УДК 62–9

Использование низких температур для хранения биологических продуктов: две концепции криохранения пуповинной крови

Д-р мед. наук **А. Б. СМОЛЯНИНОВ, Д. А. ИВОЛГИН**
Северо-западный государственный медицинский университет им. И. И. Мечникова
Покровский банк стволовых клеток
195067, Санкт-Петербург, Пискаревский пр., 47
Д-р биол. наук **Ш. М. БАГАУТДИНОВ,** *канд. мед. наук* **В. Н. ВЕЛЬЯМИНОВ**
Военно-Медицинская Академия МО РФ, 190013, Санкт-Петербург, Загородный пр., 47
И. С. ТРУКШИН
ООО «Криогентех», 197755, Санкт-Петербург, Лисий Нос, Балтийский пр., 2

В настоящее время существует две методики криохранения биологического материала: двухэтапная и трехэтапная схемы. Двухэтапная стратегия криохранения состоит из криоконсервации с последующим замораживанием и хранением в одном автоматизированном устройстве. Вопрос выбора методики решается индивидуально каждым банком, однако при существующей сегодня экономической ситуации, более экономически целесообразным является трехэтапная методика. В работе были сравнены два метода криоконсервации человеческой пуповинной крови и проанализированы основные преимущества и неудобства этих методов.

Ключевые слова: криоконсервирование, пуповинная кровь, криохранение, криобанк, программируемое замораживание.

Use of low temperatures for storage of biological products: two concepts of cryostorage of an umbilical blood

Dr. of medical sciences **A. B. SMOLYANINOV, D. A. IVOLGIN**
Northwest state medical university of. I. I. Mechnikova,
Pokrovsk bank of stem cells
195067, St. Petersburg, Piskarevsky ave., 47
Dr. biol. sciences **SH. M. BAGAUTDINOV, V. N. VELYAMINOV**
Army medical college of MAUD RF, 190013, St. Petersburg, Zagorodny ave., 47
S. TRUKSHIN
«Kriogentekh», 197755, St. Petersburg, Lisii nos, Baltiysky ave., 2

In this article two methods of cryopreservation of human umbilical cord blood were compared. The main advantages and disadvantages of these methods were analysed taking into account technique and equipment in use in every method.

Keywords: cryopreservation, umbilical cord blood, cryostorage, cryobank, programmed freezing.

Менее чем через год трансплантации пуповинной крови (ПК) как методу лечения различных заболеваний как онкологических, так и неонкологических, исполнится 25 лет. Сегодня это получивший признание метод лечения, по данным только одной международной организации общее количество трансплантаций ПК превысило 8500. Эффективность трансплантации ПК, наряду с другими источниками гемопоэтических стволовых клеток, подтвержденная рядом сравнительных исследований дало толчок организации специализированных учреждений, в которых ПК, собираемая в родовспомогающих учреждениях, специальным образом обрабатывалась и помещалась на длительное хранение.

Первый банк ПК, организованный д-ром Х. Броксмайером, предоставил образец ПК для первой ТПК и для четырех успешных HLA-совмещенных трансплантаций от сиблинга [1–9]. Так как ПК была успешно применена как источник ГПК при родственной трансплантации, стали очевидными и возможности для неродственной трансплантации, обосновывая учреждение банков неродственной ПК [10, 11].

Первый такой банк был организован доктором П. Рубинштейном в Нью-Йоркском Центре Крови в 1992 году [2]. Тогда же началось развитие всех аспектов деятельности банков ПК по сбору, обработке, хранению и использованию ПК, сформулированы вопросы и проблемы, легшие в основу дальнейшего изучения ТПК. Вскоре после этого были организованы банки ПК в Дюссельдорфе, Милане, Париже и других городах [3, 4]. Деятельность по организации банков ПК и методов обработки и хранения ПК проводится также и в Российской Федерации как государственными структурами, расположенными в г. Москве, Санкт-Петербурге, Самаре, так и частными, например такими, как Покровский банк стволовых клеток [9, 11].

В настоящий момент уже накоплен серьезный опыт организации банков ПК и всех процессов, осуществляемых в них [5–8], однако существует еще ряд проблемных вопросов, по поводу которых окончательное мнение еще не сформировалось.

Рис. 1. Роботизированное устройство для замораживания и хранения образцов клеточного концентрата пуповинной крови Bioarchive (США)

Рис. 2. Криопакет с мононуклеарной фракцией пуповинной крови, запаянный в тефлоновый пакет (оберточный мешок), для хранения в при –196 оС в роботизированном устройстве Bioarchive (США)

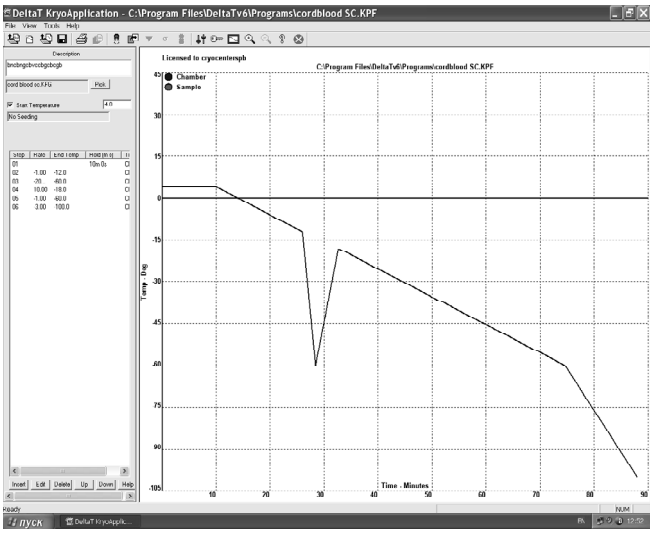


Рис. 3. Кривая замораживания концентрата пуповинной крови для Общественного Регистра доноров пуповинной крови

К одному из таких спорных вопросов относится стратегия подготовки образца к длительному криохранению. Сейчас существуют две такие принципиальные схемы: двухэтапная и трехэтапная. Двухэтапная стратегия криохранения состоит из криоконсервации с последующим замораживанием и хранением в одном автоматизированном устройстве. Примером такой системы может служить роботизированое устройство Bioarchive (Thermogenesis Corp., США), показанное на рис. 1.

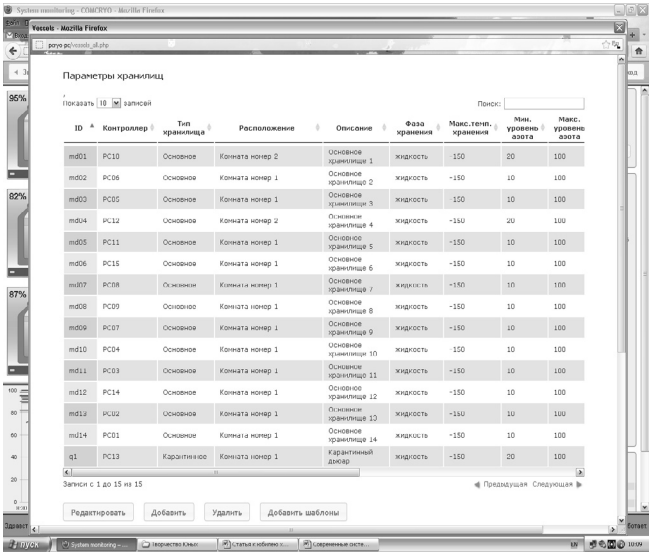
Данное устройство позволяет одновременно хранить более 3000 образцов ПК. Однако, наряду с положительными свойствами, таким как автоматизация процессов, возможность быстрого поиска образцов и индивидуальная температурная история, данная стратегия имеет и ряд недостатков. К ним относятся ограниченность доступа к образцу, невозможность осуществления карантинных мероприятий, так как сразу после замораживания образец автоматически поступает в общее хранилище, большой расход азота. Также, в связи с габаритами установки, для неё требуется специально оборудованное помещение, эвакуация в случае непредвиденных обстоятельств затруднена, стоимость обслуживания также высока. Существенным негативным аспектом, по отзывам зарубежных специалистов, является также и зависимость криобанка от одной компании-производителя (рис. 2).

При трехэтапном криохранении замораживание после криоконсервирования и непосредственно криохранение производится раздельно. Такая методика имеет свои особенности по сравнению с двухэтапной. Например, вместо индивидуальной температурной истории при замораживании как отдельной процедуре доступна только температурная история партии из нескольких образцов ПК. Также, по сравнению с автоматической системой, при трехэтапном криохранении более значим человеческий фактор. Но, наряду с такими особенностями, которые можно отнести к отрицательным, при использовании трехэтапной системы существует и ряд преимуществ. К ним относятся большая доступность к хранящимся образцам, возможность выделить одно криохранилище для карантинного хранения в парах азота, большая подвижность хранилищ и существенно меньшая стоимость обслуживания.

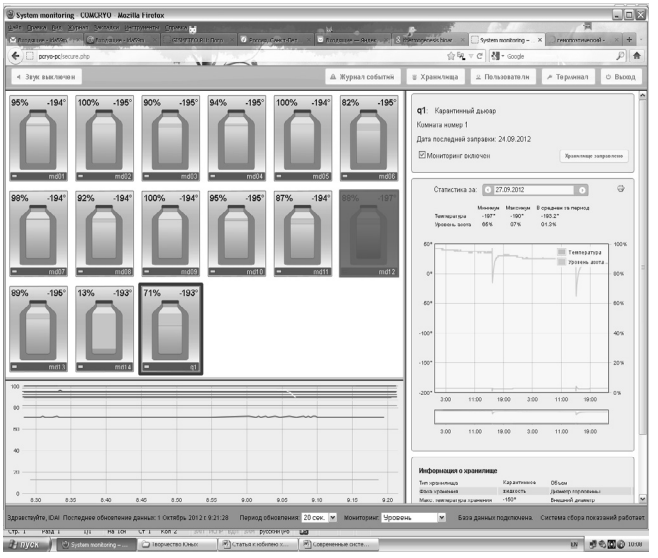
Что касается поиска образцов, то эта проблема в банках, работающих по трехэтапной методике, может решаться за счет установки систем мониторинга и архивирования данных. На сегодняшний день доступен ряд таких коммерческих систем [10, 11].

Примером российского криобанка, работающего по трехэтапной системе «криоконсервация — замо-

а



б



в

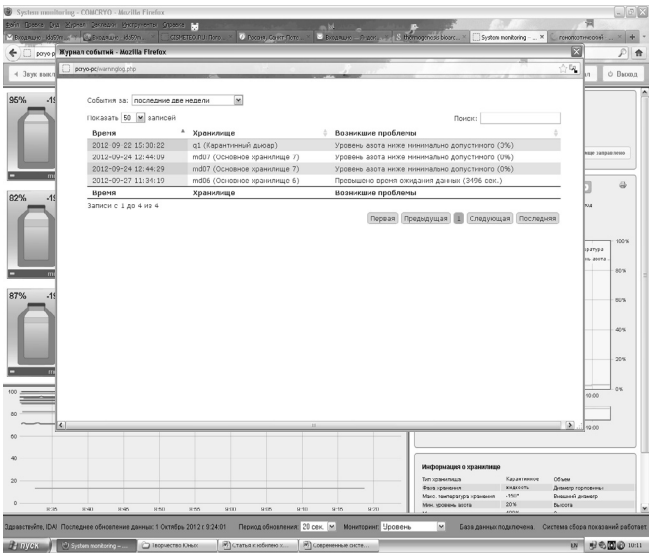


Рис. 4. Система мониторинга и архивации данных «COMCRYO»: а — мониторинг криодьюаров по объему и температуре с графиком построения кривых в режиме реального времени; б — параметры хранилищ; в — журнал событий

раживание — криохранение», может служить, существующий в течение 5 лет в Санкт-Петербурге, Покровский Банк стволовых клеток, чей объем хранения насчитывает уже более 5000 образцов ПК, костного мозга и различных клеточных линий [12, 13].

Суммируя опыт Покровского банка стволовых клеток и НИЛ Клеточных технологий СЗГМУ им. И. И. Мечникова по криоконсервации ГСК из ПК, размораживанию и отмывке клеток от ДМСО различными способами, можно говорить о том, что мы разработали оптимальные для наших условий протоколы криоконсервации и подготовки ГСК ПК к трансплантации.

Криопакет (Pall, США) с концентратом и криопротектором (раствор ДМСО 10%) замораживается и упаковывается в термоусадочный пакет (Thermogenesis, США). Замораживание концентрата осуществляется в программируемом замораживателе Cryo 560–16 (Planer, Великобритания) по следующей схеме (рис. 3), в модификации Покровского банка стволовых клеток (Патент № 416197. Приоритет изобретения от 11 декабря 2009 г.):

Для оптимизации поиска образцов и мониторинга условий хранения Покровский БСК оборудован отечественной системой «COMCRYO» (ООО «Криогентех, Санкт-Петебург) (рис. 4).

Таким образом, сегодня существует две методики криохранения биологического материала, в частности ПК, каждая со своими преимуществами и недостатками. В любом случае вопрос выбора методики решается индивидуально каждым банком, однако при существующей сегодня экономической ситуации, более экономически целесообразным, на наш взгляд, является трехэтапная методика.

Список литературы

1. *Broxmeyer H. E.* Biology of cord blood cells and future prospects for enhanced clinical benefit // Cytotherapy. 2005. Vol. 7. № 3.

2. Stored Placental Blood for Unrelated Bone Marrow Reconstitution/P. Rubinstein [et al.] // Blood. 1993. Vol. 81. № 7.

3. Cord blood banking in London: the first 1000 collections/S. Armitage [et al] // Bone Marrow Transplantation. 1999. Vol. 24. № 2.

4. *Steinbrook R.* The cord blood bank controversies // N. Engl. J. Med. 2004. Vol. 351. № 22.

5. Allogeneic hematopoietic cell transplantation for hematologic malignancy: relative risks and benefits of double umbilical cord blood/C. G. Brunstein [et al.] // Blood. 2010. Vol. 116. № 22.

6. *Kodera Y.* The Japan Marrow Donor Program, the Japan Cord Blood Bank Network and the Asia Blood and Marrow Transplant Registry // Bone Marrow Transplant. 2008. Vol. 42. Suppl. 1–6.

7. Mislabeled units of umbilical cord blood detected by a quality assurance program at the transplantation center/J. McCullough [et al.] // Blood. 2009. Vol. 114. № 8.

8. *Navarrete C.,* Contreras M. Cord blood banking: a historical perspective // British Journal of Haematology. 2009. Vol. 147. № 2.

9. *Тюмина О. В.* Пуповинная кровь. Пуповинная кровь: заготовка, хранение, трансплантация и регенеративная медицина/О. В. Тюмина, О. Г. Хурцилава, А. Б. Смолянинов. — СПб.: Наука, 2012.

10. *Смолянинов А. Б.* Клеточные и регенеративная терапия стволовыми клетками: Пособие для врачей/А. Б. Смолянинов, О. Г. Хурцилава, Д. А. Иволгин [и др.]. — СПб.: СЗГМУ им. И. И. Мечникова, 2012.

11. Выделение и подготовка стволовых клеток пуповинной крови к трансплантации/А. Б. Смолянинов, О. Г. Хурцилава, Д. А. Иволгин [и др.] // Вестник Северо-Западного государственного медицинского университета имени И. И. Мечникова. 2012. Т. 4. №2.

12. *Иволгин Д. А. и др.* Современные способы криоконсервации стволовых клеток пуповинной крови для общественного регистра доноров/Д. А. Иволгин, А. Б. Смолянинов, Ш. М. Багаутдинов, К. В. Коровина, К. В. Шунькина, А. В. Смирнова // Вестник Международной академии холода. 2012. №1.

13. *Иволгин Д. А. и др.* Современные системы IT-мониторинга условий

14. криогенного хранения биологического материала в банке пуповинной крови/Д. А. Иволгин, А. Б. Смолянинов, Ш. М. Багаутдинов, К. В. Коровина, И. С. Трукшин, О. С. Козлов // Вестник Международной академии холода. 2013. №1.

12-я международная специализированная выставка

КРИОГЕН-ЭКСПО
Промышленные Газы

АУДИТ РСВЯ 2012

27-29 ноября 2013, Москва, ЦВК “Экспоцентр”, пав. 5

Организатор
Мир-Экспо
Выставочная компания

Проводится при содействии
- Международного института холода
- Международной академии холода
- Украинской ассоциации производителей технических газов «УА-СИГМА»

ТЕМАТИКА ВЫСТАВКИ:
- криогенное оборудование
- вакуумное оборудование
- насосное, компрессорное и теплообменное оборудование
- микрокриогенная техника
- водородные технологии
- гелиевые технологии
- производство промышленных, редких газов и CO2
- применение криогенных технологий в промышленности
- СПГ-технологии
- метрология и средства измерения при низких температурах
- криогенная арматура, вспомогательное оборудование
- оборудование для хранения, транспортировки и потребления жидкостей и газов
- технологии генерации и использования озона
- on-site технологии, проектирование систем «под ключ»

ДЕЛОВАЯ ПРОГРАММА:
28 ноября 2013
Москва, ЦВК "Экспоцентр"
павильон 5, зал 2

Десятая международная научно-практическая конференция **«Криогенные технологии и оборудование. Перспективы развития»**
Международная конференция **«Промышленные газы»**
Международная конференция **«Сжиженный природный Газ»**

Информационная поддержка:

Дирекция выставки:
Москва, проспект Андропова, 22
Тел/факс: +7 499 618 0565, +7 499 618 3688
E-mail: info@cryogen-expo.ru
Сайт: www.cryogen-expo.ru | Твиттер: @cryoexpo_ru

www.cryogen-expo.ru
www.cryogen-expo.com
Twitter
cryoexpo
cryoexpo_ru