
- компьютер с программным обеспечением, позволяющим использовать систему автоматической идентификации;
- сканер для считывания штрих кода;
- термотрансферный принтер.

Перечень расходных материалов:

- медицинские перчатки;
- дезинфицирующий раствор.

Требования к персоналу регистратуры:

- медицинская сестра;
- врач-трансфузиолог.

**Приложение Б**  
(рекомендуемое)

**Перечень оборудования и расходных материалов для гематологической  
и культуральной лабораторий. Требования к персоналу**

Перечень оборудования:

- проточный цитофлуориметр;
- вортекс;
- калиброванные пипеточные дозаторы разного объема;
- микроскоп;
- камера Горяева для подсчета клеток крови;
- инвертируемый микроскоп;
- бокс биологической безопасности 2-го класса;
- CO<sub>2</sub>-инкубатор.

Перечень расходных материалов:

- наконечники для пипеточных дозаторов;
- набор реагентов для определения ГСК методом проточной цитометрии;
- набор реагентов для оценки пролиферативного потенциала ГСК методом культивирования;
- чашки культуральные;
- пробирки центрифужные;
- дезинфицирующий раствор.

Требования к персоналу:

- врач клинической лабораторной диагностики;
- медицинский лабораторный техник.

**Приложение В**  
(рекомендуемое)

**Перечень оборудования и расходных материалов для асептического помещения.**

**Требования к персоналу**

Перечень оборудования:

- бокс биологической безопасности 2-го класса;
- аппарат для соединения магистралей;
- аппарат для запаивания магистралей;
- фармацевтический холодильник;
- запаиватель пакетов.

Перечень расходных материалов:

- стерильные перчатки;
- раствор медицинский антисептический;
- салфетки медицинские антисептические;
- салфетки стерильные;
- дезинфицирующий раствор;
- перекись водорода 3%;
- шприцы стерильные разовые (20 и 50 мл – по 5 - 6 шт.);
- комплект стерильной одноразовой медицинской одежды;
- криопротектор – ДМСО;
- криопакет;
- магистраль стерильная;
- коннектор для инфузионных систем с соединением Луер-Лок

Требования к персоналу:

- врач-трансфузиолог;
- медицинская сестра со специализацией по трансфузиологии.

## **Приложение Г**

(рекомендуемое)

### **Перечень оборудования и расходных материалов для криохранилища.**

#### **Требования к персоналу**

Перечень оборудования:

- программный криозамораживатель;
- хранилище криогенное;
- защитный комплект в составе: криоперчатки, лицевой щиток, фартук;
- газоанализатор кислородный.

Перечень расходных материалов:

- медицинские перчатки;
- дезинфицирующий раствор.

Требования к персоналу:

- врач-трансфузиолог;
- инженер-медтехник.

## Библиография

- [1] Пушкарь Н.С., Шраго М.И., Белоус А.М. Криопротекторы.– Киев: Наук. думка,1978. – 204 с.
- [2] Криоконсервация и криохранение стволовых клеток в банках пуповинной крови и костного мозга / А.Б. Смолянинов, Г.Н. Кованько, Ш.М. Багаутдинов и др.//Вестник Международной академии холода. – 2009. – №2. – С. 34-38.
- [3] Цунаева А.А., Аграненко В.А., Федорова Л.И. Криоконсервирование клеточных суспензий. – Киев: Наук. думка, 1983. –240 с.
- [4] Белоус А.М. Проблемы криобиохимии мембранных структур //Проблемы криобиологии. – 1997. – №1-2. – С. 19-23.
- [5] Жмакин А.И. Физические основы криобиологии //Успехи физических наук. – 2008. – Т. 178, №3. – С. 243-266.
- [6] Антонов В.Ф. Биофизика мембран //Соросовский образовательный журнал. – 1996. – №6. – С. 4–12.
- [7] Сведенцов Е.П. Криоконсерванты для живых клеток. – Сыктывкар: Коми НЦ УрО РАН, 2010. –80 с.
- [8] Lovelock J. E., Bishop M.W. Prevention of freezing damage to living cells by DMSO // Nature. – 1959. – Vol. 183. – P. 1394-1395.
- [9] Юрченко Т.Н., Козлова В.Ф., Скорняков Б.А.. Влияние криопротекторов на биологические системы. Киев: – Наук. думка, 1989. – 240 с.
- [10] Gurtuvenko A.A., Anwar J. Modulating the structure and properties of cell membranes: the molecular mechanism of action of dimethylsulfoxide //J. Phys. Chem. B. – 2007 – Vol. 6, N. 111. – P. 10453-10460.
- [11] Bakken A.M. Cryopreserving Human Peripheral Blood Progenitor Cells //Current Stem Cell Research & Therapy. – 2006. – №1. – P. 47-54.
- [12] Rowley S.D. Hematopoietic stem cell cryopreservation. A review of current techniques // J Hematother. –1992. – Vol. 1. – P. 233-250.
- [13] Gorlin J. Stem cell cryopreservation //InfusionalChemother. – 1996. – Vol.6. – P. 23-27.
- [14] Optimal cryopreservation of human umbilical cord blood /C.Donaldson, W.J. Armitage, P.A. Denning-Kendall et al. //Bone Marrow Transplant. – 1996. – Vol. 18. – P. 725-731.
- [15] Получение и клиническое применение периферических гемопоэтических стволовых клеток из пуповинной крови /К.М. Абдулкадыров, Н.А. Романенко, Н.Н. Старков и др.// Вопросы онкологии. – 2000. – № 46. – С. 513-520.

[16] Hunt C.J., Armitage S.E., Pegg D.E. Cryopreservation of umbilical cord blood: 2. Tolerance of CD34(+) cells to multimolar dimethyl sulphoxide and the Effect of cooling rate on recovery after freezing and thawing. //Cryobiology. – 2003. – Vol. 46. – P. 76-87.

[17] Влияние предварительного охлаждения на эффективность криоконсервации ГСК / Е.В. Коротаяев, А.А. Степанов, В.И. Рабиновичи др.//Вестникгематологии. – 2014. – №3. – С. 33.

[18] Cryopreservation of Hematopoietic Stem Cells / D. Berz, M. Elise, McCormack et al.//American Journal of Hematology. – 2007. – Vol. 82 – P. 463-472.

[19] Analysis and cryopreservation of hematopoietic stem and progenitor cells from umbilical cord blood / T. Meyer, B. Hofmann, J. Zaissere et al. // Cytotherapy. – 2006. – Vol. 8. – P. 265-76.

[20] Effect of cryopreservation on the immunogenicity of umbilical cord blood cells / N. Ketheesan, C. Whiteman, AB. Malczewskiet al. // TransfusApher Sci. – 2004. – Vol.30. – P. 47-54.

[21] Autologous bone marrow transplantation using unfractionated cells cryopreserved in dimethylsulfoxide and hydroxyethyl starch without controlled-rate freezing /P.J. Stiff, A.R. Koester, M.K. Weidner et al. //Blood. – 1987. – Vol. 70. – P. 975-978.

[22] The effects of a simplified method for cryopreservation and thawing procedures on peripheral blood stem cells /Y. Katayama, T. Yano, A. Bessho et al. // Bone Marrow Transplant. – 1997. – Vol. 19. – P. 283-287.

[23] Fleming K.K., Hubel A. Cryopreservation of Hematopoietic Stem Cells: Emerging Science, Technology and Issues //Transfus Med Hemother. – 2007. – Vol. 34. – P. 268-275.

[24] Uncontrolled-rate freezing and storage at  $-80^{\circ}\text{C}$ , with only 3.5% DMSO in cryoprotective solution for 109 autologous peripheral blood progenitor cell transplantations/ P. Halle, O. Tournilhac, W. Knopinska-Posluzny et al. // Transfusion. – 2001. – Vol. 41. –P. 467-473.

[25] Cryopreservation of hematopoietic progenitor cells with 5-percent dimethyl sulfoxide at  $-80$  degrees C without rate-controlled freezing /A. Galmes, J. Besalduch, J. Bargay et al. // Transfusion. – 1996. – Vol. 36. –P. 794-797.

[26] Controlled-rate versus uncontrolled-rate cryopreservation of peripheral blood progenitor cells: a prospective multicenter study / Perez-Oteyza, R. Bornstein, M. Corral et al. // Haematologica.–1998. – Vol. 83. – P. 1001-1005.

[27] The cryopreservation protocol optimal for progenitor recovery is not optimal for preservation of marrow repopulating ability / B. Balint, Z. Ivanović, M. Petakovet al.// Bone Marrow Transplant. – 1999. – Vol. 23. – P. 613-619.



[28] Montanari M., Capelli D. Long-term hematologic reconstitution after autologous peripheral blood progenitor cell transplantation: a comparison between controlled-rate freezing and uncontrolled-rate freezing at 80°C // *Transfusion*. – 2003. – Vol. 43. – P. 42-49.

[29] The viability of cryopreserved PBPC depends on the DMSO concentration and the concentration of nucleated cells in the graft / K. Liseth, J.F. Abrahamsen, S. Bjorsvik et al. // *Cytherapy*. – 2005. – Vol. 7. – 328-333.

[30] Effect of cell concentration on bone marrow and peripheral blood stem cell cryopreservation / S.D. Rowley, W.I. Bensinger, T.A. Gooley et al. // *Blood*. – 1994 – Vol. 83 – P. 2731-2736.

[31] Методы получения стволовых клеток у больных и доноров для их последующей трансплантации: Пособие для врачей / Л.М. Фрегатова, Л.С. Зубаровская, М.А. Эстрина и др. СПб: изд-во СПбГМУ, 2004. – 36 с.

[32] Оптимизация процесса введения ДМСО в трансплантационный материал при высоком гематокрите / А.А. Степанов, Е.В. Коротаев, С.С. Бессмельцев и др. // *Гематология и трансфузиология*. – 2014. – Т. 59, №1. – С. 121.

[33] Заготовка трансплантата для аутологичной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток онкогематологическим больным: частота и причины неудачных сборов / С.В. Грицаев, А.А. Кузьева, С.В. Волошин и др. // *Онкология*. – 2013. – №1. – С. 30-36.

[34] Бессмельцев С.С. Множественная миелома (лечение первичных больных): обзор литературы и собственные данные. Часть II // *Клиническая онкогематология*. – 2013. – Т. 6. – №4. – С. 379-414.

[35] Quality assessment of CD34<sup>+</sup> stem cell enumeration: experience of the United Kingdom National External Quality Assessment Scheme (UK NEQAS) using a unique stable whole blood preparation / D. Barnett, V. Granger, I. Stirie et al. // *British Journal of Haematology*. – 2001. – 553-565.

[36] Analysis of variation in results of CD34<sup>+</sup> hematopoietic progenitor cell enumeration in a multicenter study / J.W. Gratama, J. Kraan, W. Levering et al. // *Cytometry*. – 1997. – N.30. – P. 109-117.

[37] Flow cytometry for the clinical estimation of circulating hematopoietic progenitors for autologous transplantation in cancer patients / S. Siena, M. Bregni, B. Brando et al. // *Blood*. – 1991 – Vol. 77 – P. 400-409.

[38] Verwer B.J., Ward D.M. An automated classification algorithm for ProCount flow cytometric acquisition and analysis // *Journal of Hematotherapy*. – 1997. – N.6. – P. 169.

[39] Maryman H.T. Cryoprotective agents: A review // *Cryobiology*. – 1971. – Vol.3, №2. – P. 173-183.