

**ГЕМОПОЭТИЧЕСКИЕ СТВОЛОВЫЕ  
КЛЕТКИ ПУПОВИННОЙ И  
ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ**

**С.А.Румянцев**

# Источники стволовых гемопоэтических клеток

- ✦ Костный мозг
- ✦ Периферическая кровь
- ✦ Пуповинная кровь

# Сбор ГСК пуповинной крови

- ☀ Можно ли забирать у всех?

  - безвозмездное донорство
  - персонифицированное хранение

- ☀ Процедура сбора

- ☀ Доставка к месту обработки

- ☀ Способ обработки

- ☀ Объем и методы тестирования

- ☀ Возможности предтрансплантационного процессинга

# GMP

Требования GMP к сбору и обработке крови и ее компонентов:

- ◆ **Установление научно обоснованных соответствующих**
  - Стандартов
  - Спецификаций
  - Процедур тестирования
  - Идентификации готового продукта по отношению к донору и реципиенту
  
- ◆ **Адекватное мониторингирование и соблюдение вышеперечисленных стандартов**

# РЕГЛАМЕНТИРУЮЩИЕ ДОКУМЕНТЫ

- ✦ Приказ № 325 МЗ РФ от 25.07.2003.
- ✦ Приказ № 702 ДЗМ от 08.12.2003.
- ✦ International standards for cord blood collection, processing, testing, banking, selection and release.  
NetCord/FAHCT, 2006

Можно ли забирать у всех?

Безвозмездное донорство

Персонифицированное хранение

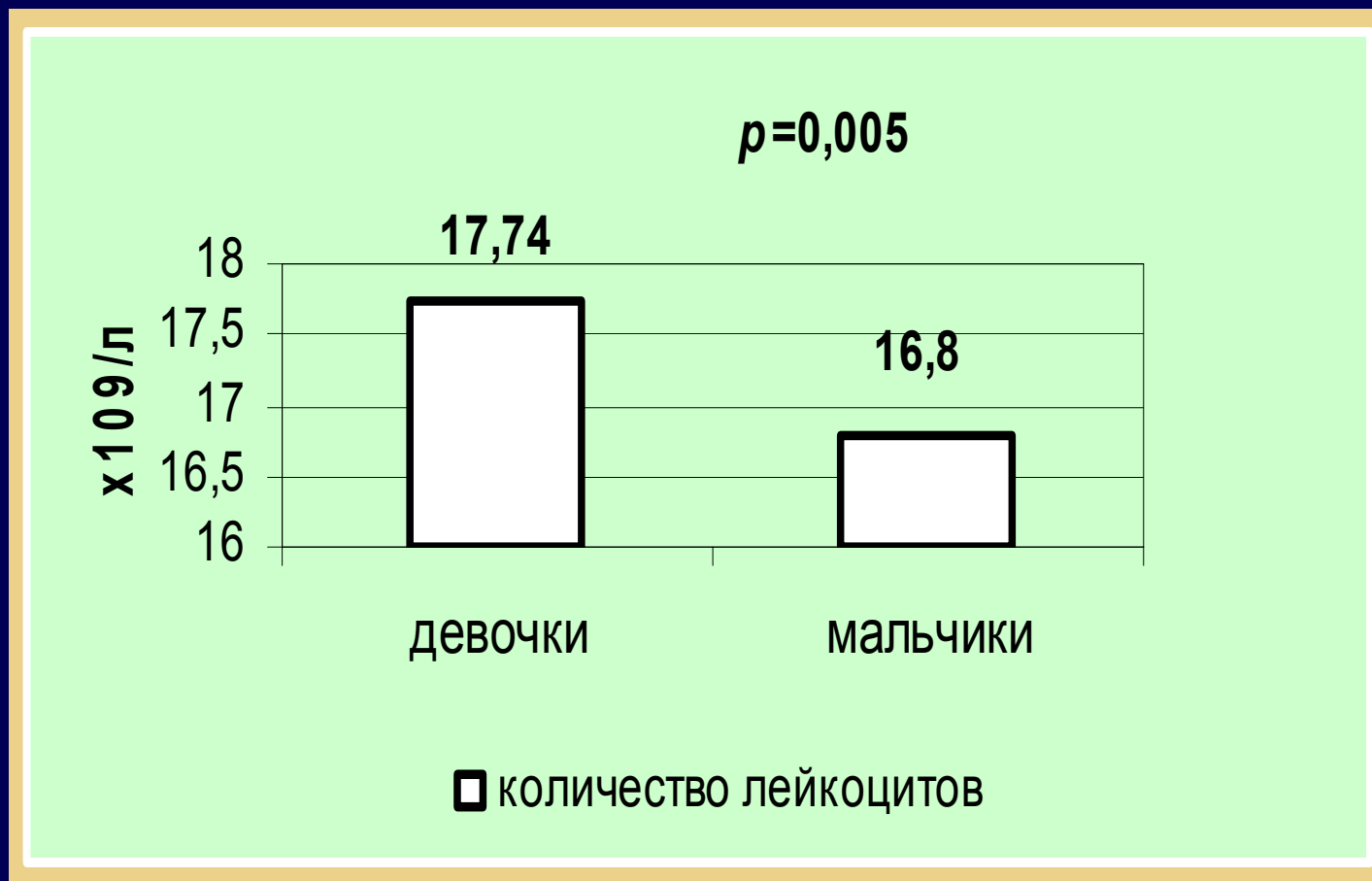
# Физиологические особенности

## Состав пуповинной крови (n=1013)

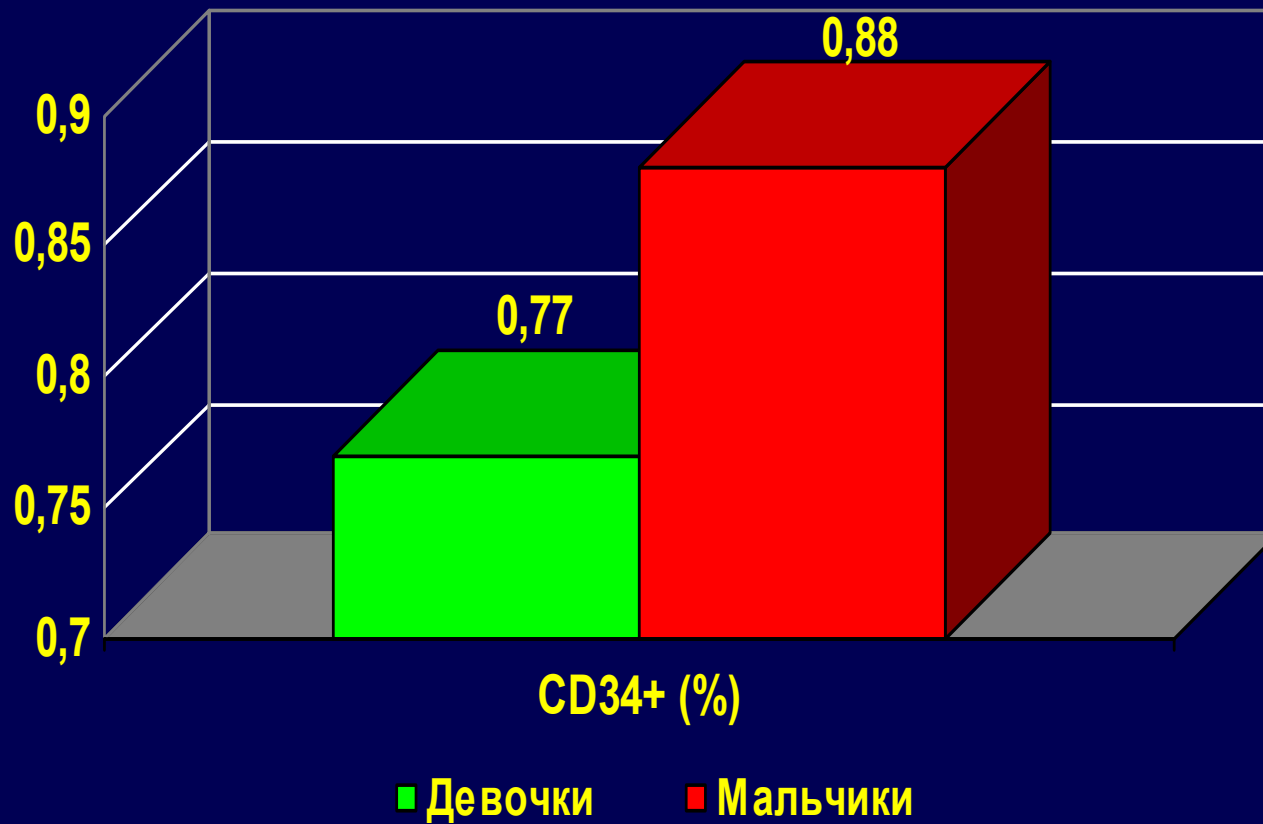
Показатели	WBC (x10 <sup>9</sup> /л)	NEU (%)	NEU (x10 <sup>9</sup> /л)	LYM (%)	LYM (x10 <sup>9</sup> /л)	MON (%)	MON (x10 <sup>9</sup> /л)
Среднее значение	17,24± 0,16	48,48 ± 0,25	8,41 ± 0,10	32,45± 0,22	5,54± 0,06	14,2± 0,11	2,42± 0,03
Показатели	EOS (%)	EOS (x10 <sup>9</sup> /л)	BAS (%)	BAS (x10 <sup>9</sup> /л)	RBC (x10 <sup>12</sup> /л)	HGB (г/л)	HCT (%)
Среднее значение	3,83± 0,06	0,64± 0,01	1,22± 0,02	0,23± 0,01	4,40± 0,01	157,4± 0,46	32,29± 0,14
Показатели	MCV (Фл)	MCH (пг)	MCHC (г/л)	RDW (%)	PLT (x10 <sup>9</sup> /л)	MPV (%)	
Среднее значение	105,81± 0,12	35,82± 0,04	338,6± 0,24	12,71± 0,02	307,54± 1,97	7,18± 0,02	



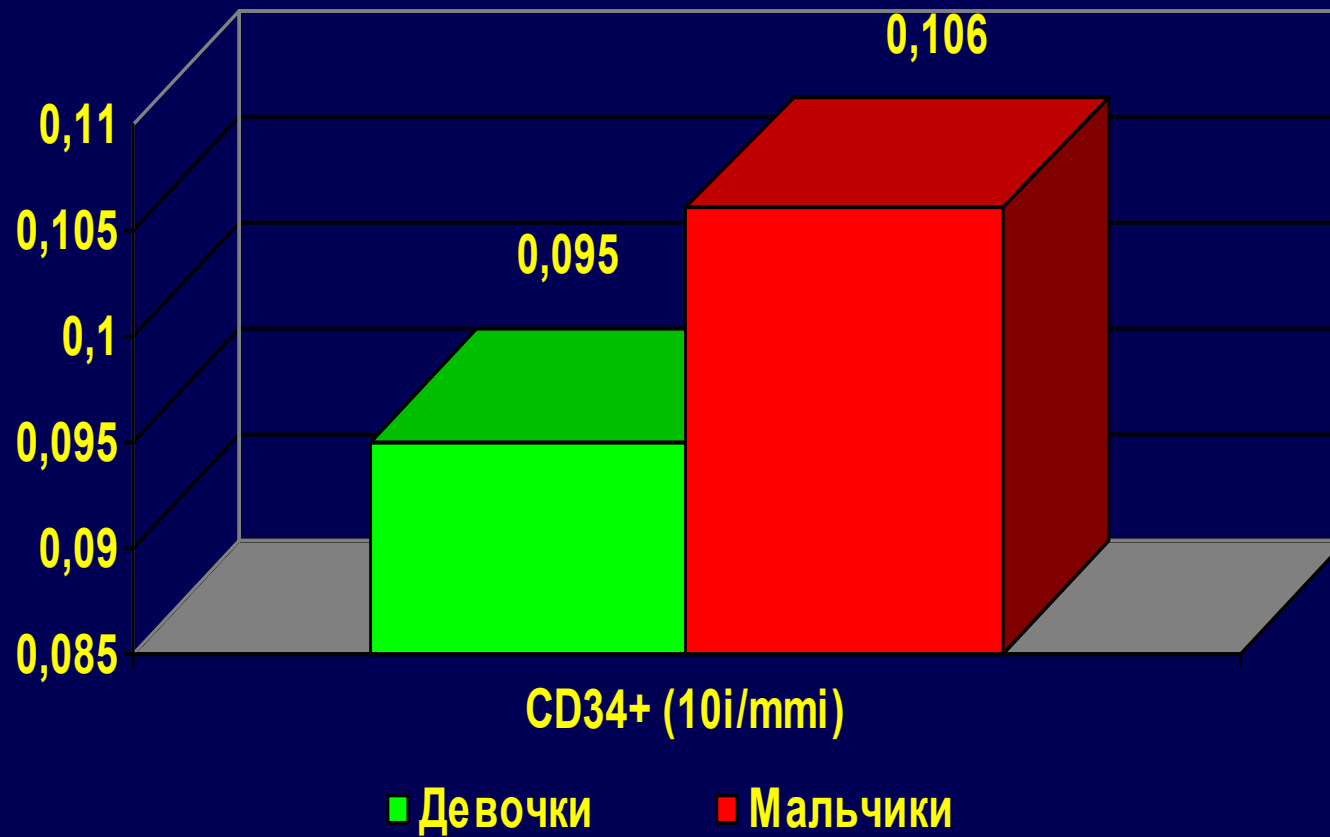
➤ У девочек уровень лейкоцитов выше



Доля CD34+клеток среди лейкоцитов  
пуповинной крови мальчиков и девочек.  
N = 611  $p = 0.01$

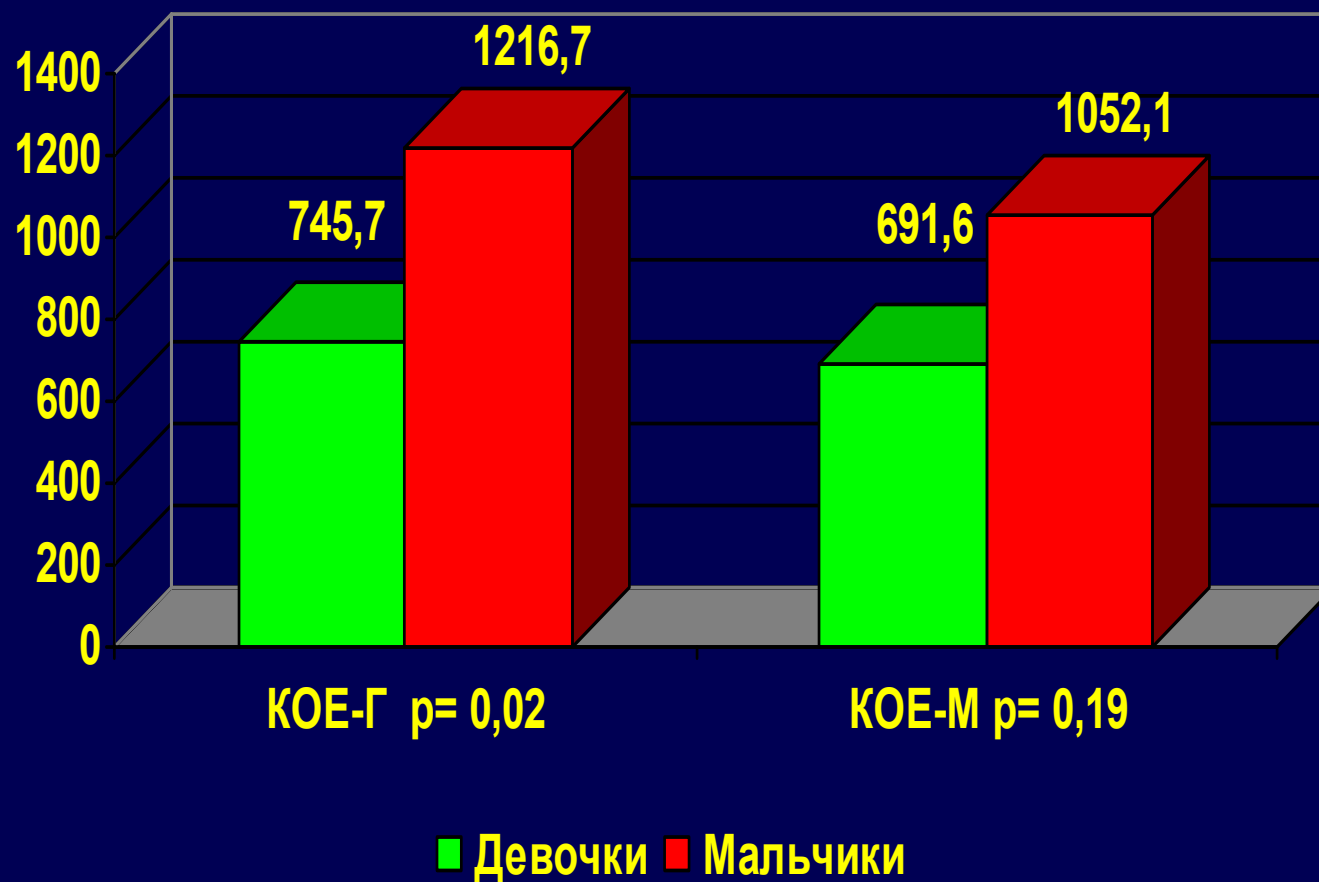


Абсолютное количество CD34+клеток в  
пуповинной крови мальчиков и девочек.  
N = 611       $p = 0,002$



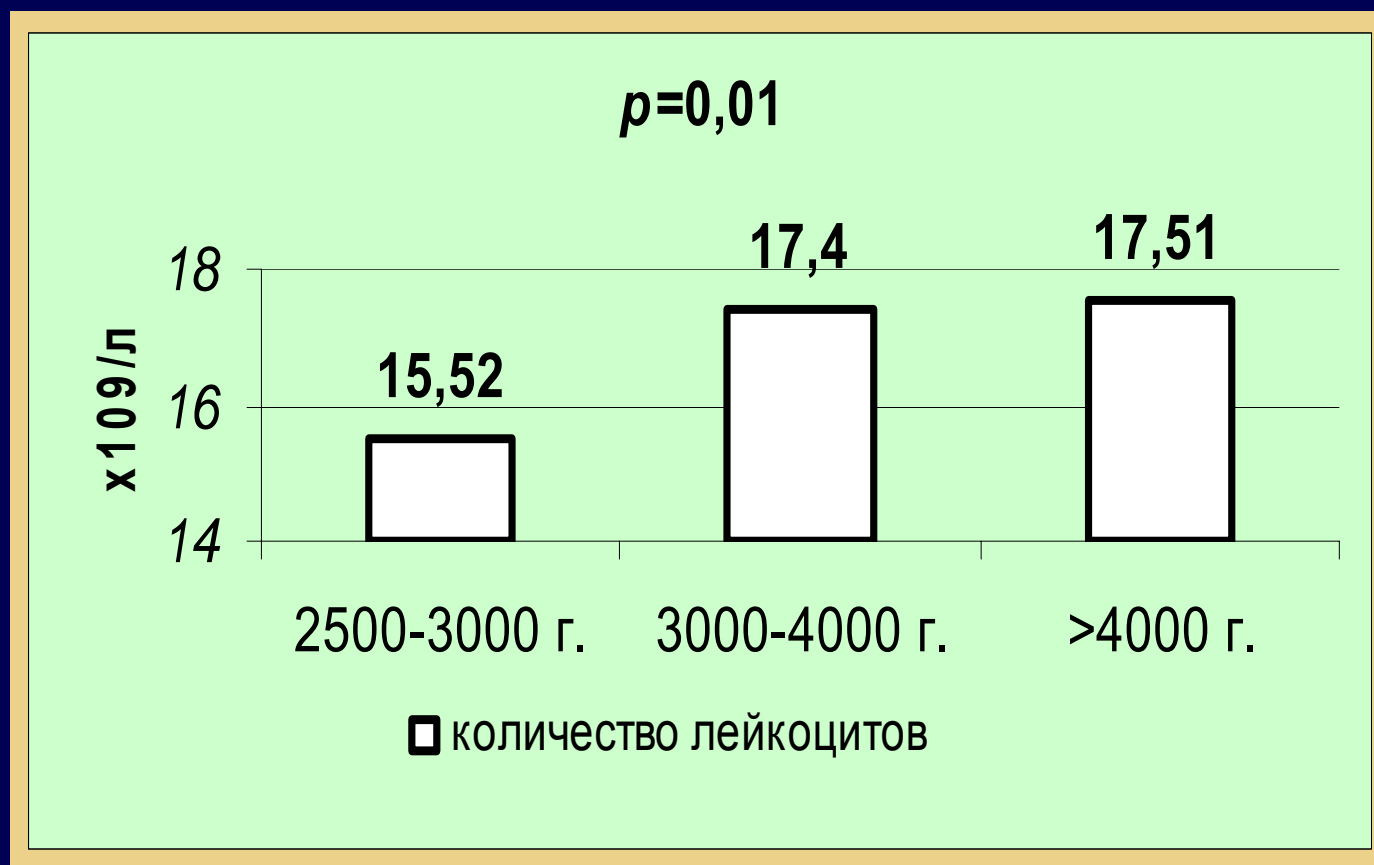
Колониеобразующая активность  
(КОЕ-Г и КОЕ-М) пуповинной крови  
девочек и мальчиков.

N = 224



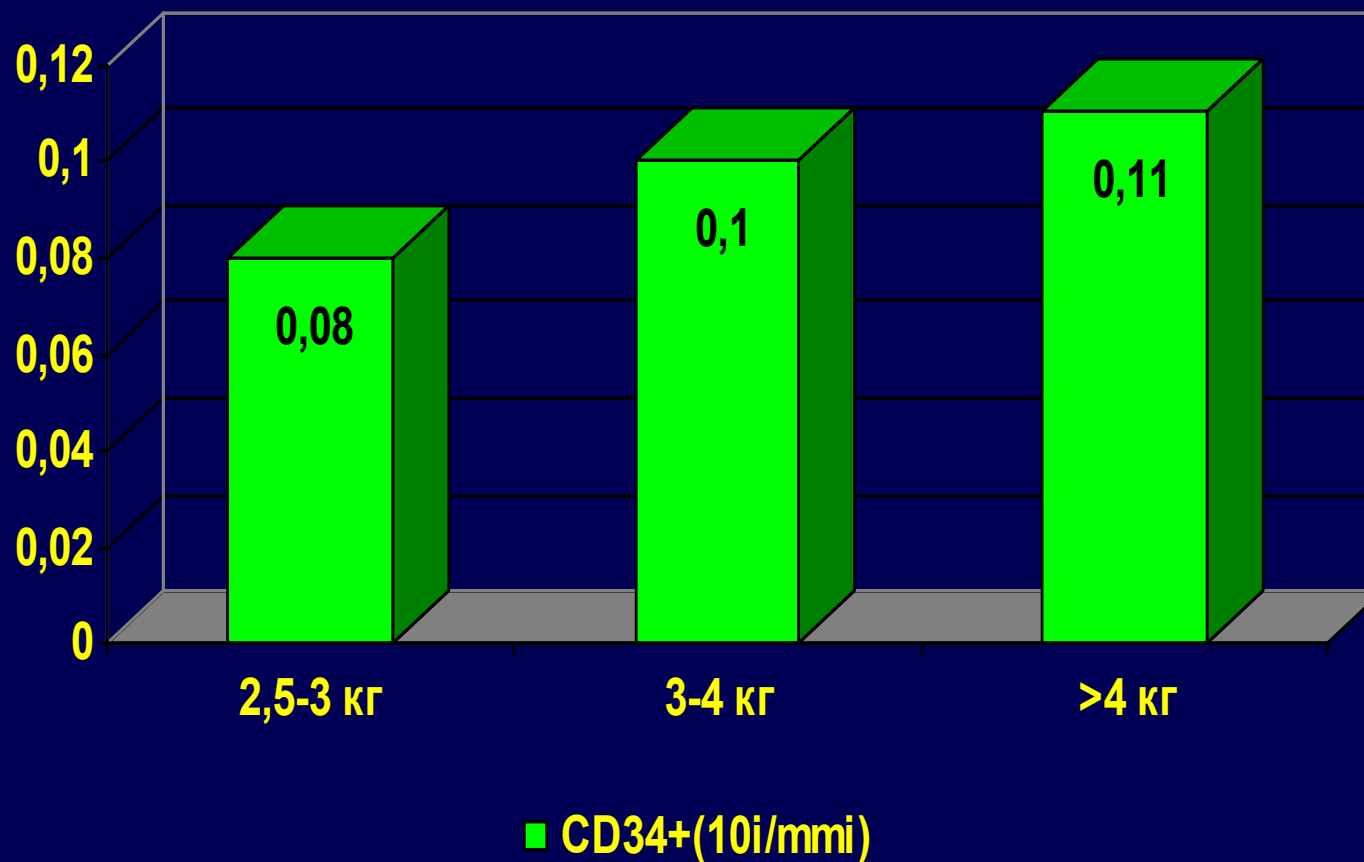
## Увеличение количества лейкоцитов

➤ При ↑ массы новорожденного

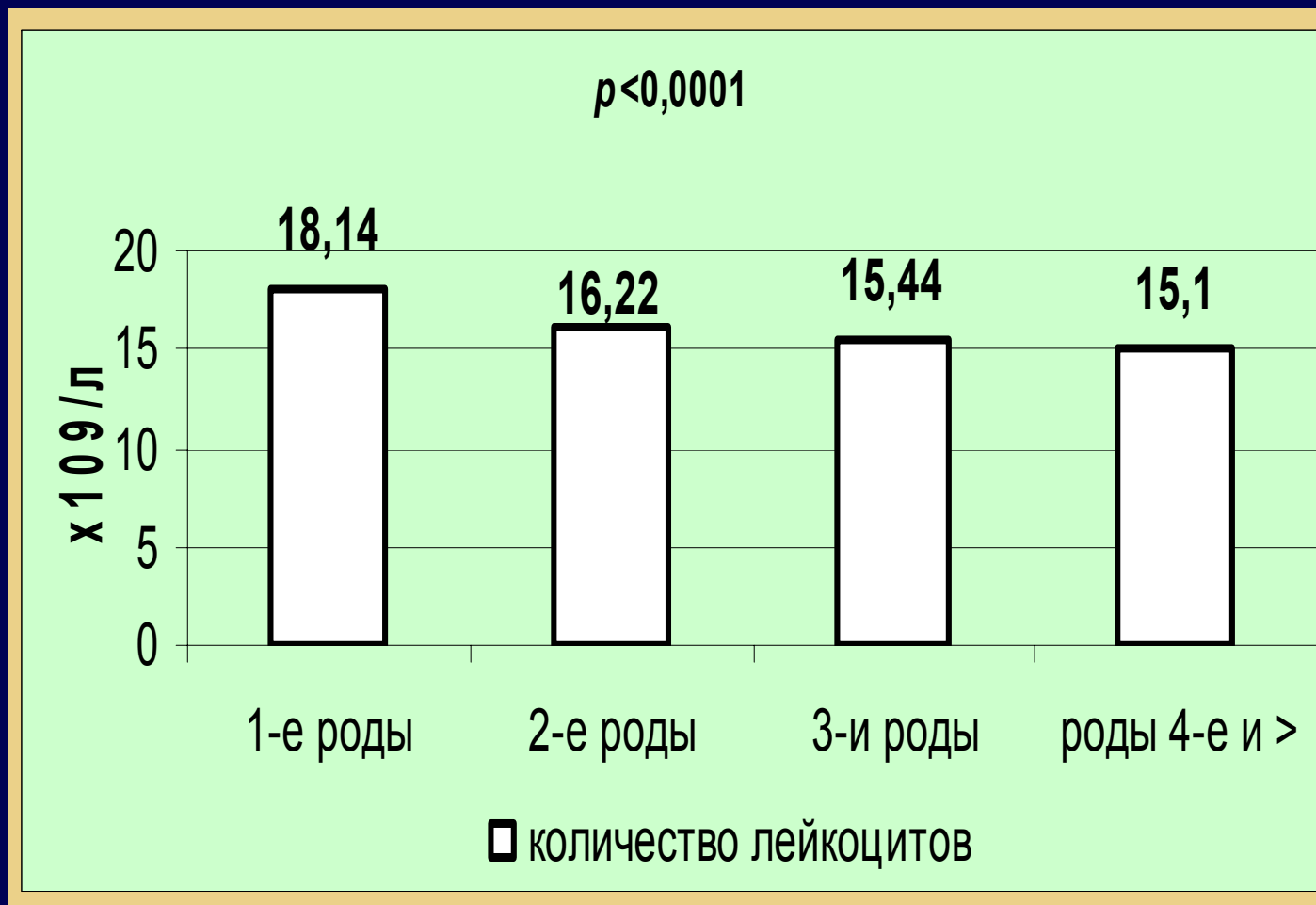


Количество CD34+клеток пуповинной крови в зависимости от веса новорожденного

N = 1000 p = 0.0004



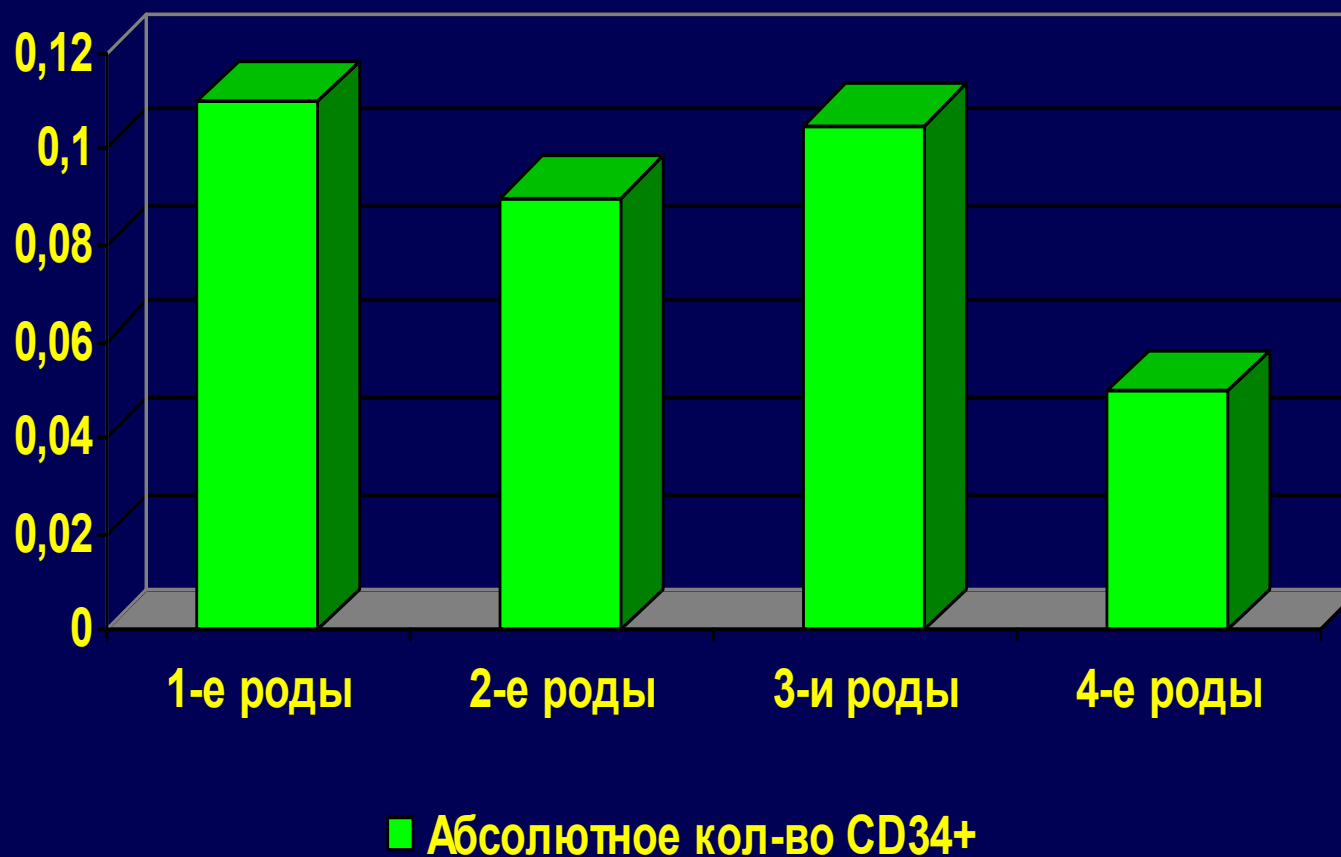
➤ При ↑ порядкового номера родов



Количество CD34+клеток пуповинной крови в зависимости от порядкового номера родов.

N = 613

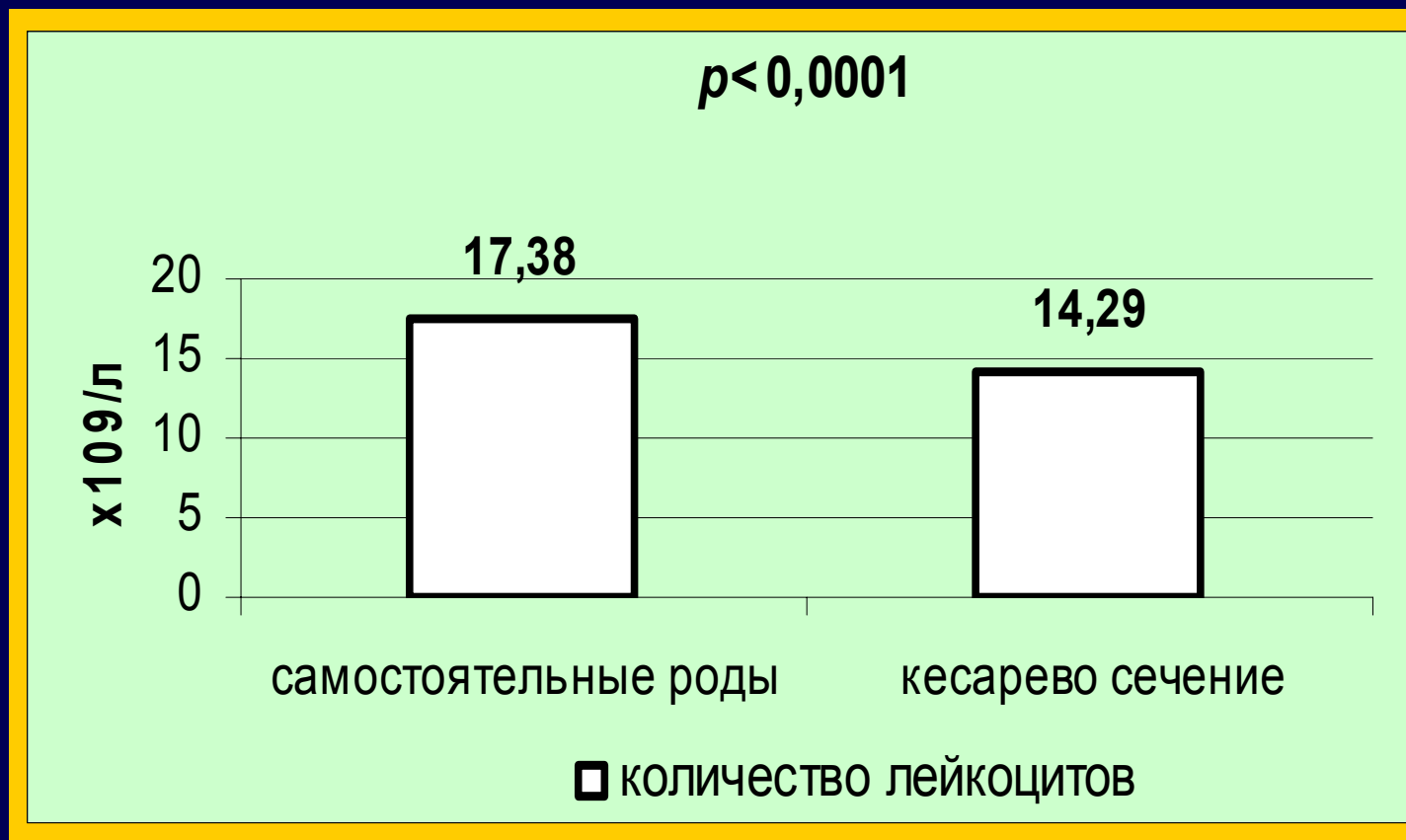
$p = 0.037$



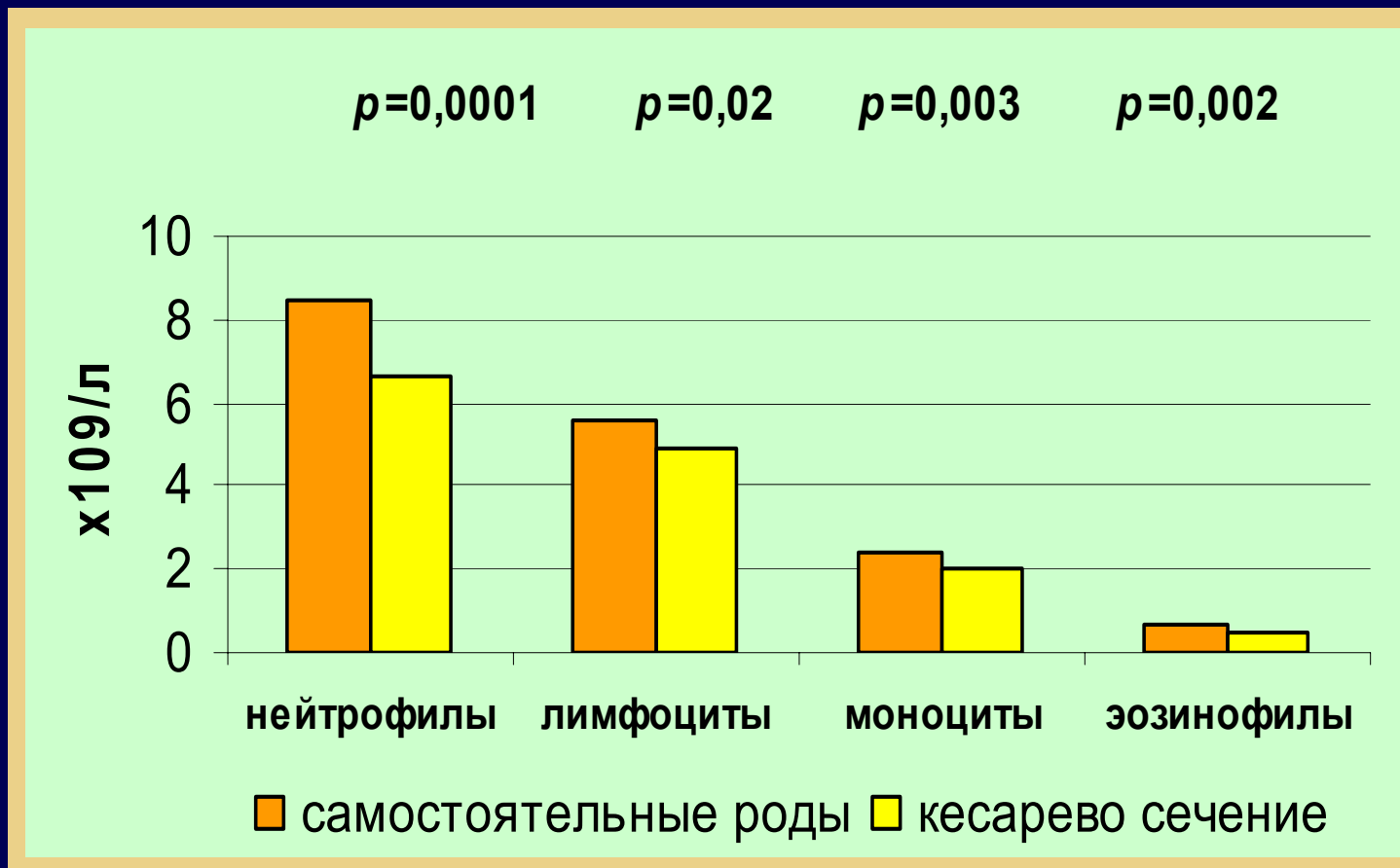


## Снижение содержания лейкоцитов

### ➤ При оперативных родах



## Абсолютное количество субпопуляций лейкоцитов ( $\times 10^9/\text{л}$ ) в зависимости от способа родоразрешения



# Патология беременности

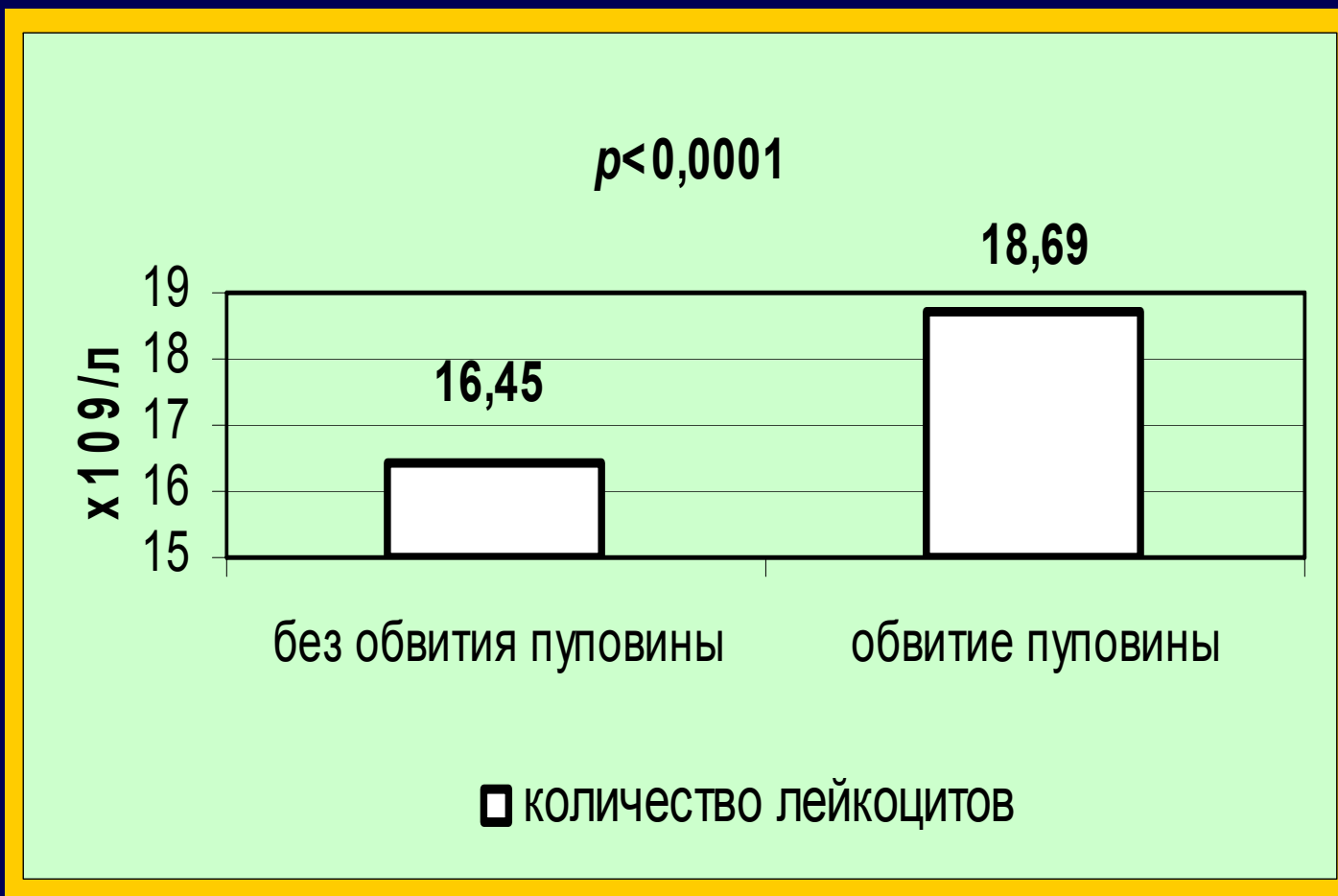
# Перечень стандартных противопоказаний к сбору пуповинной крови для безвозмездного донорства

- ☀ Наличие носительства и установленных инфекционных заболеваний, в том числе ВИЧ-инфекция, гепатиты, сифилис и заболевания, передающиеся половым и гемотрансмиссивным путем.
- ☀ Генетические заболевания.
- ☀ Наследственные и врожденные патологии, в том числе кроветворной и иммунной систем.
- ☀ Психические заболевания.
- ☀ Онкологические заболевания, в том числе в стадии ремиссии.
- ☀ Применение цитостатических и тератогенных средств во время беременности.
- ☀ Наркомания и токсикомания.
- ☀ Переливание крови и ее компонентов в течение последних 12-и месяцев.
- ☀ Лечение иглоукалыванием, выполнение пирсинга и татуировок за последние 12-и месяцев перед родами.
- ☀ Постоянное отстранение от донорства.
- ☀ Отказ матери.

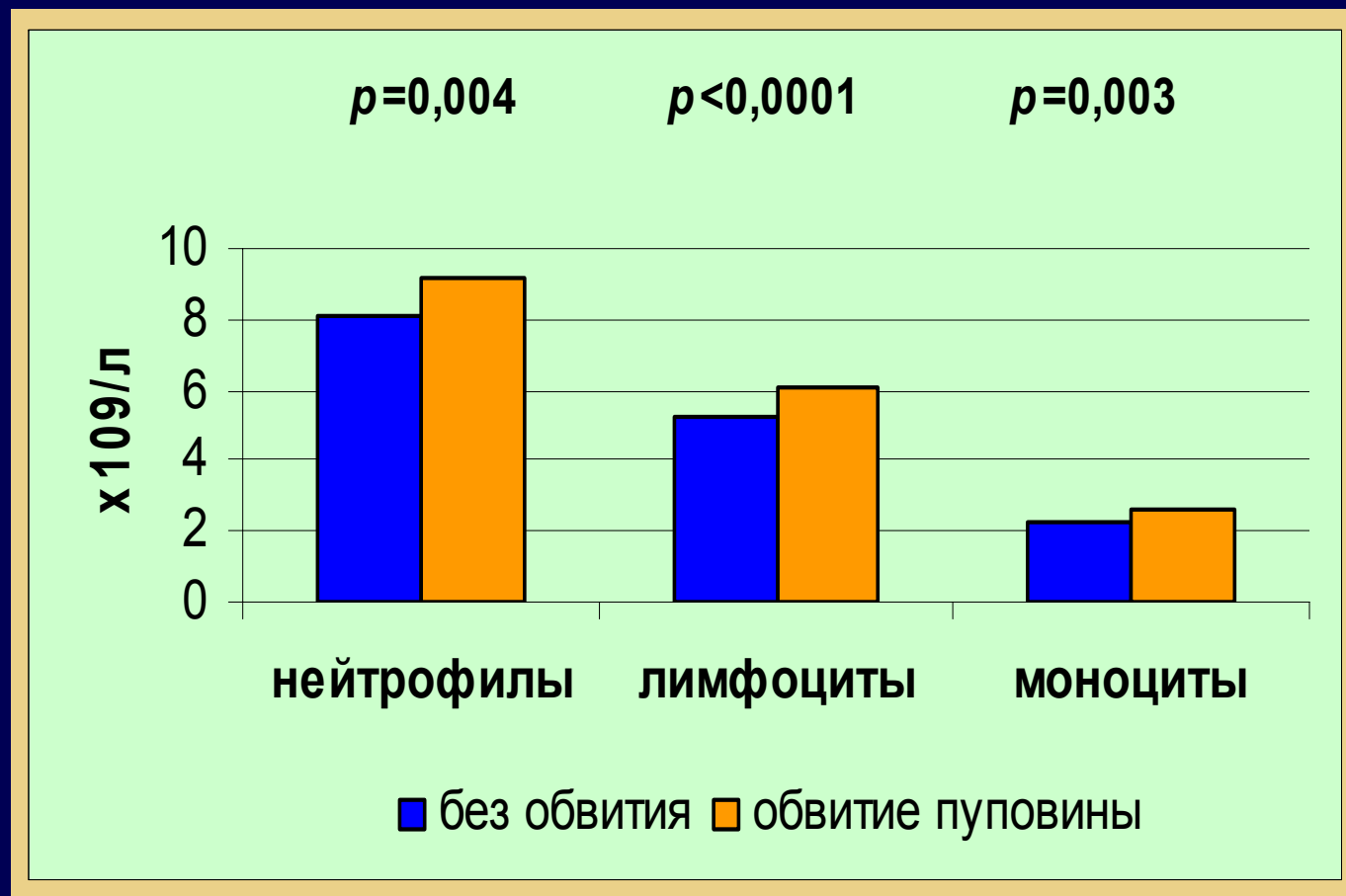
## Влияние особенностей течения беременности из 391 беременной полностью здоровы - 62

Состояние	Всего	1-я половина беременности	2-я половина беременности	1 и 2 половины беременностей
Анемия	37	10	24	3
Инфекционные заболевания	101	38	56	7
Угроза прерывания беременности	137	92	23	22
Патология почек у матери	23			23
ФПН	14	5	9	
Внутриутробная гипоксия	45			45
Ожирение у матери	11			11

➤ При наличии обвития пуповины

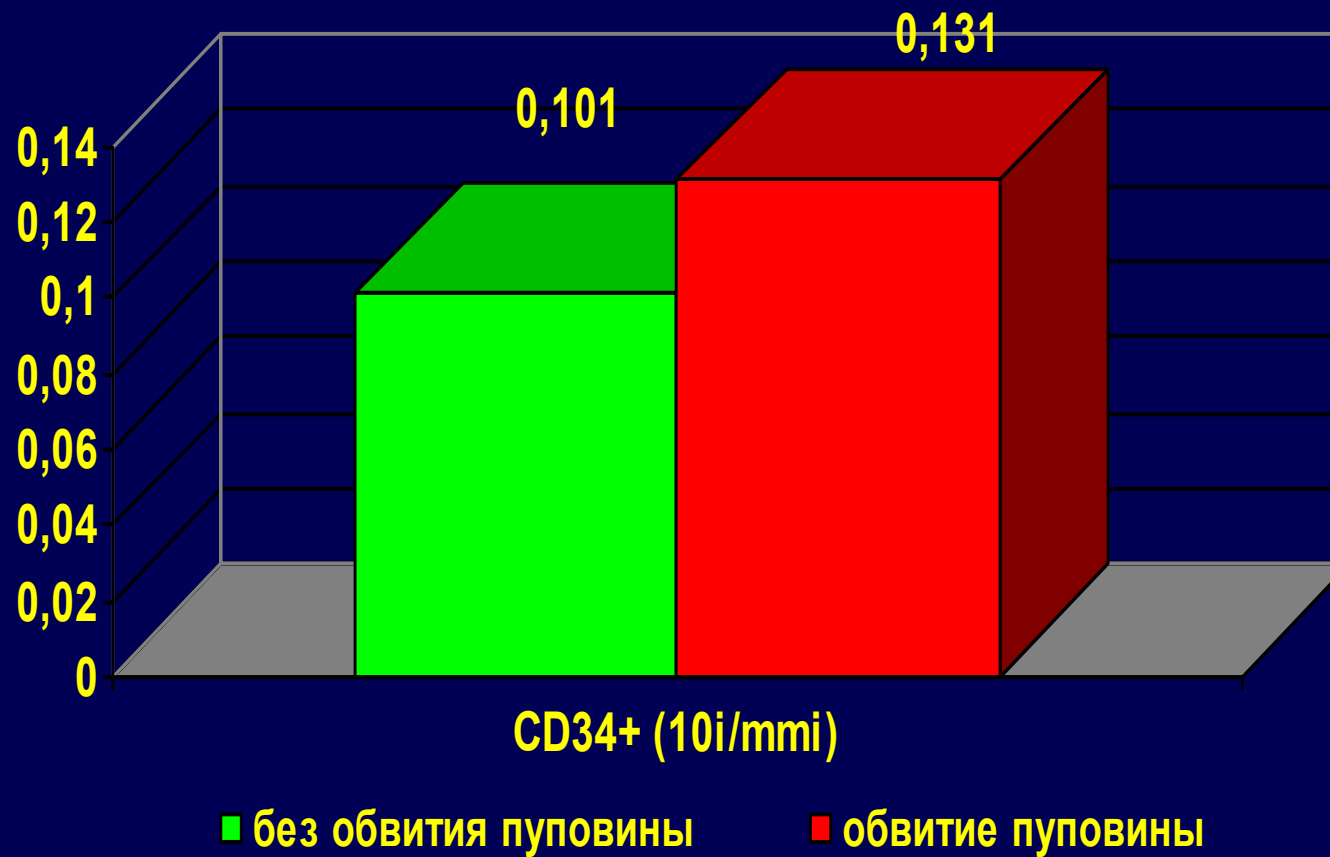


## Абсолютное количество субпопуляций лейкоцитов ( $\times 10^9/\text{л}$ ) в зависимости от обвития пуповины



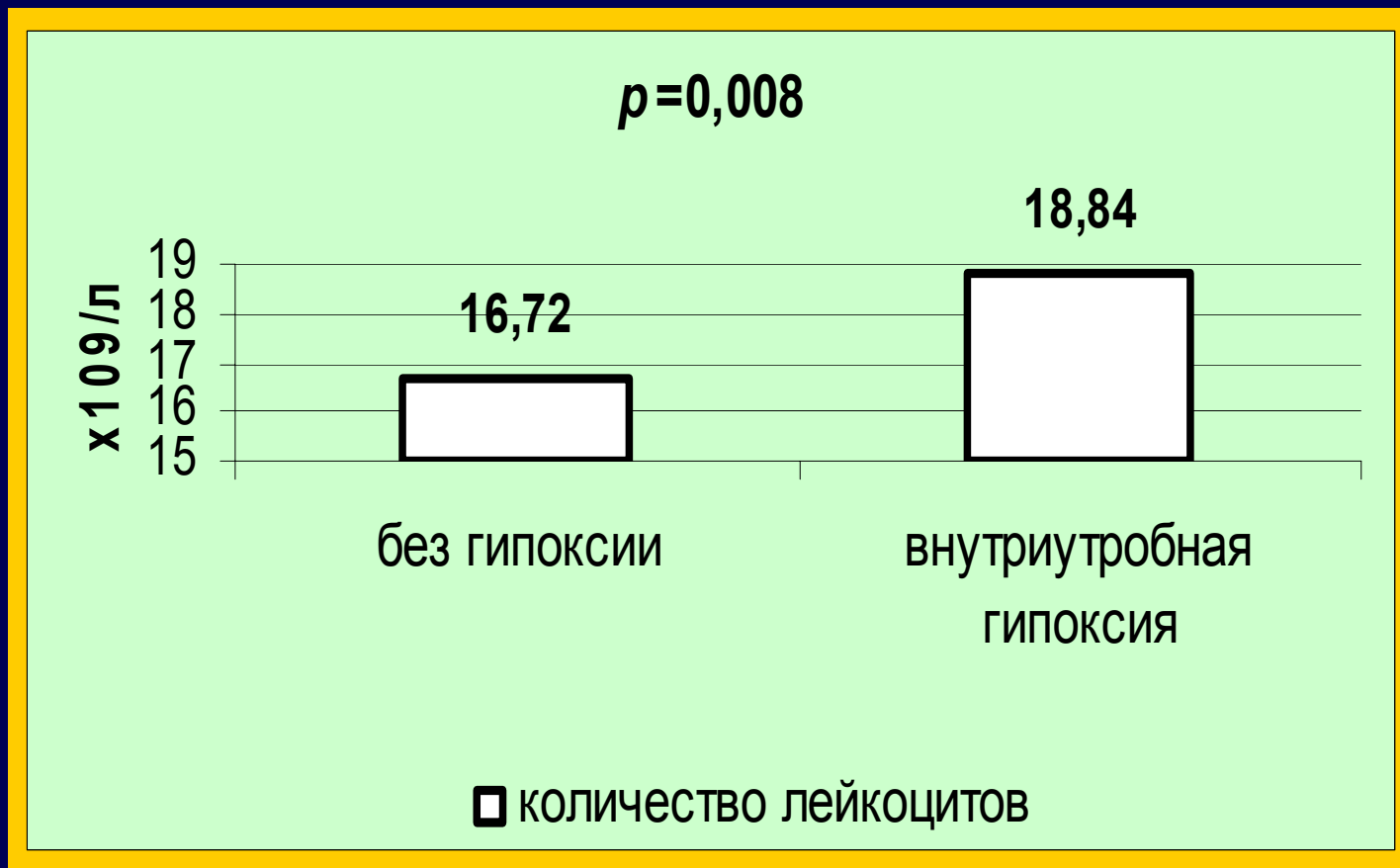
Количество CD34+клеток в зависимости от  
обвития пуповиной.

N = 221 p = 0.013

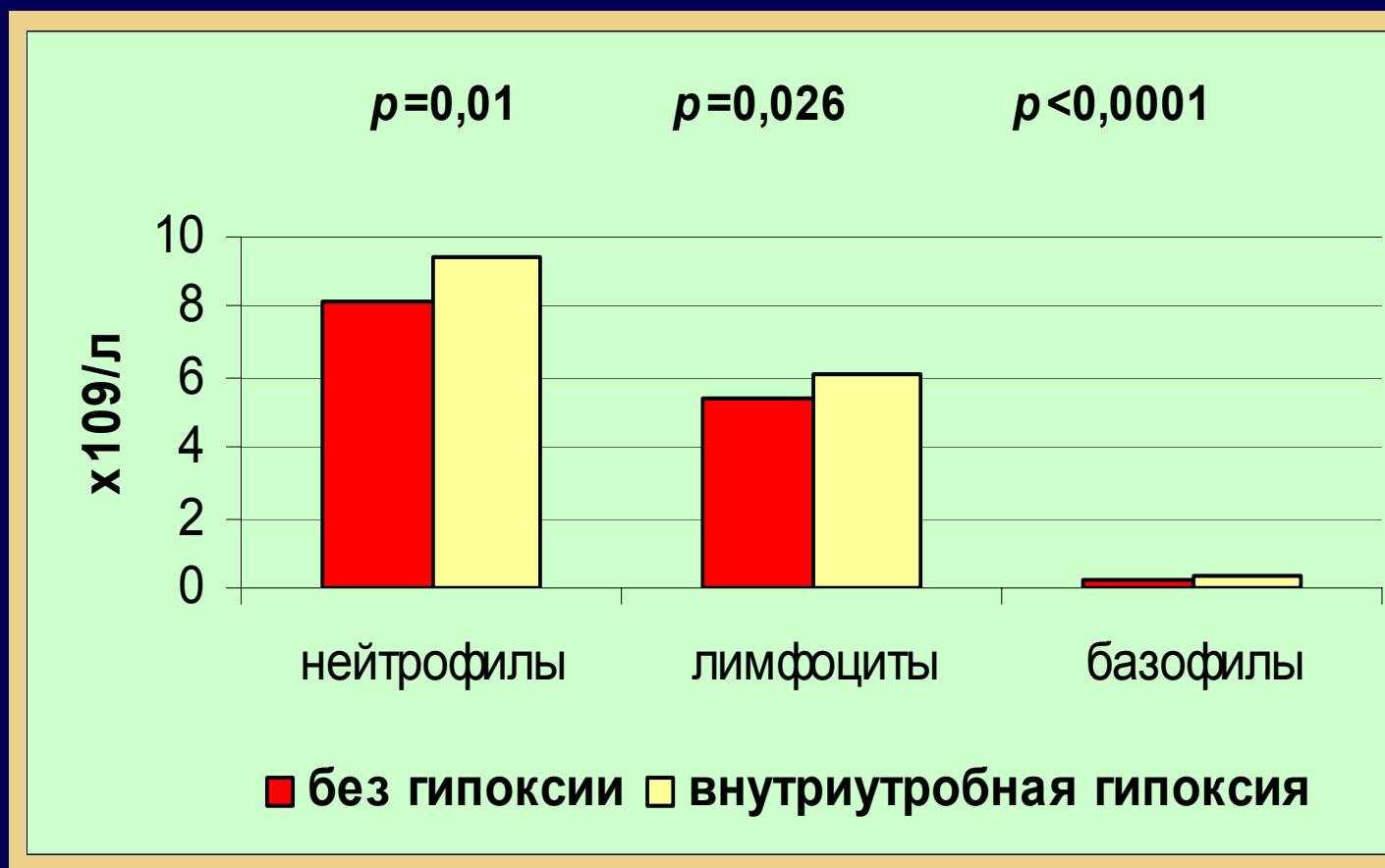




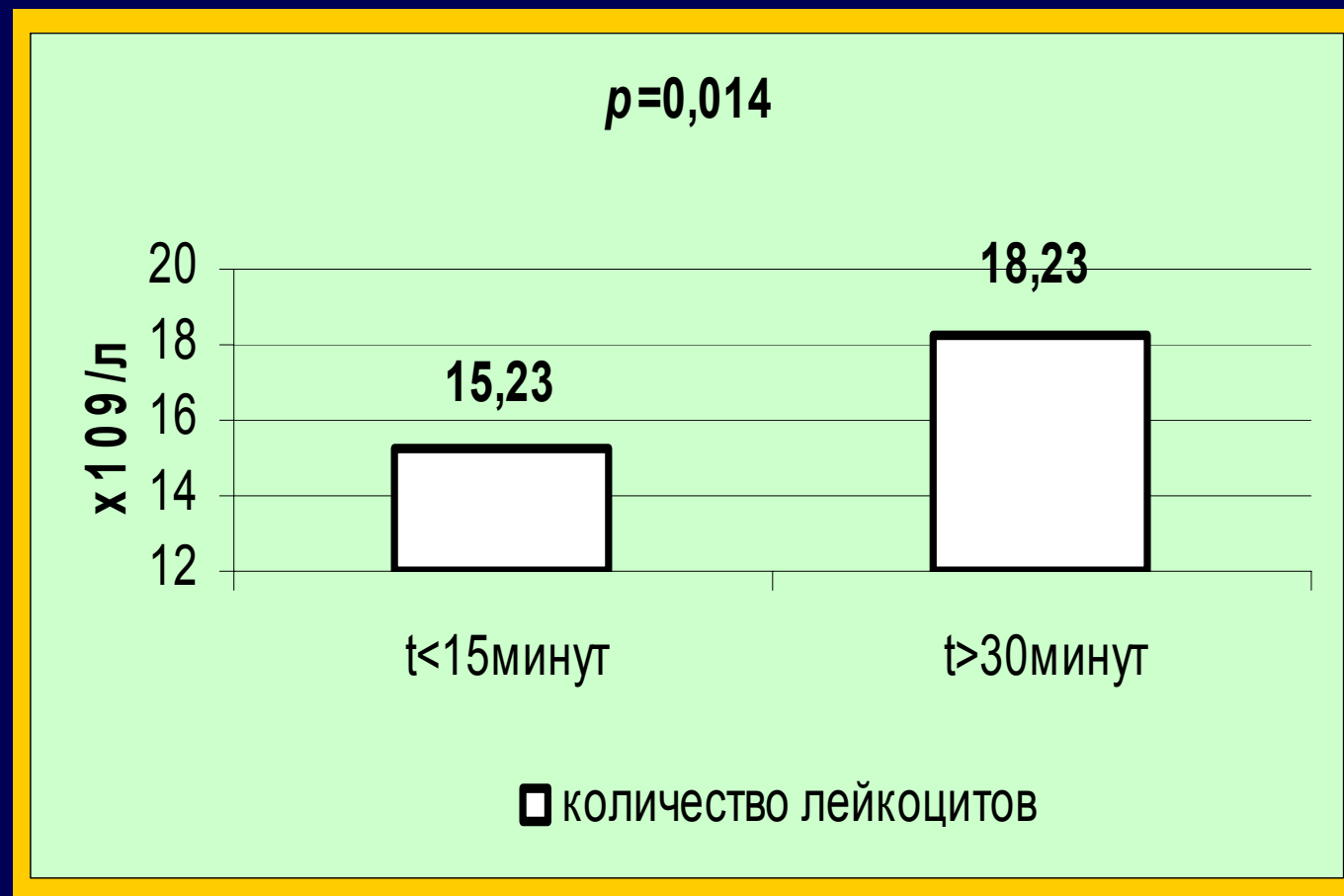
➤ При хронической внутриутробной гипоксии



## Количество субпопуляций лейкоцитов ( $\times 10^9/\text{л}$ ) в зависимости от развития внутриутробной гипоксии плода



➤ При ↑ длительности II периода родов



# Сбор ГСК пуповинной крови

- ✦ Можно ли забирать у всех?

безвозмездное донорство  
персонифицированное хранение

- ✦ **Процедура сбора**

- ✦ Доставка к месту обработки

- ✦ Способ обработки

- ✦ Объем и методы тестирования

- ✦ Возможности предтрансплантационного процессинга

# Сбор пуповинной крови до отделения плаценты или после

- ✦ Разницы в клеточном составе нет

# Сбор ГСК пуповинной крови

- ☀ Можно ли забирать у всех?

безвозмездное донорство  
персонифицированное хранение

- ☀ Процедура сбора

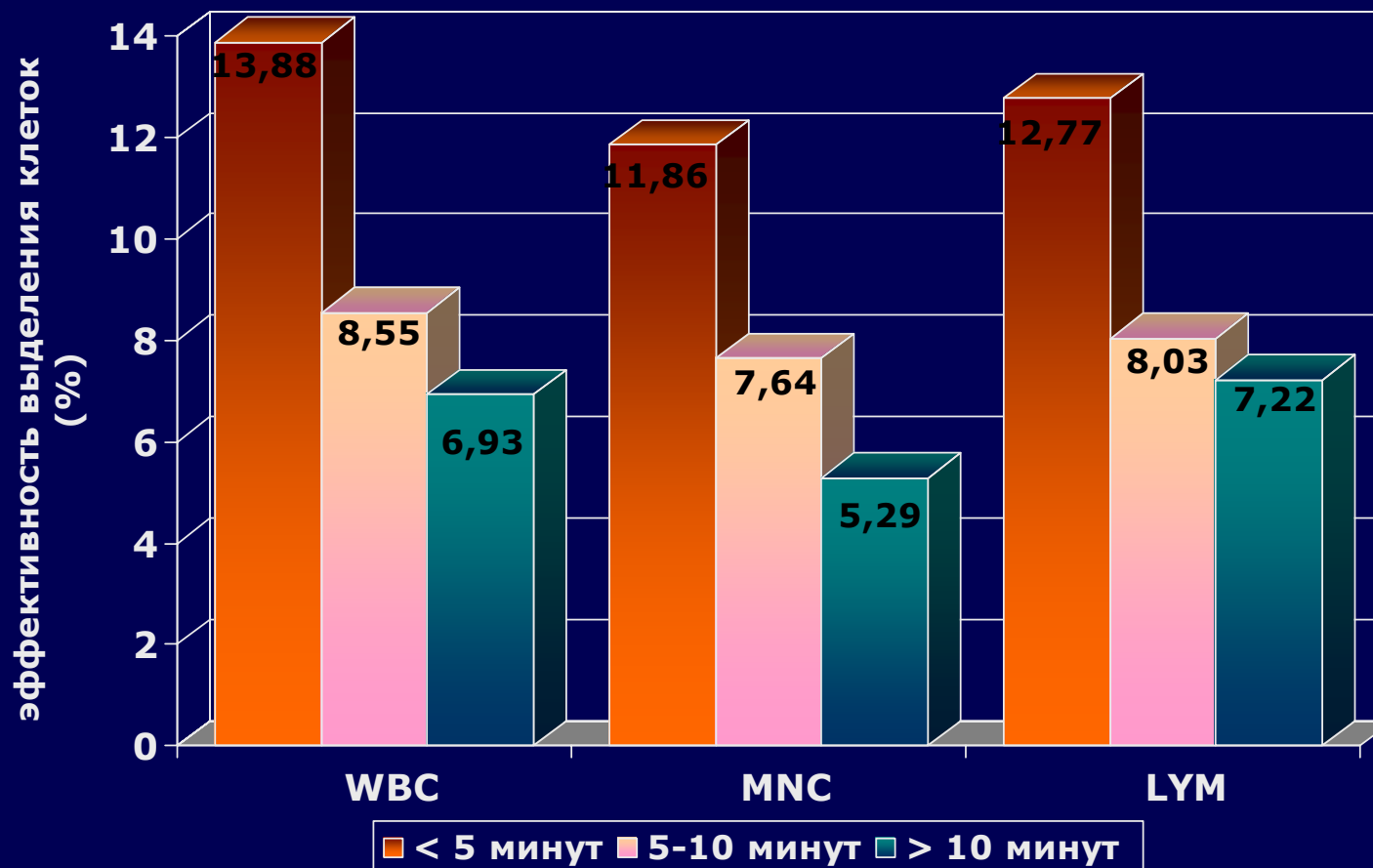
- ☀ **Доставка к месту обработки**

- ☀ Способ обработки

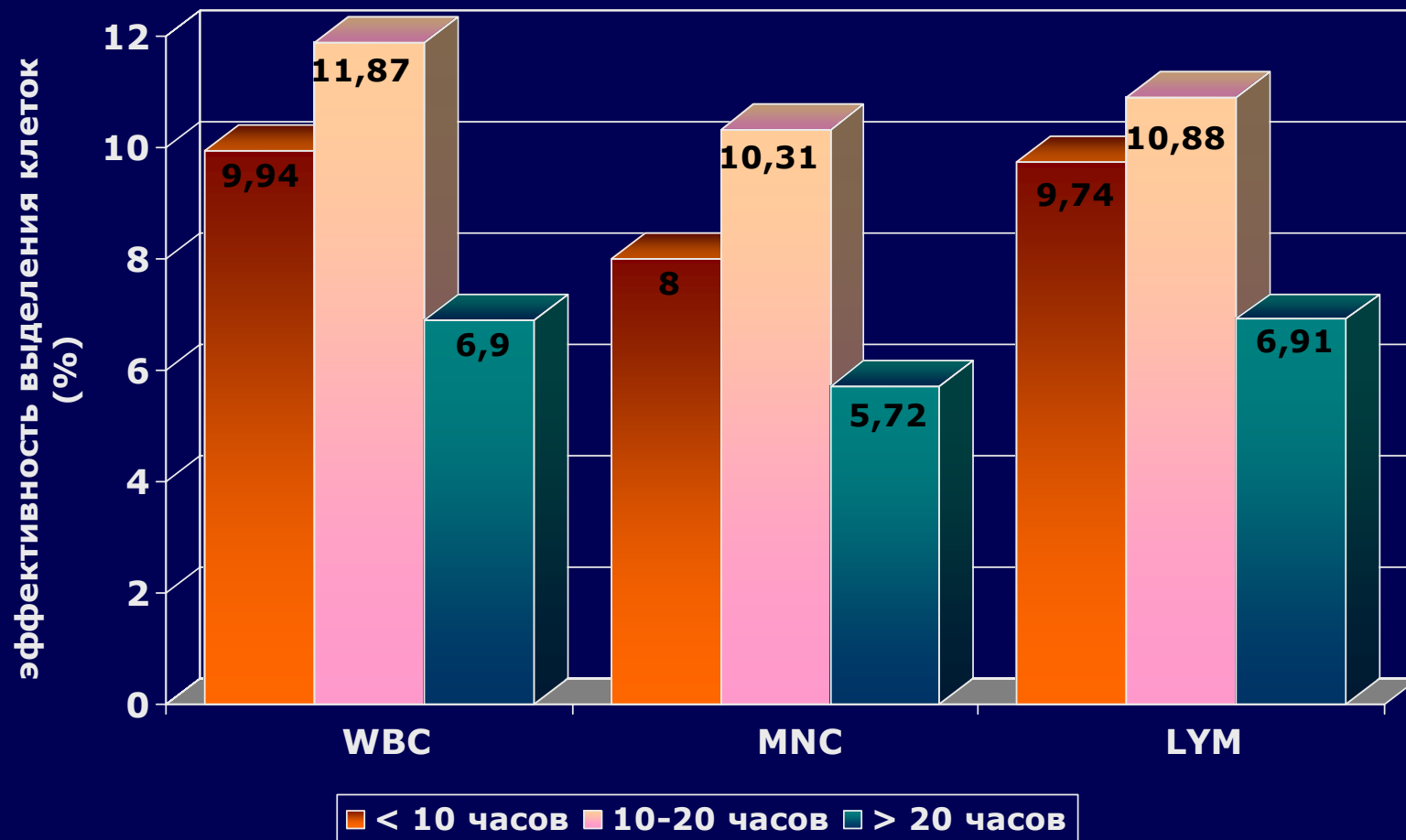
- ☀ Объем и методы тестирования

- ☀ Возможности предтрансплантационного процессинга

## Время между пересечением пуповины и сбором ПК.



# Время между сбором ПК и ее обработкой.



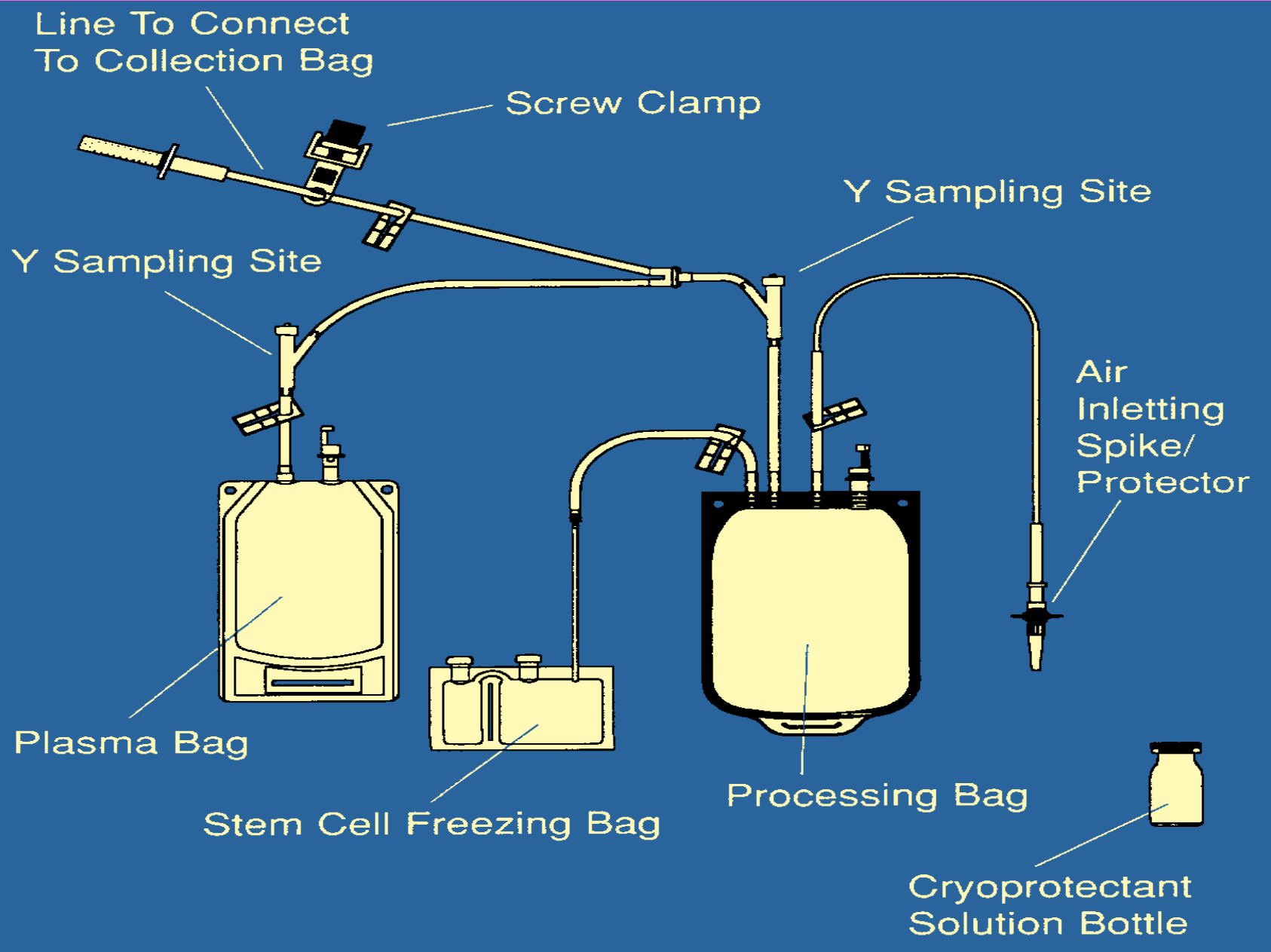


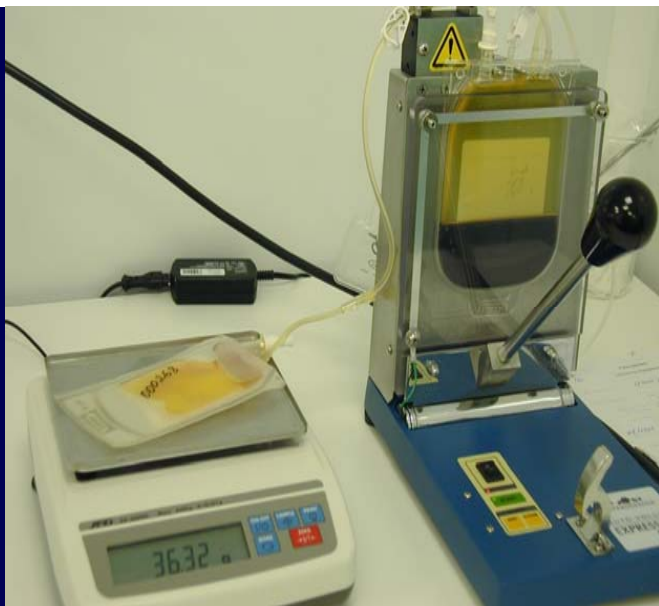
# Сбор ГСК пуповинной крови

- ✦ Можно ли забирать у всех?
  - безвозмездное донорство
  - персонифицированное хранение
- ✦ Процедура сбора
- ✦ Доставка к месту обработки
- ✦ **Способ обработки**
- ✦ Объем и методы тестирования
- ✦ Возможности предтрансплантационного процессинга

# МЕТОД УМЕНЬШЕНИЯ ОБЪЕМА 25 ml

- ◆ **Усиление осаждения RBC с применением HES**
- ◆ **Центрифугирование и удаление избытка эритроцитов и плазмы для получения 20 мл концентрата WBC**
- ◆ **Крипротектант с конечной концентрацией 0.8 % HES, 1 % Dextran 40, 10 % DMSO в окончательном объеме 25 мл**

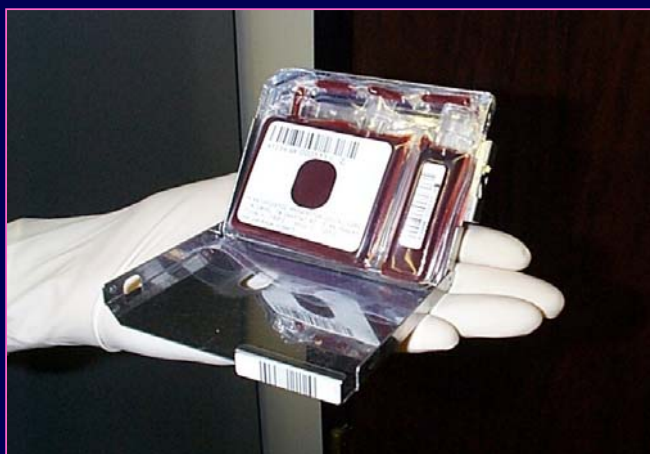




метод двойного  
центрифугирования



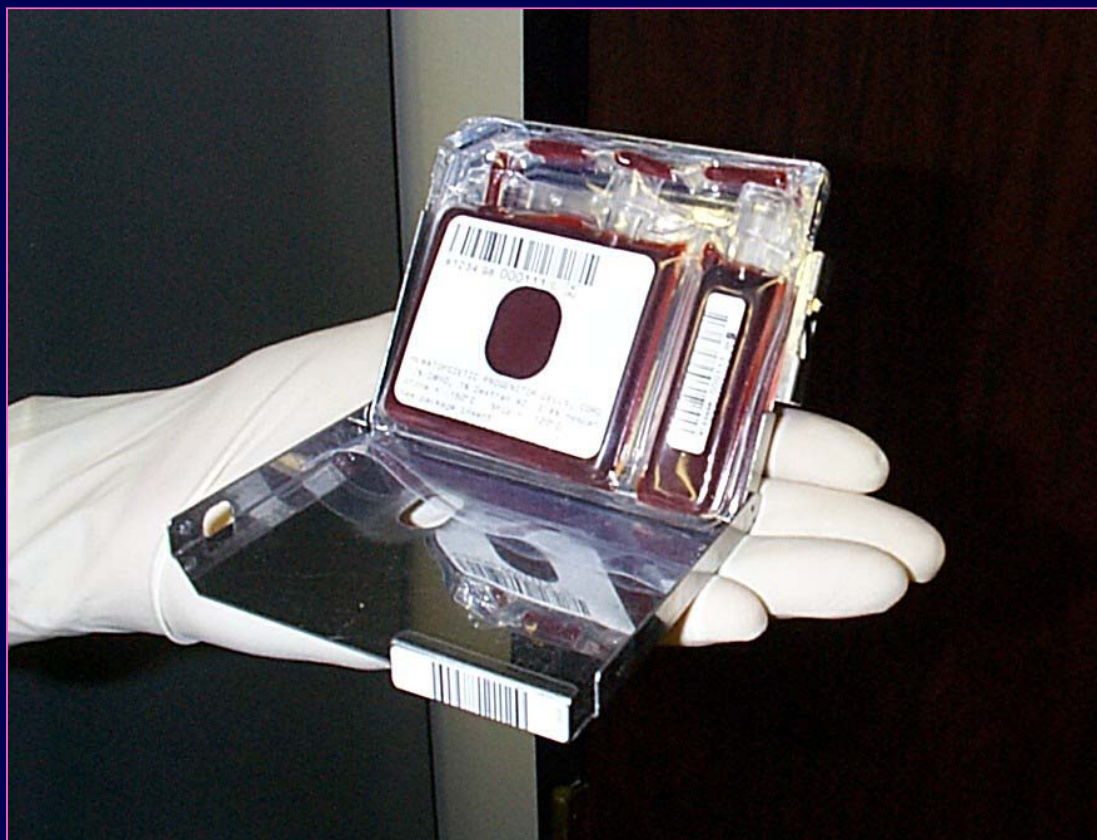
аппаратный метод  
«Sepax S100», Biosafe, Switzerland



# «ЧИСТОЕ» ПОМЕЩЕНИЕ АВТОМАТИЧЕСКОЕ ВЫДЕЛЕНИЕ



# ПОДГОТОВКА КЛЕТОЧНОГО КОНЦЕНТРАТА К ЗАМОРАЖИВАНИЮ



# КРИБАНК ОБЩИЙ ВИД



## **Выделение клеточного концентрата**

- методом двойного центрифугирования («ручным») 539 образцов
- аппаратным методом – методом микрогеманетики - с помощью аппарата «Sepax S100», Biosafe, Switzerland 554 образца



**Выделение в концентрат из пуповинной крови лейкоцитов, мононуклеаров, лимфоцитов и эритроцитов (%).**

	Выход клеток в процентах			
	WBC	MNC	LYM	RBC
<b>Количество</b>	<b>1095</b>	<b>1095</b>	<b>1095</b>	<b>1095</b>
<b>Среднее значение</b>	<b>71,45</b>	<b>74,05</b>	<b>76,48</b>	<b>28,56</b>
<b>Медиана</b>	<b>73,06</b>	<b>75,16</b>	<b>78,23</b>	<b>27,11</b>
<b>Стандартное отклонение</b>	<b>11,69</b>	<b>13,20</b>	<b>14,82</b>	<b>14,11</b>
<b>Стандартная ошибка среднего</b>	<b>0,35</b>	<b>0,40</b>	<b>0,45</b>	<b>0,43</b>
<b>Минимальное значение</b>	<b>11,19</b>	<b>15,15</b>	<b>15,56</b>	<b>1,15</b>
<b>Максимальное значение</b>	<b>148,05</b>	<b>150,37</b>	<b>161,62</b>	<b>94,06</b>
<b>Кол-во значений более 100%</b>	<b>6</b>	<b>15</b>	<b>26</b>	<b>0</b>

# Сбор ГСК пуповинной крови

- ☀ Можно ли забирать у всех?

безвозмездное донорство  
персонифицированное хранение

- ☀ Процедура сбора

- ☀ Доставка к месту обработки

- ☀ Способ обработки

- ☀ **Объем и методы тестирования**

- ☀ Возможности предтрансплантационного процессинга

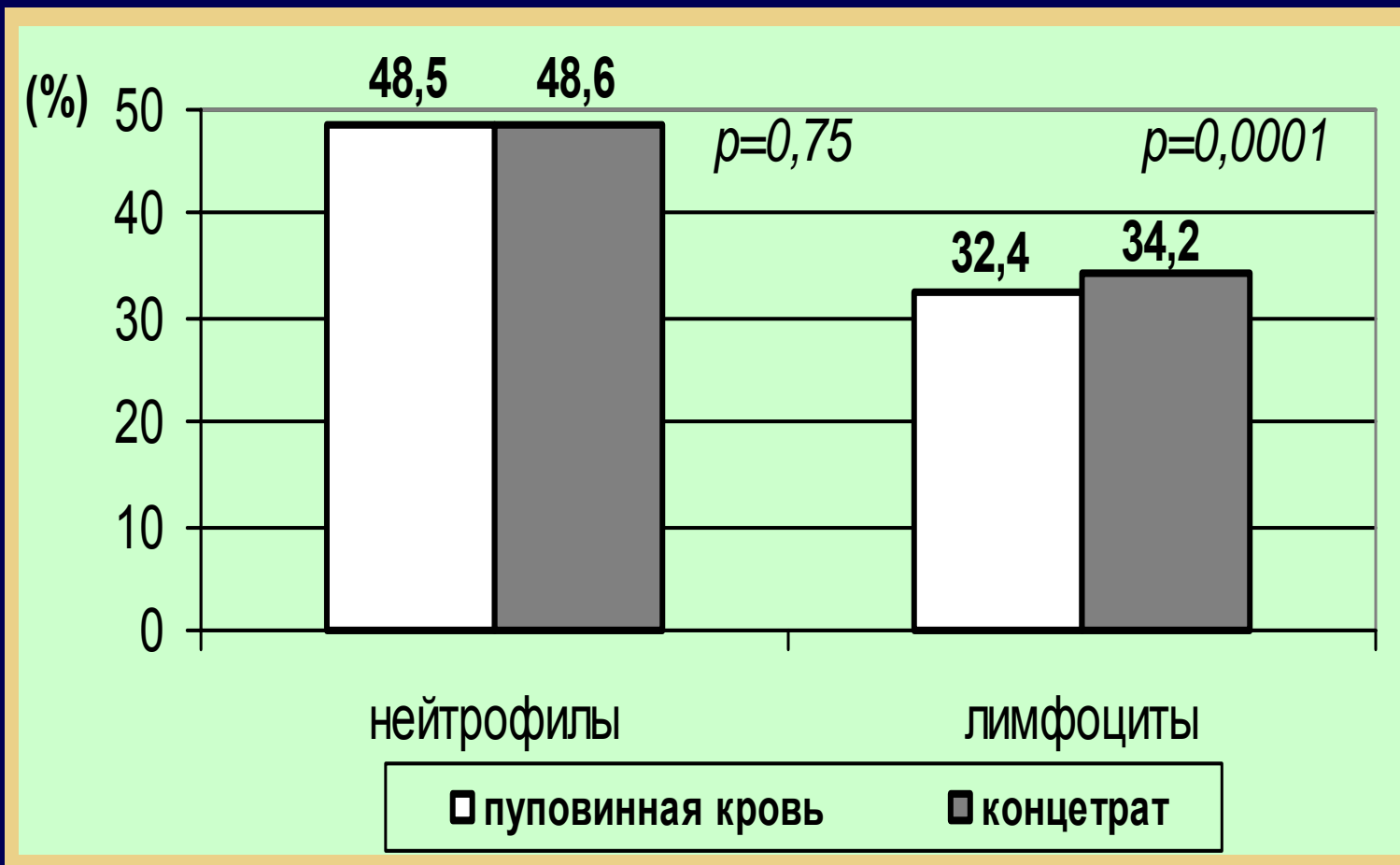
# НЕОБХОДИМЫЙ ОБЪЕМ ТЕСТИРОВАНИЯ

- ✦ Анамнез матери, включая тестирования во время беременности
- ✦ Вирусная безопасность
- ✦ Бактериологическая безопасность
- ✦ Общее количество ядросодержащих клеток
- ✦ Группы ABO и Rh
- ✦ Количество CD34+клеток и субпопуляций
- ✦ Эффективность клонирования (КОЕ-ГЭММ, КОЕ-Э, КОЕ-ГМ, КОЕ-Г, КОЕ-М)
- ✦ HLA-фенотип (low resolution)

## Степень различий в подсчете лейкоцитов пуповинной крови при помощи автоматического счетчика клеток крови и светооптической микроскопии (%)

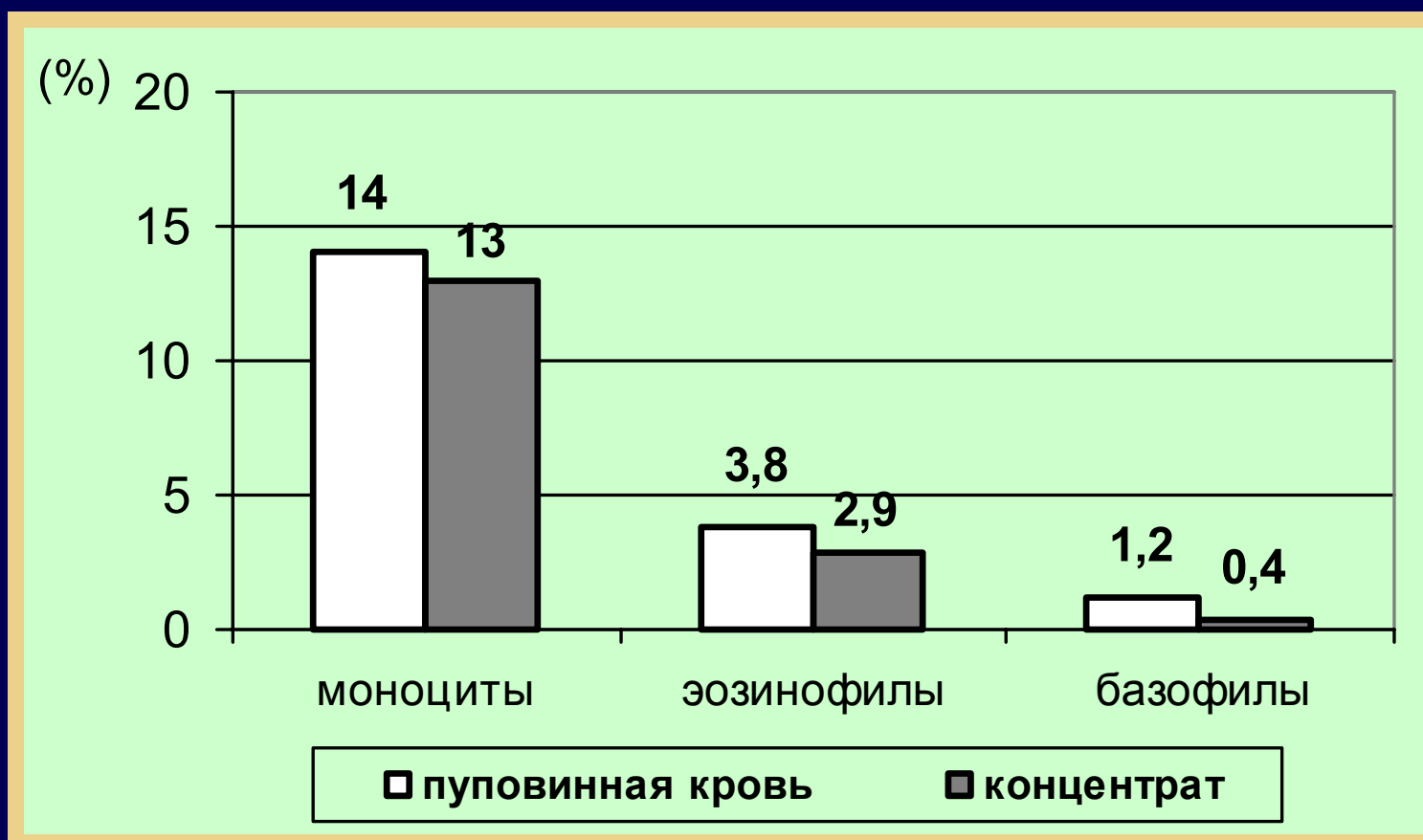
	NEU	LYM	MON	EOS	BAS
Количество	341	341	341	341	341
Среднее значение	10.00	-4.10	-4.69	-0.58	-0.64
Медиана	9.20	-4.00	-4.20	-0.70	-0.60
Стандартное отклонение	6.92	5.51	5.09	1.74	0.88
Стандартная ошибка среднего	0.37	0.30	0.28	0.09	0.05
Минимальное значение	-12.30	-19.40	-36.40	-7.40	-4.50
Максимальное значение	44.80	22.60	3.80	6.20	2.30
«-» - при автоматическом подсчете величина больше					

## Доля нейтрофилов и лимфоцитов в пуповинной крови и концентрате.

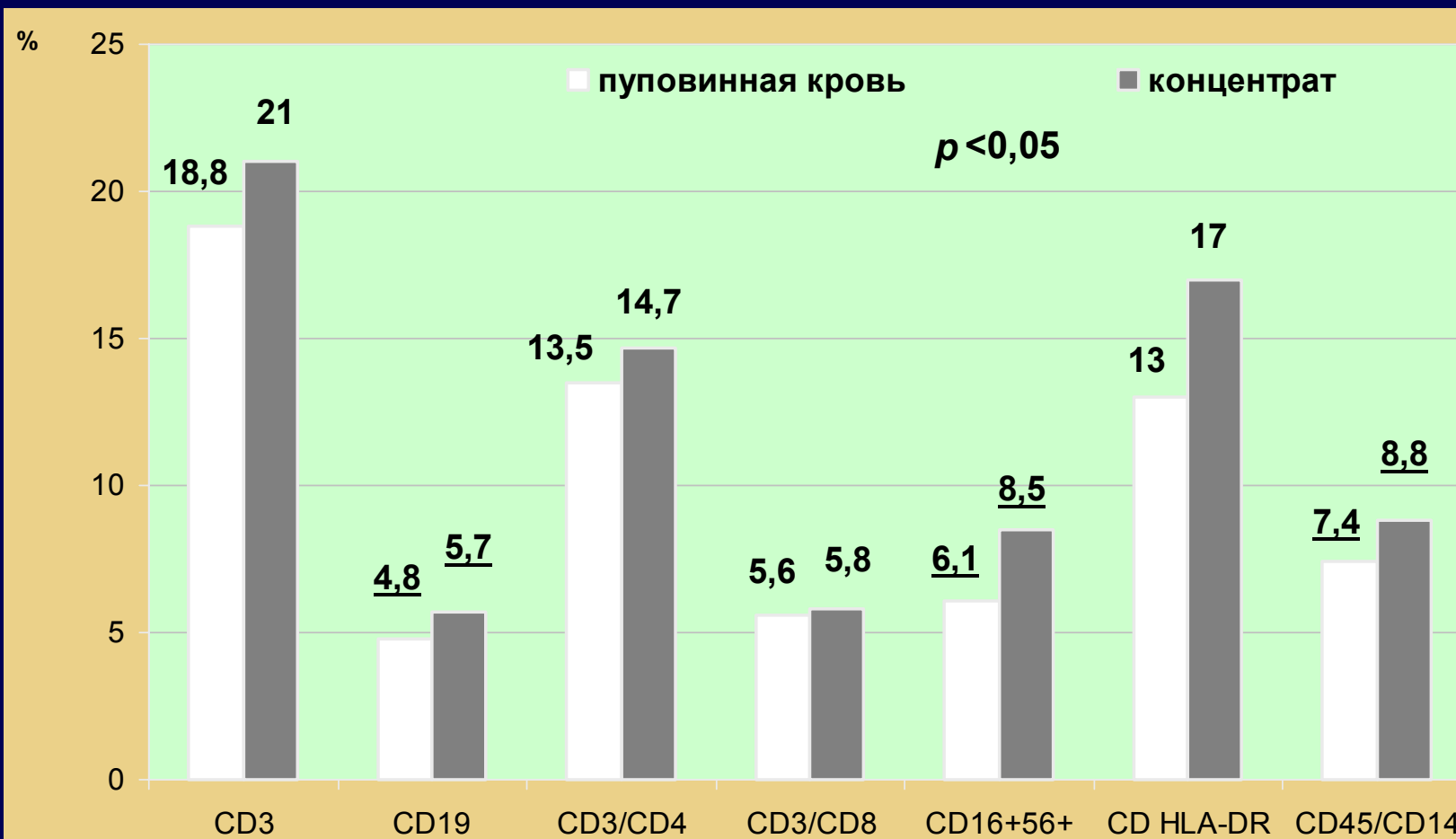


# Доля моноцитов, эозинофилов и базофилов в пуповинной крови и концентрате.

$p < 0,05$



## Иммунологическая характеристика лейкоцитов пуповинной крови доношенных новорожденных (% от всех лейкоцитов).



## Субпопуляции CD34+клеток пуповинной крови доношенных новорожденных

		34+ 133+	34+ 133-	34+ 38-	34+ 71+	34+ 44+	34+ 117+
	N	47	47	47	47	30	30
Пуповинная кровь	M±m	0.46 ±0.05	0.31 ±0.02	0.77 ±0.09	0.96 ±0.1	0.82 ±0.07	0.49 ± 0.05
концентрат	M±m	0.44 ±0.05	0.56 ±0.16	0.74 ±0.08	0.79 ±0.09	0.9 ±0.08	0.46 ± 0.04
	p	0.78	0.124	0.8	0.2	0.46	0.64



## Субпопуляции CD133+клеток пуповинной крови доношенных новорожденных

		133+ 106+	133+ 106-	133+ 31+	133-31+	31+ 62E+
	N	47	47	47	47	30
Пуповинная кровь	M±m	0.48 ± 0.07	0.25 ±0.02	0.88 ± 0.11	75.15 ±2.13	1.65 ± 0.3
Концентрат	M±m	0.46 ± 0.06	0.23 ± 0.02	0.8 ±0.08	68.75 ±2.59	2.46 ± 0.57
	p	0.83	0.48	0.55	0.052	0.21

# Сбор ГСК пуповинной крови

- ☀ Можно ли забирать у всех?

безвозмездное донорство  
персонифицированное хранение

- ☀ Процедура сбора

- ☀ Доставка к месту обработки

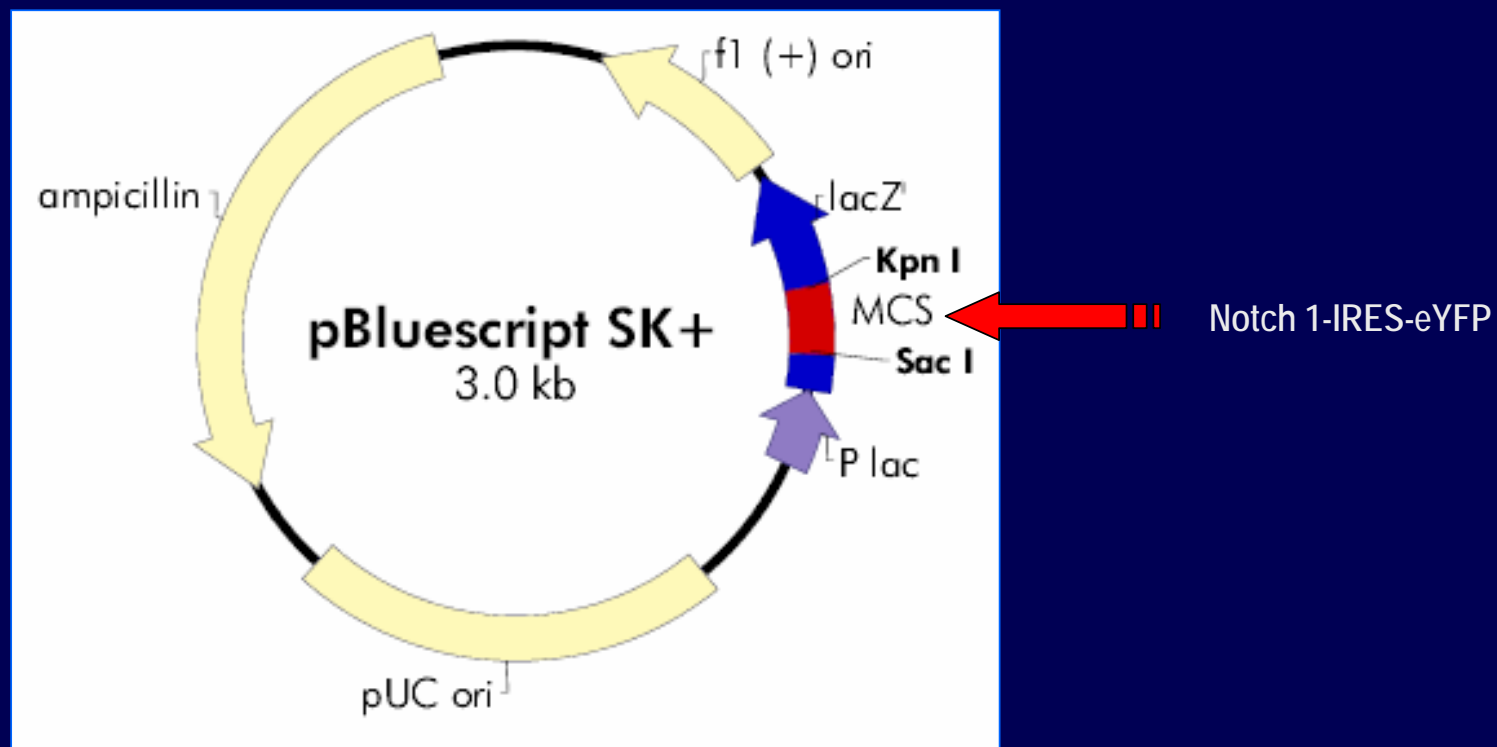
- ☀ Способ обработки

- ☀ Объем и методы тестирования

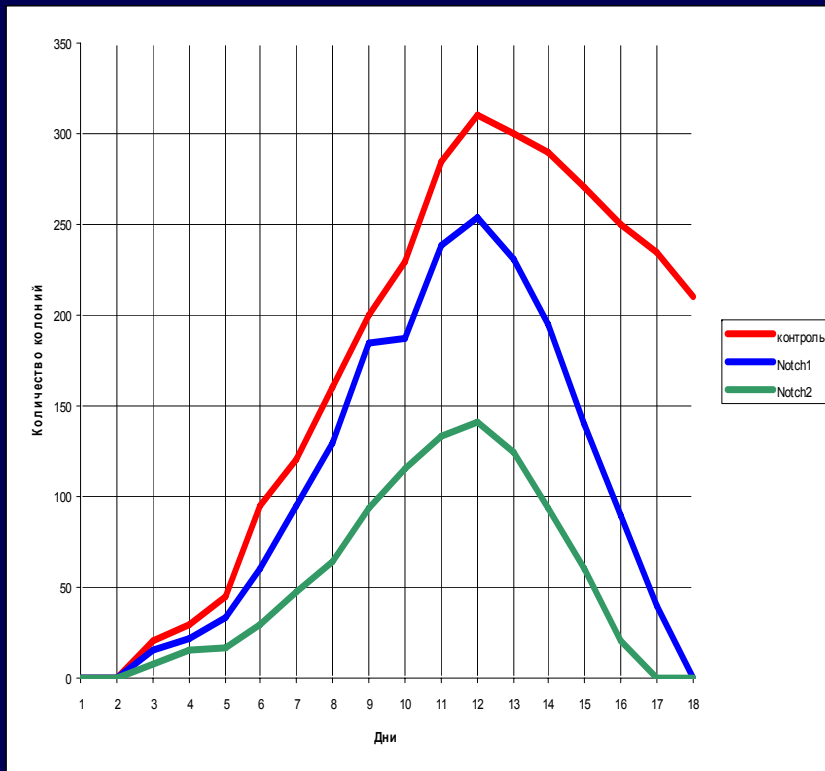
- ☀ **Возможности  
предтрансплантационного процессинга**

# Материалы и методы.

## Этапы создания векторных конструкций



# Динамика роста YFP<sup>+</sup> колоний в среде метилцеллюлозы.



- а. Гены Notch 1 и Notch 2 оказывают супрессивное действие на колониобразование, независимо от линейной принадлежности колоний.
- б. Угасание формирования новых колоний и их роста после 12 дней с момента начала эксперимента.
- в. Ген Notch 2 оказывал большее супрессивное воздействие, чем ген Notch 1.