

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ
УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель министра

_____ Р.А. Часнойть

26 марта 2010 г.

Регистрационный № 008-0210

**ПРОЦЕССИНГ, КРИОКОНСЕРВИРОВАНИЕ И РАЗМОРАЖИВАНИЕ
ТРАНСПЛАНТАТА ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК
У ПАЦИЕНТОВ С РАССЕЯННЫМ СКЛЕРОЗОМ**

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЯ-РАЗРАБОТЧИКИ:

УО «Белорусский государственный медицинский университет»,
Республиканский центр трансплантологии и клеточных биотехнологий
УЗ «9-я городская клиническая больница»

АВТОРЫ:

д-р. мед. наук., проф. А.С. Федулов,

д-р. мед. наук, проф. А.Л. Усс,

д-р. мед. наук В.А. Змачинский,

С.И. Дрык,

канд. мед. наук А.В. Борисов,

канд. мед. наук Н.Ф. Миланович,

Л.С. Дражина, А.Г. Байда,

канд. мед. наук П.Б. Мицкевич,

Я.М. Мотузова, В.В. Смольникова,

Н.С. Соловьева.

Минск 2009

Инструкция содержит клинические рекомендации по процессингу, криоконсервированию и размораживанию трансплантата гемопоэтических стволовых клеток для их аутологичной трансплантации лицам, страдающим фармакорезистентными формами рассеянного склероза.

Инструкция предназначена для врачей-неврологов, гематологов, трансплантологов. Область применения: неврология, трансплантология. Уровень внедрения: специализированные отделения.

Инструкция разработана в рамках темы-задания 01.32: Государственной научно-технической программы: «Лечебные и диагностические технологии» (№ гос. регистрации 20047431).

ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Проведение аутологичной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток крови (далее АТГСКК) пациентам с фармакорезистентными формами рассеянного склероза (далее РС).

ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ

1. Плазмозэкстрактор.
2. Ламинарный бокс.
3. Центрифуга.
4. Контейнеры стерильные для криоконсервирования.
5. Запаявающее устройство.
6. Программный замораживатель.
7. Кассеты для хранения пакетов с гемопоэтическими стволовыми клетками крови (далее ГСКК).
8. Микропробирки для замораживания микропроб.
9. Диметилсульфоксид (далее ДМСО) высокой очистки (99,0%).
10. Шприцы объемом 50 мл.
11. Культуральная среда 199.
12. Компрессионные сосуды Дьюара с жидким азотом.
13. Тест-наборы для постановки теста на колониобразование.
14. Цитофлуориметр.
15. Флакон для посева на стерильность.

ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ПРЕДЛАГАЕМОГО МЕТОДА

В лаборатории сепарации и криоконсервирования осуществляются:

1. Сепарация ГСКК ручным и автоматическим методами.
2. Контролируемое криоконсервирование ГСКК.
3. Учет и хранение трансплантата ГСКК (хранение осуществляется в компрессионных сосудах Дьюара с жидким азотом).
4. Комплексная оценка качества трансплантата (тесты на жизнеспособность и колониобразование, цитофлуориметрический контроль качества ГСКК, проверка стерильности).

Лаборатория сепарации и криоконсервирования должна оснащаться соответствующим оборудованием (см. выше) и возглавляться квалифицированным врачом лабораторной диагностики.

В отделении трансплантации врачом производится размораживание взвеси ГСКК в водяной бане и трансплантация пациенту с РС.

Процессинг

Сепарация ГСКК может производиться ручным и автоматизированным способами. Предпочтительным является автоматизированное разделение клеток на субпопуляции с помощью сепаратора клеток крови и костного мозга, которое позволяет выделить обогащенную популяцию стволовых клеток и добиться выхода моноклеарных клеток более 90%, колониеобразующей единицы (далее КОЕ) гранулоцитарно-макрофагальной — более 90%, CD34 позитивных клеток — более 80% и достигает степени очистки от эритроцитов до 97%.

Необходимая клеточность для ауотрансплантации стволовых гемопоэтических клеток крови оценивается по содержанию CD34 позитивных клеток в собранном путем цитафереза лейкоконцентрате и должна составлять $> 2 \times 10^8$ на кг веса пациента. При необходимости возможен автоматизированный сбор плазмы. Конструктивные особенности сепараторов крови позволяют процессировать как большие, так и малые объемы ГСКК. Время процедуры составляет 2,5–4,5 часа.

Описание метода

Контейнер с суспензией ГСКК в плазме крови центрифугируют при 2000 об/мин в течение 15 мин при 18°C на рефрижераторной центрифуге.

После центрифугирования контейнер в асептических условиях помещают в плазмоекстрактор и осторожно удаляют избыток плазмы крови. Основная часть выделенных ГСКК остается в контейнере с небольшим количеством плазмы. Из удаленной плазмы крови готовят криоконсервирующий состав.

Методика приготовления криоконсервирующего состава следующая. При температуре 0 °С к 4 объемам аутологичной плазмы крови постепенно добавляют 1 объем криопротектора — очищенного ДМСО (используется готовый раствор степенью очистки 99,0%). Рабочая концентрация ДМСО в криоконсервирующей смеси составляет 20% (по объему). После завершения данного этапа ГСКК готовы к криоконсервированию.

Криоконсервирование

Главный принцип замораживания — постепенное охлаждение в растворе криопротектора. Концентрат ГСКК, оставшийся в контейнере после удаления основного количества плазмы, через один из портов в асептических условиях переносят с помощью стерильного шприца объемом 50 мл в контейнер для криоконсервирования, который маркируют несмываемой водой надписью. Затем к известному объему концентрата ГСКК на ледяной бане (0 °С) добавляют медленно при постоянном перемешивании равный (1:1) объем криоконсервирующей смеси. Конечная концентрация ДМСО в образце — 10%.

Контейнер для криоконсервирования герметически запаивают и помещают в специальную металлическую кассету для последующего заморажи-

вания и хранения. Дополнительно, для возможных исследований, сохраняется небольшой образец выделенных клеток («спутник»), под тем же идентификационным номером. Кассеты с контейнерами для криоконсервирования, а также образец-«спутник», переносят в программный замораживатель. Образцы ГСКК замораживают с использованием следующей программы:

- снижение температуры с +4 °С до -2 °С со скоростью 1 °С/мин.
- с -2 °С до -12 °С — 0,15 °С/мин.
- с -12 °С до -35 °С — 1 °С/мин.
- с -35 °С до -100 °С — 5 °С/мин.

Контейнер с ГСКК после криоконсервирования помещают на временное хранение в компрессионные сосуды Дьюара с жидким азотом. Температура хранения -196 °С.

Размораживание и трансплантация ГСКК

Перед проведением АТГСКК контейнеры извлекаются из хранилища, и трансплантат передается в специализированное отделение, в котором проводится трансплантация ГСК в емкости для транспортировки, предварительно стерилизованной 70% этанолом и заполненной жидким азотом.

В палате к этому времени должна быть приготовлена водяная баня, заполненная стерильной и предварительно нагретой до 43 °С водой. ГСКК размораживаются в водяной бане. После размораживания к контейнеру присоединяется специальная система для трансфузии ГСКК, и клеточная взвесь вводится пациенту внутривенно со скоростью 60 капель/мин. При введении ГСКК осуществляется мониторинг жизненно важных показателей.

ОЦЕНКА КАЧЕСТВА ТРАНСПЛАНТАТА

Контроль качества образцов ГСКК проводится по следующей схеме:

1. До этапа криоконсервирования:

- определяется жизнеспособность в стандартном тесте с трипановым синим;
- подсчитывается концентрация ядродержащих клеток;
- проводится оценка пролиферативного и дифференцировочного потенциала гемопоэтических клеток по их способности к формированию колоний в полутвердых метилцеллюлозных культурах *in vitro*;
- подсчитывается количество CD34 позитивных клеток.

2. После размораживания образцов (из пробирки «спутника»):

- определяется жизнеспособность в стандартном тесте с трипановым синим;
- подсчитывается концентрация ядродержащих клеток;
- проводится оценка пролиферативного и дифференцировочного потенциала гемопоэтических клеток по их способности к формированию колоний в полутвердых метилцеллюлозных культурах *in vitro*;
- подсчитывается количество CD34 позитивных клеток.

Определение жизнеспособности клеток

Жизнеспособность клеток определяют общепринятым методом по исключению трипанового синего. Для этого 20 мкл суспензии исследуемых клеток смешивают с 20 мкл 0,2% раствора трипанового синего, приготовленного на забуференном физиологическом растворе (рН 7,4) с добавлением 0,02% (от объема) азида натрия, и подсчитывают общее число и число живых клеток в камере Горяева.

Оценка колониобразующей способности гемопоэтических клеток

Образование колониобразующих единиц ГСКК исследуют в метилцеллюлозных культурах в присутствии рекомбинантных ростовых факторов.

Трансплантат ГСКК в конечной концентрации 50 тыс./мл суспендируют в метилцеллюлозной среде и помещают в 24-луночные планшеты. После культивирования при 37°C в атмосфере, содержащей 5% CO₂ в течение 14 сут производят учет колоний (бурстобразующие единицы и КОЕ) в соответствии с критериями D. Metcalf.

Анализ количества CD34 позитивных клеток

Определение CD34 позитивных клеток проводится методом прямой иммунофлуоресценции с использованием мышиных моноклональных антител против антигенов лейкоцитов человека.

Количественный анализ экспрессии маркерных антигенов проводят в автоматическом режиме на проточном цитофлуориметре в соответствии с инструкцией к прибору.

ВОЗМОЖНЫЕ ОШИБКИ И ОСЛОЖНЕНИЯ

Контаминация бактериями и/или грибами при несоблюдении стерильности трансплантата.