

ГЕМОПОЕТИЧНА ТКАНИНА ПУПОВИННОЇ КРОВІ: КРІОКОНСЕРВУВАННЯ ЗА ВДОСКОНАЛЕНОЮ ТЕХНОЛОГІЄЮ

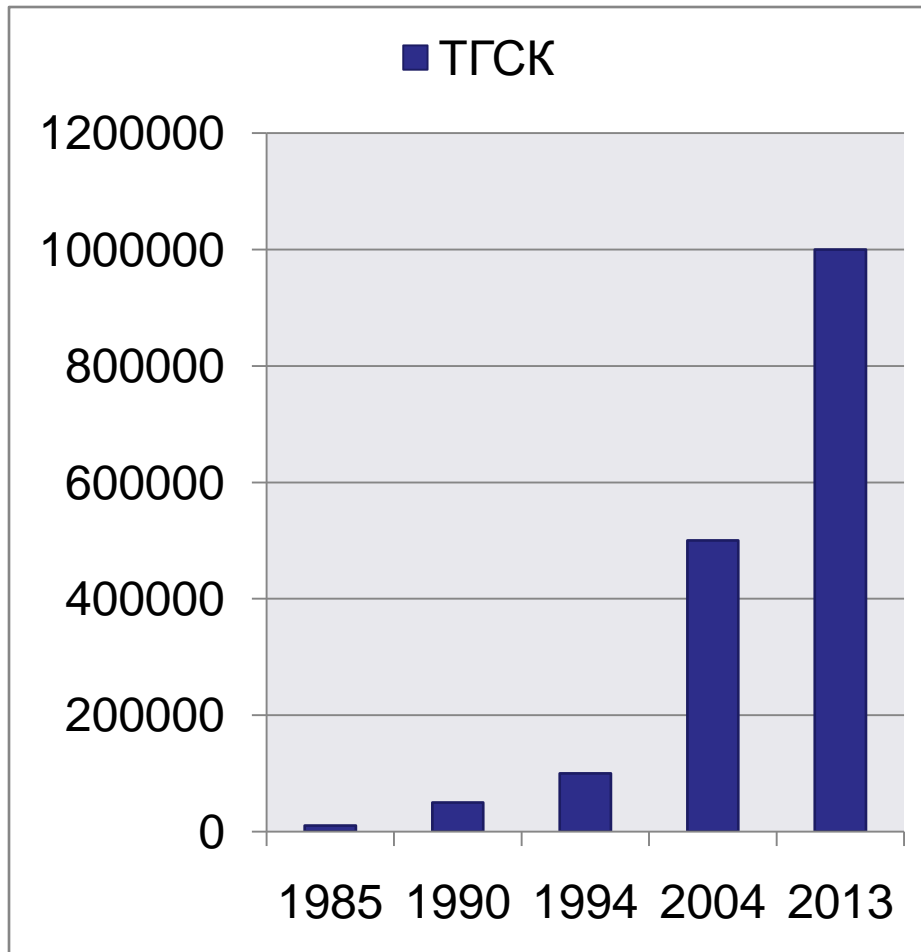
Калиниченко Т.О., Аношина М.Ю.

ДУ „Інститут гематології
та трансфузіології НАМН України”, м. Київ

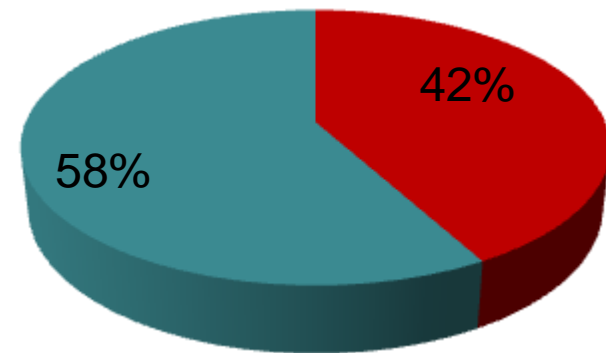
Всесвітня організація охорони здоров'я
визнала трансплантацію гемопоетичної тканини
глобальним завданням

- «Трансплантація подовжила життя, та підвищила його якість сотням тисяч пацієнтів по всьому світу. Вона має стати стандартом лікування для більшості пацієнтів і не повинна бути прерогативою для заможних країн та окремих осіб», - сказав Luc Noël, M.D., ВООЗ

Огляд активності трансплантацій у світі (за даними Worldwide Network for Blood and Marrow Transplantation (WBMT))

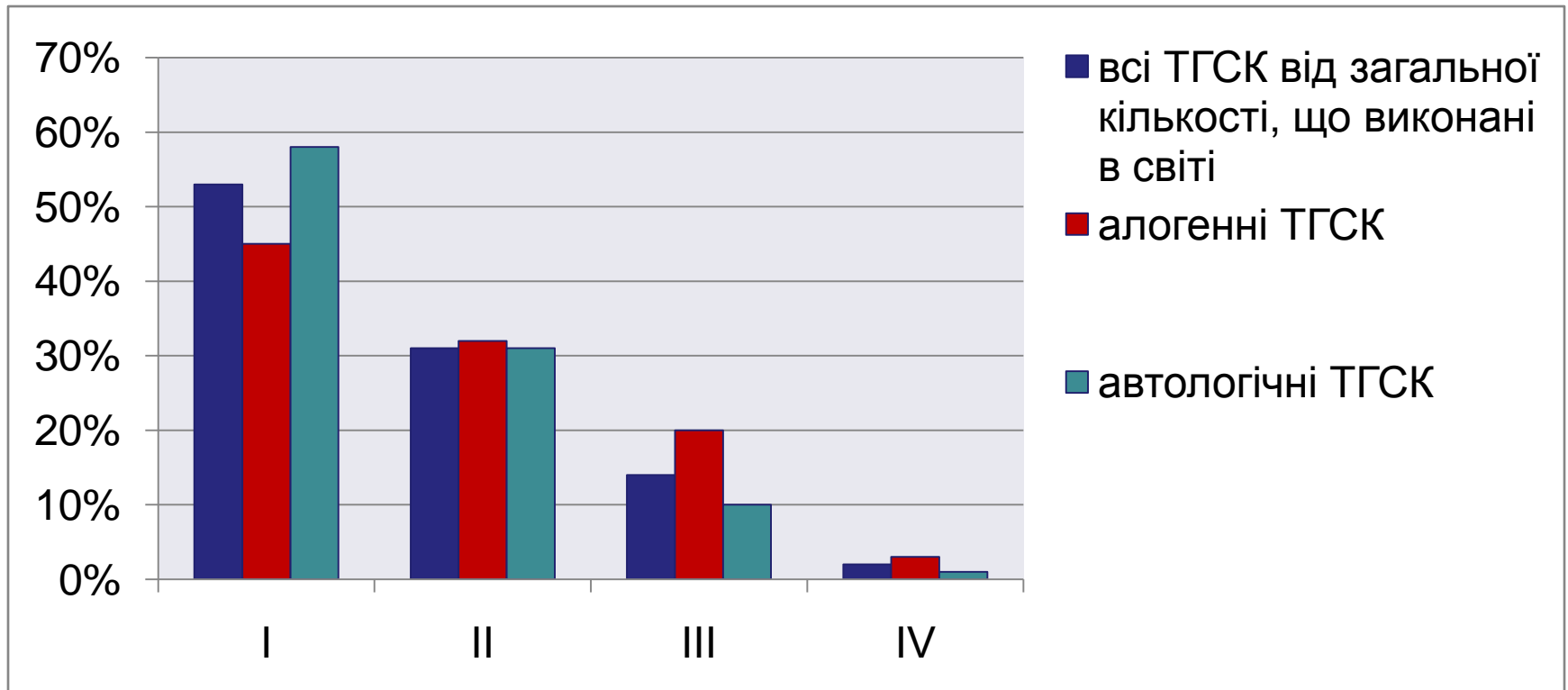


співвідношення виконаних у світі ТГСК



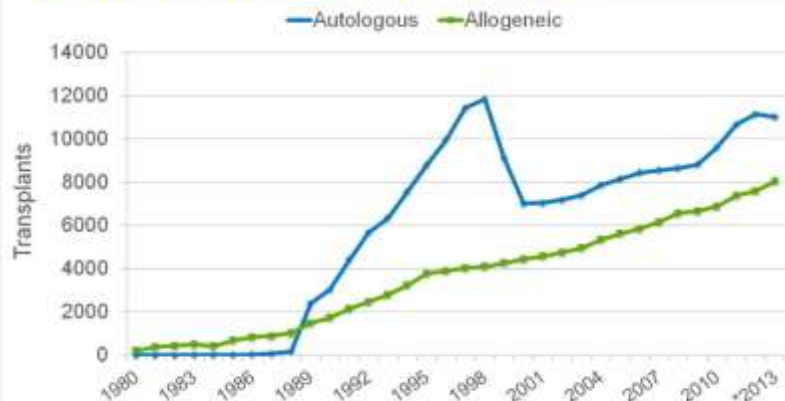
■ алогенні ■ автологічні

Огляд активності трансплантацій у світі (за даними Worldwide Network for Blood and Marrow Transplantation (WBMT))



I- Європа; II – Америка; III – Австралія;
IV – Східне Середземномор'я і Африка

Annual Number of Transplant Recipients in the US by Transplant Type



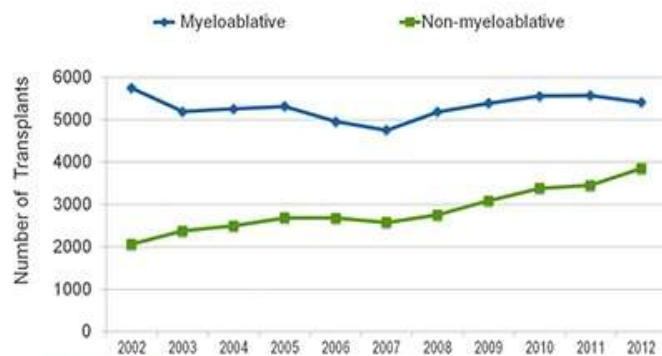
* 2013 Data incomplete 3

Transplant Recipients in the US, by Transplant and Donor Type



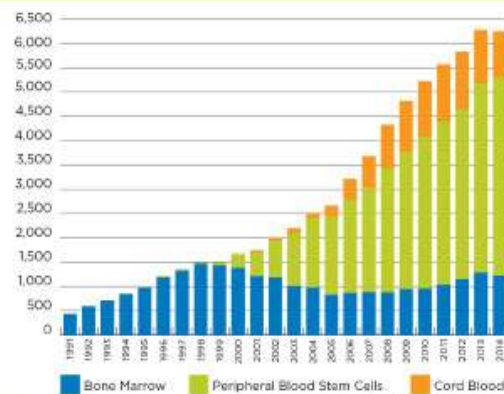
* 2013 Data incomplete 4

Allogeneic Transplants Registered with the CIBMTR



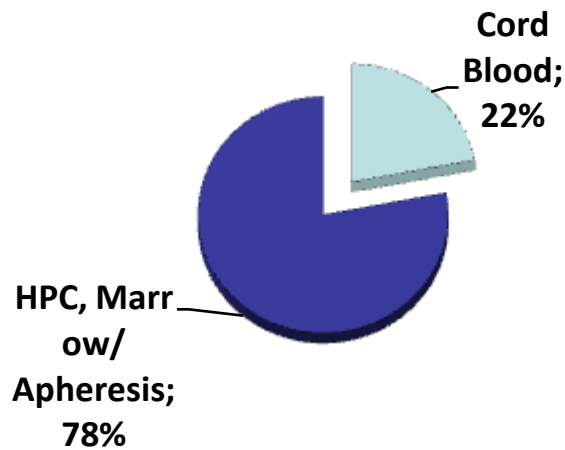
by Conditioning Regimen Intensity

Transplants by Cell Source



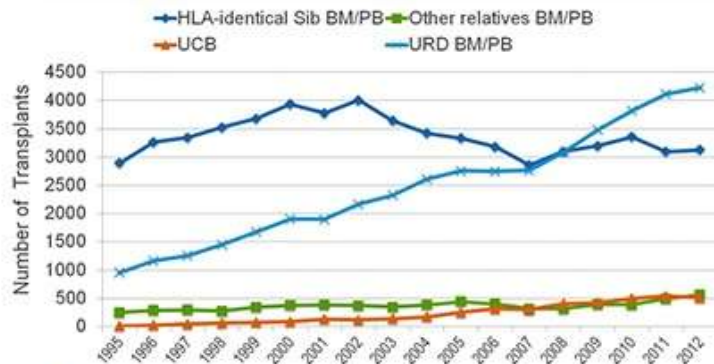
Source: National Marrow Donor Program/Be The Match FY 2014

(дані Національної програми донорів кісткового мозку (NMDP) США)



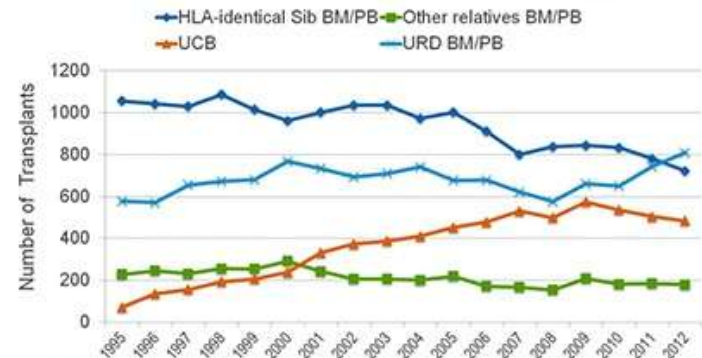
Неродинні трансплантації SGK (дані WBMT)

Allogeneic Transplants for Age > 20 years, Registered with the CIBMTR



by Donor Type and Graft Source not including Twins

Allogeneic Transplants in Patients ≤ 20 Years, Registered with the CIBMTR



by Donor Type and Graft Source not including Twins

Національні реєстри донорів гемопоетичної тканини – інформаційні бази, що містять дані:

- про добровільних донорів (індивідуальний код, особисті дані, HLA –фенотип, маса тіла, зріст, інформація про стан здоров'я на момент вступу до бази реєстру, контактні дані);
- про кріоконсервані зразки гемопоетичної тканини пуповинної крові, що зберігаються у некомерційних донорських банках - складових національних донорських реєстрів

Реєстри донорів гемопоетичної тканини існують вже більше 25 років



Вони поєднані у Міжнародну пошукову систему донорів кісткового мозку (Bone Marrow Donors Worldwide (BMDW)).

• Складовими її є:

- понад 70 **реєстрів донорів** стовбурових клітин з 50 країн;
- понад 50 **банків пуповинної крові** з 31 країни.

Це складає:

- Загалом – **26720071** (26036328 донорів і 683743 зразків пуповинної крові).
- **2,5 %** від всього донорського ресурсу складають зразки ПК, що зберігаються у суспільних банках



**Е. Глюкман, Х. Броксмейер та перший пацієнт,
що був вилікуваний від анемії Фанконі
трансплантацією пуповинної крові**

General data base overview

Eurocord registry database*

	N or %
Transplant cases / single% / double%	11 818 / 61% /24%
Countries	53
Transplant centres / EBMT centres %	601 / 314 (48%)
Unrelated transplant cases	93%
Children transplant cases	53%

* Data available by December 31, 2014

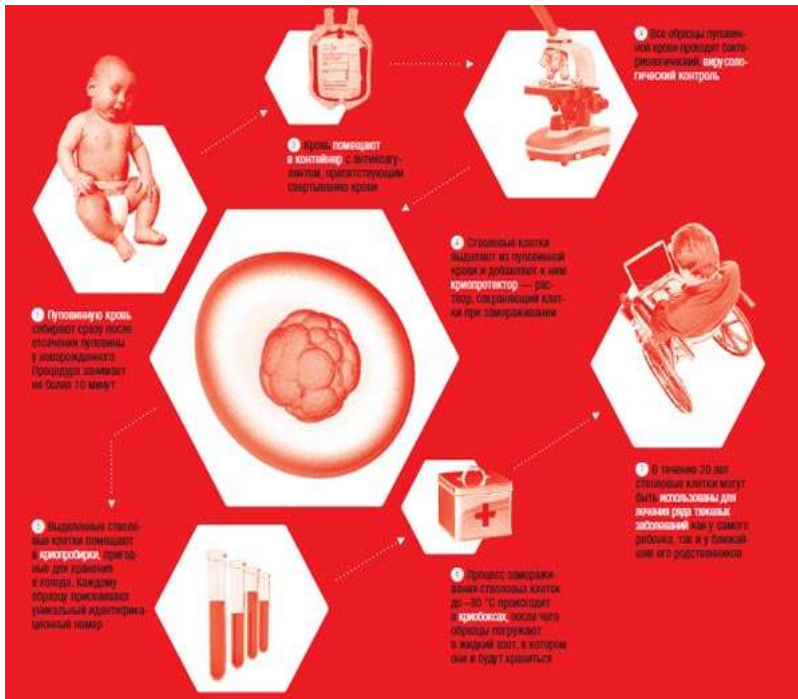
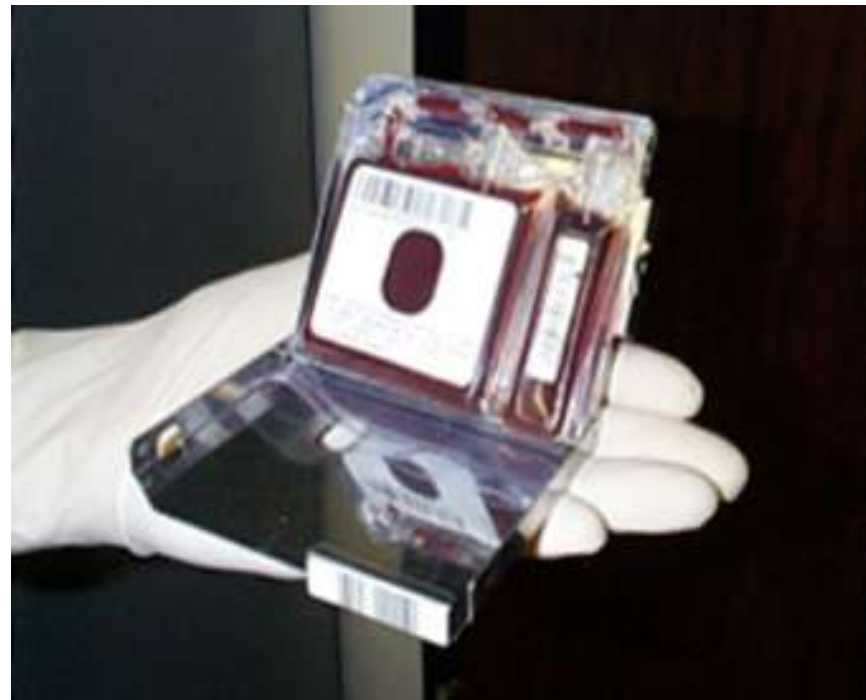


фото: SHUTTERSTOCK

- Технологія отримання та використання клітин ПК у декілька разів дешевша і простіша, ніж процедура пошуку донора та отримання донорської гемопоетичної тканини

Для функціонування суспільних (некомерційних) донорських банків ГТ є важливим не тільки створення належних умов відновлення функціональної життєздатності клітин трансплантата, а і врахування економічної складової при здійсненні технології кріоконсервування



заготівля пуповинної крові
(NEW YORK BLOOD CENTER)

Мета дослідження

- **Зберегти трансплантаційний потенціал гемопоетичної тканини пуповинної крові при кріоконсервуванні за спрощеною технологією**

Об'єкт дослідження – суспензія ядровмісних клітин (ЯВК) пуповинної крові (ПК)

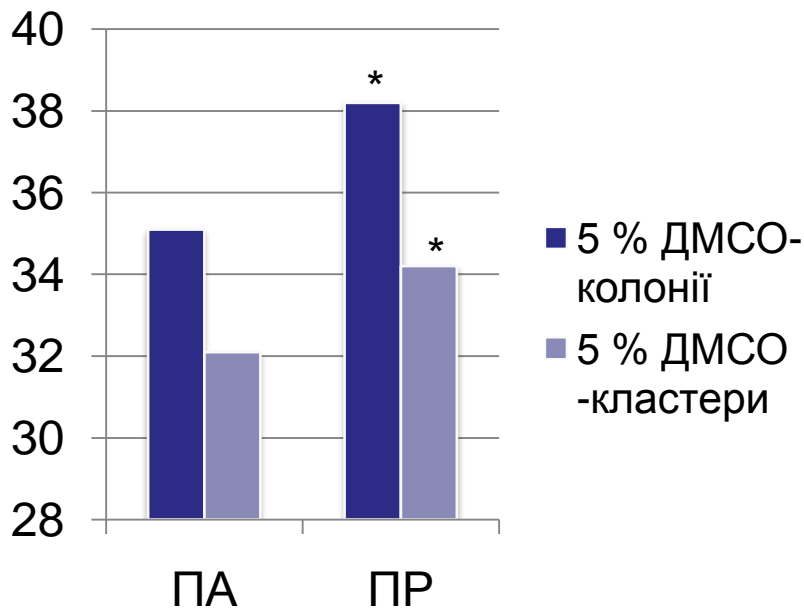
Методи:

- Морфологічні
- Біохімічні (показники активності перекисного окислення (ПОЛ) нейтральних ліпідів і фосфоліпідів за концентрацією дієнових кон'югатів (ДК), триєнових кон'югатів (ТК), оксодієнових кон'югатів (ОДК), кінцевих продуктів типу основ Шифа (ШО) і субстратів ПОЛ (вміст ізольованих подвійних зв'язків (ІПЗ))
- Функціональні (проліферативна функція попередників гемопоезу (КУО-ГМ) в культурі тканини)

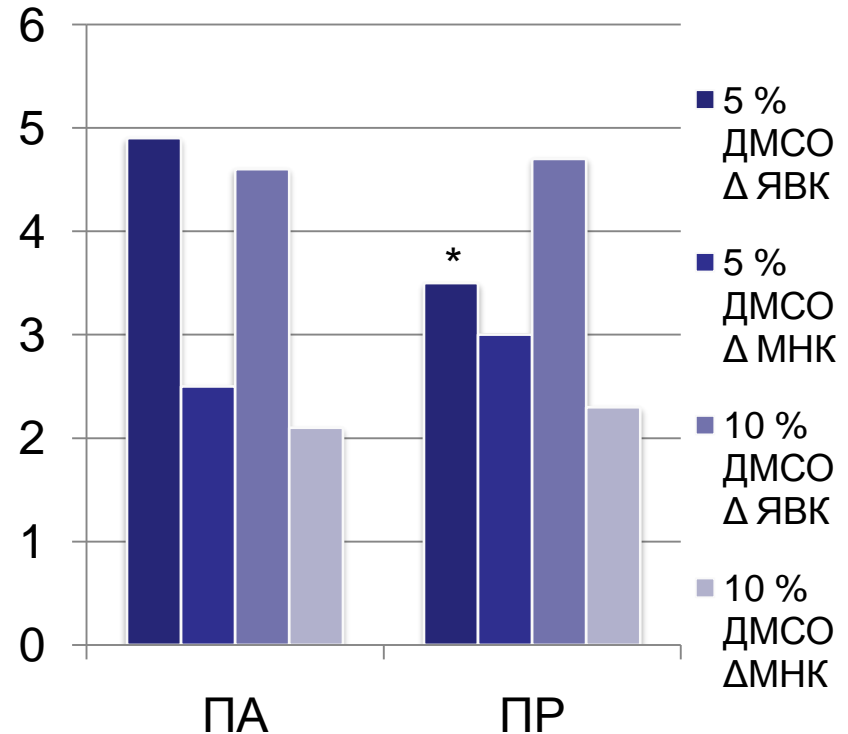
- **Глибоке заморожування ЯВК ПК проводили з використанням двохетапних програм:**
- **1. У програмному заморожувачі УОП-6 (вир. Харків) (I етап - від 10 °С до мінус 80 °С зі швидкістю 1 °С/хв, II етап – занурення рідкий азот до мінус 196 °С) – (ПР).**
- **2. У парах рідкого азоту (I етап - від 10 °С до мінус 156 °С зі швидкістю 1 °С/хв, II етап – занурення рідкий азот до мінус 196 °С) – (ПА).**
- **під захистом кріопротектора ДМСО у розчині «Реополіглюкін» в кінцевих концентраціях 5 або 10 %.**
- **У якості добавок з антиоксидантними властивостями застосовували суміш мембранопротектора ДІАЛІПОН (ОАО «Фармак», Україна) з комбінацією вітамінів-антиоксидантів групи «В»(Nerviplex, Janssen Pharmaceutica, Бельгія) у 4-х різних концентраціях**

Програма з використанням неконтрольованих швидкостей охолодження у парах рідкого азоту достовірно краще зберігає клітини-попередники гемопоезу, а також мононуклеари при застосуванні кріозахисної концентрації ДМСО - 10 %, порівняно з концентрацією 5 %.

Кількість гранулоцитарно-макрофагальних клітин-попередників у розмороженій ПК (за даними В.В. Балан) ($\cdot 10^5$) (n=15)

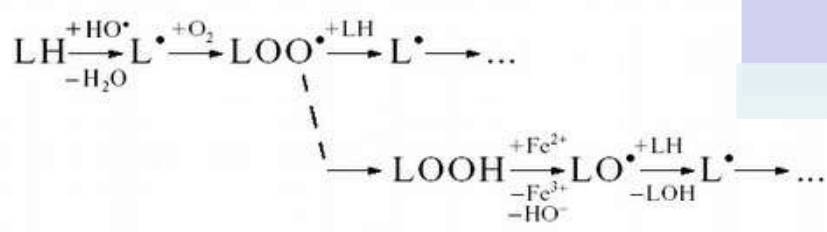
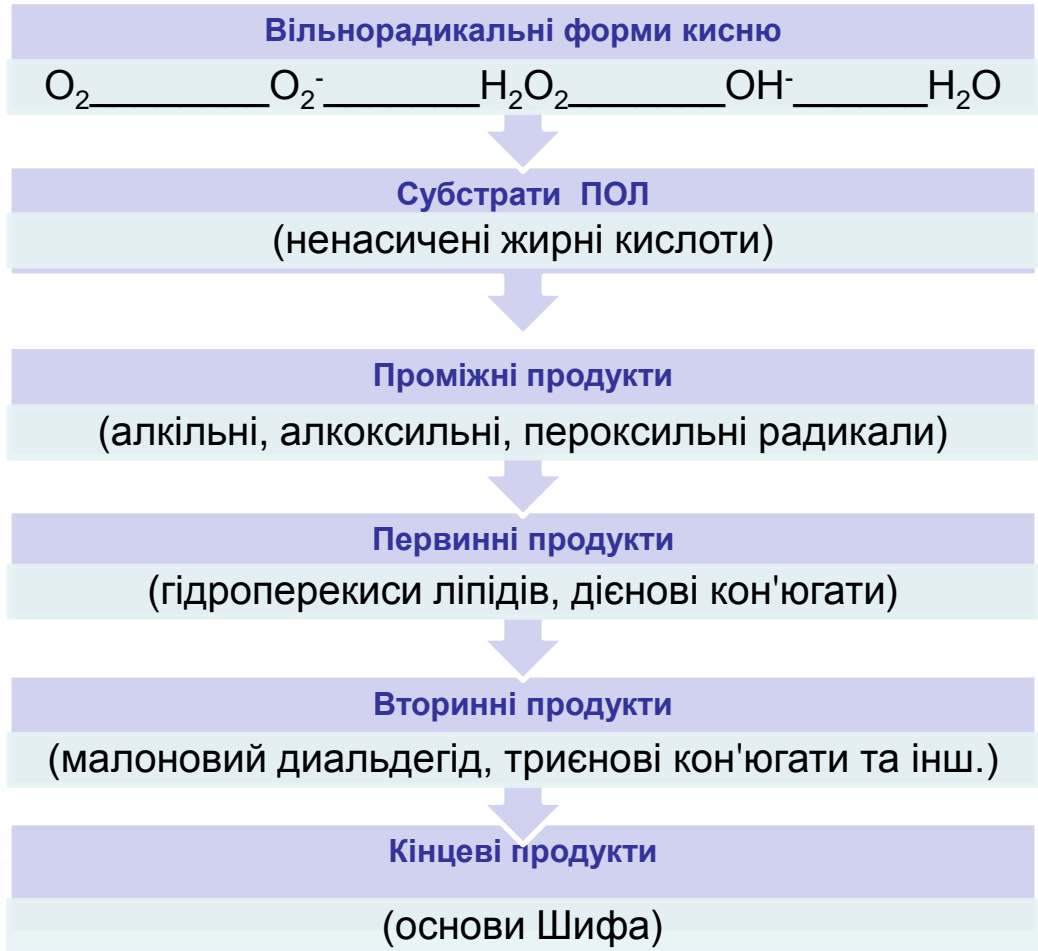
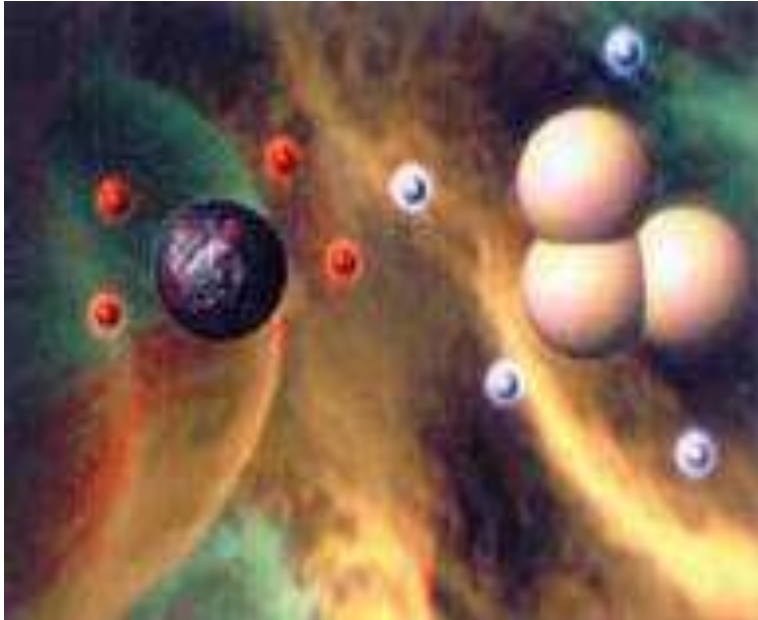


Втрата ядерних (ЯВК) та мононуклеарних (МНК) клітин в процесі заморожування (%) (n=15)



* - вірогідна різниця між показниками 1 (ПА) і 2 (ПР) категорій

Стан клітинних мембран опосередковано характеризується активністю процесів ПОЛ в суспензії, що розкриває ступінь збалансованості анти- та прооксидантних процесів.



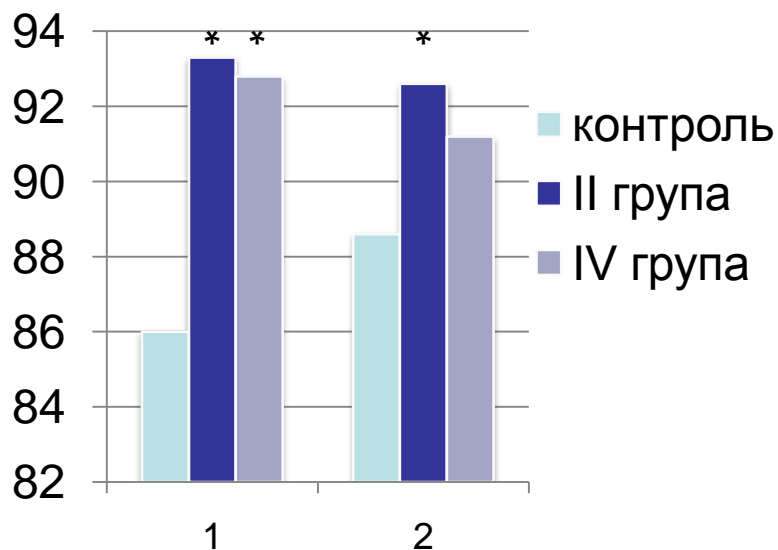
Вплив заморожування на перекисне окислення ліпідів (ПОЛ) у зразках ЯВК ПК при застосуванні 5 % ДМСО (¹⁻¹⁰ - p<0,001)

Показник и ПОЛ (од. на 1·10 ⁶ ЯВК)	Нейтральні ліпіди		Фосфоліпіди	
	Клітинна суспензія з кріопротекто- ром перед заморожуван- ням	Клітинна суспензія після відігріву	Клітинна суспензія з кріопротекто- ром перед заморожуван- ням	Клітинна суспензія після відігріву
Ізольовані подвійні зв'язки	0,890±0,104	1,095±0,109 ¹	5,575±0,511	6,562±0,612 ⁶
Дієнові кон'югати	0,222±0,029	0,397±0,056 ²	1,820±0,202	2,045±0,195 ⁷
Триєнові кон'югати	0,043±0,006	0,095±0,015 ³	0,195±0,022	0,262±0,029 ⁸
Оксоді- єнові кон'югати	0,043±0,006	0,092±0,015 ⁴	0,148±0,016	0,205±0,023 ⁹
Основи Шифа	0,012±0,001	0,016±0,002 ⁵	0,045±0,006	0,069±0,010 ¹⁰

Додавання до суспензії ЯВК ПК на підготовчому до криоконсервування етапі (за 10 хвилин до введення розчину ДМСО) суміші антиоксидантів-мембранопротекторів (аналога α -ліпоєвої кислоти і вітамінів-антиоксидантів групи «В») у фізіологічних концентраціях позитивно впливає на морфологічні та функціональні характеристики розморожених зразків, а також сприяє зниженню активності процесів ПОЛ.

Життєздатність

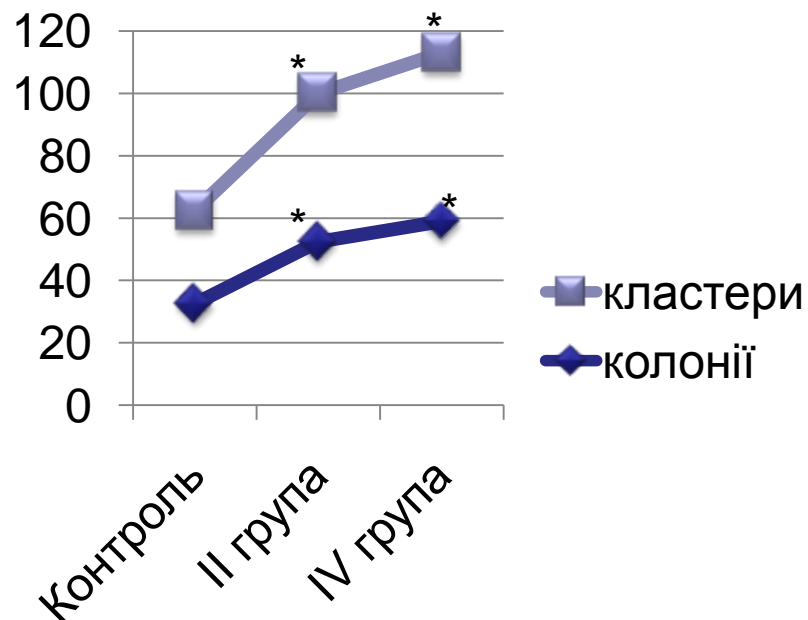
(%)



1- стійкість мембран;

2 – Ann V та Pi – негативні клітини

Показники культивування гранулоцитарно-макрофагальних клітин-попередників гемопоезу розмороженої ПК (дані В.В. Балан) ($\cdot 10^5$) (n=15)



* - вірогідна різниця у порівнянні з контролем

Зміни показників ПОЛ у зразках ЯВК ПК при заморожуванні двома способами (1- вірогідна різниця показників до та після заморожування)

Показники ПОЛ (од. на $1 \cdot 10^6$ ЯВК)	Нейтральні ліпіди		Фосфоліпіди	
	Клітинна суспензія з кріопротектором	Клітинна суспензія з кріопротектором і сумішшю антиоксидантів	Клітинна суспензія з кріопротектором	Клітинна суспензія з кріопротектором і сумішшю антиоксидантів
Δ ІПЗ	0.205 ¹ (↑)	0.037 ¹ (↑)	0.987 ¹ (↑)	0.085 (↑)
Δ ДК	0.171 ¹ (↑)	0.005 (↑)	0.225 ¹ (↑)	0.037 (↓)
Δ ТК	0.052 ¹ (↑)	0.001 ¹ (↑)	0.067 ¹ (↑)	0.011 (↑)
Δ ОДК	0.049 ¹ (↑)	0.000	0.057 ¹ (↑)	0.012 (↑)
Δ ШО	0.004 ¹ (↑)	0.000	0.016 ¹ (↑)	0.016 (↑)

ВИСНОВКИ

Використання антиоксидантів при вдосконаленні технології викликає ефект зменшення впливу факторів стрес – індукованого запуску кріопошкодження клітин.

Такий підхід є перспективним з точки зору спрощення технологічного процесу, що полягає у можливості:

- відмови від програмованого заморожування з використанням складного високовартісного обладнання;
- скорочення витрат кріопротектора;
- спрощення процедури розморожування за рахунок відмови від стадії видалення кріопротектора при застосуванні ДМСО у низькій концентрації

В Україні існує необхідність створення мережі суспільних (громадських) донорських банків пуповинної крові державної або муніципальної форми власності

Таке поповнення “Всеукраїнського реєстру донорів кісткового мозку” дозволить увійти до міжнародного реєстру донорів гемопоетичних стовбурових клітин

Дякую за увагу