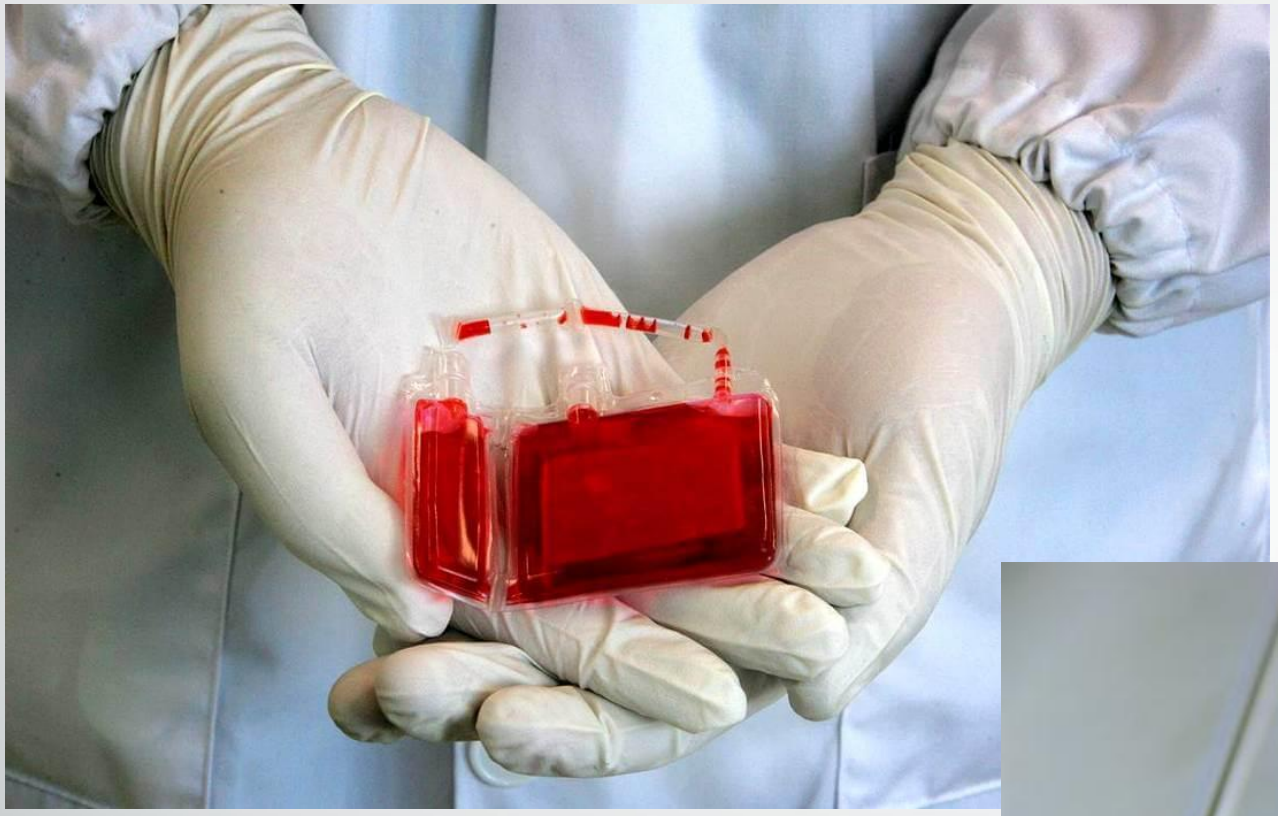
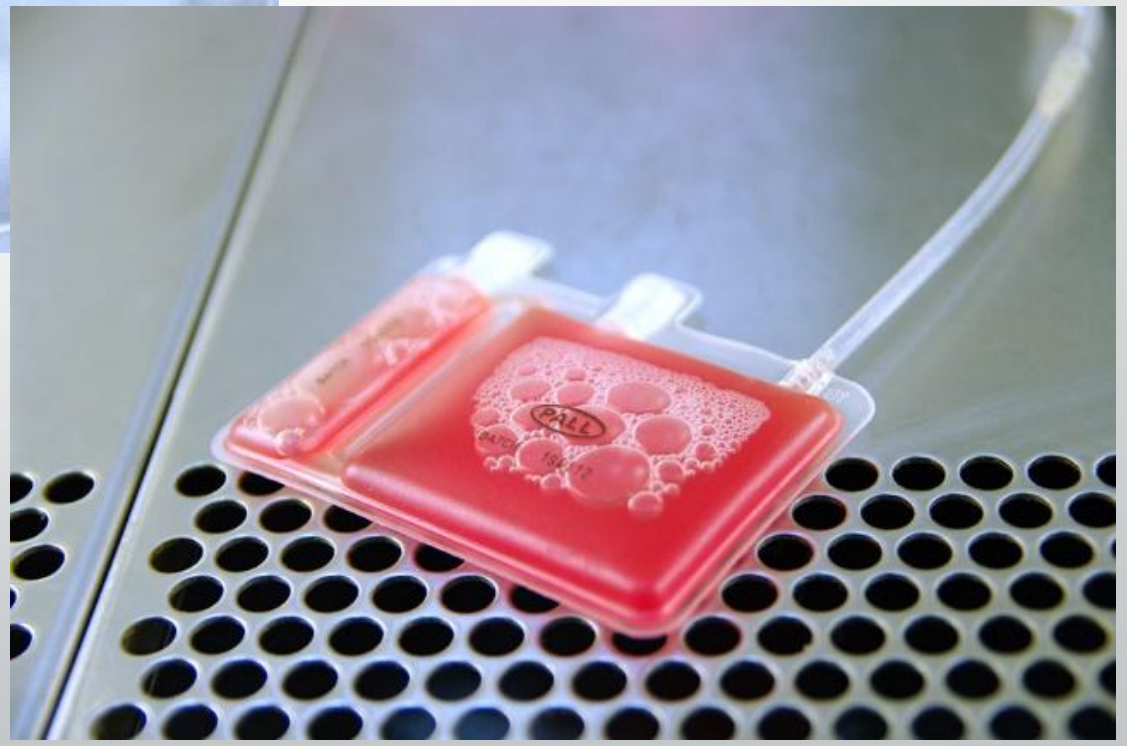
Криоконсервация, хранение и использовние стволовых клеток

Криоконсервация стволовых клеток

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

- Для длительной криоконсервации клетки замораживают до температуры -80 °С или ниже. Необходимость использования сверхнизких температур связана с тем, что только при таких условиях в клетках практически полностью прекращаются все биохимические процессы. Так, при температуре 0°С время жизни клеток весьма ограничено.
- Длительно сохранить клетки человека пока удается только в виде замороженной суспензии при температуре -80 °С или ниже. Сам процесс замораживания и последующего размораживания может оказать на клетку еще более губительное воздействие, чем просто охлаждение до 0 °С. Чтобы разрешить эту проблему, были изучены механизмы отрицательного влияния замораживания-размораживания и разработаны способы, позволяющие свести к минимуму повреждающие эффекты.





Концентрат стволовых клеток пуповинной крови перед криоконсервацией

В процессе замораживания клеток необходимо выделить следующие методические этапы:

1. Приготовление клеточных суспензий.

2. Подготовка клеточных суспензий к консервации (например, добавление криопротекторов).

3. Собственно замораживание.

4. Хранение криоконсервированных клеток в специальных емкостях при определенных температурах.

Ёмкости для хранения стволовых клеток

Замерзание суспензии обычно начинается с кристаллизации внеклеточной воды только при понижении температуры до -10 °С, при которой и происходит формирование «очагов» кристаллизации воды. Замерзание внутриклеточной жидкости обычно начинается при температуре около -40°С. На этапах замораживания клеточных суспензий повреждение клеток могут вызвать следующие факторы:

1. Скорость замораживания.

2. Перегрев клеток при замораживании наблюдается в результате выделения тепла в момент фазового перехода жидкой внеклеточной воды в лед. Такой перегрев также может привести к необратимому повреждению клеток.

3. Холодовой шок.

Криопротекторы

Несмотря на перечисленные выше проблемы, удается заморозить и затем разморозить суспензии клеток, сохранив при этом их жизнеспособность. Этого можно добиться благодаря одновременному использованию двух подходов:

1. Применение **криопротекторов** - веществ, которые обладают способностью предупреждать развитие криоповреждений и обеспечивать сохранность клеток в жизнеспособном состоянии после замораживания и размораживания.

2. Охлаждение с определенной, оптимальной для данного типа клеток скоростью.

- Криопротекторы разделяют на **быстро проникающие** в клетку низкомолекулярные вещества (диметилсульфоксид), **медленно проникающие** (глицерин) и **непроникающие** высокомолекулярные вещества (полиэтиленоксид).

- Общим механизмом действия криопротекторов является их способность связывать молекулы воды, что замедляет рост кристаллов льда.

Методы замораживания клеток и их хранение

Применяют два основных метода замораживания:

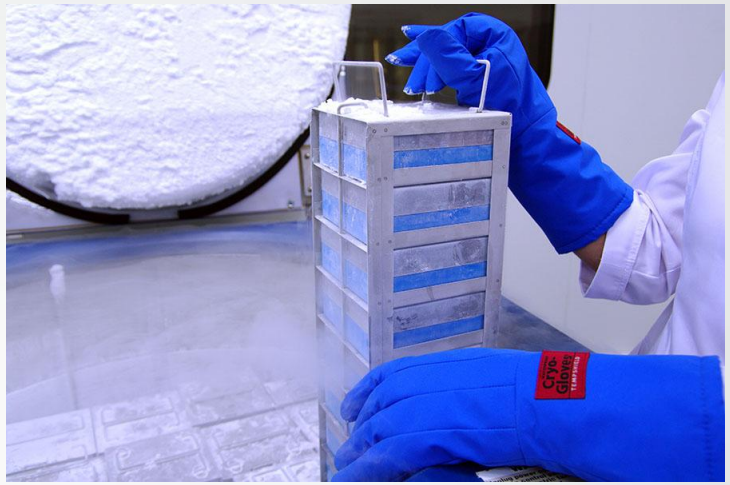
1. Неконтролируемое, или ручное замораживание, когда сосуд с суспензией клеток в смеси с криопротектором помещают в морозильную камеру (-80 °С) или в пары жидкого азота (-130°С) - замораживание происходит со скоростью примерно 1-3 °С в мин;

2. Контролируемое, или программное замораживание, при котором клеточные суспензии охлаждают с помощью специальных приборов - программных замораживателей.

Такой способ позволяет достичь наилучших результатов. Замороженные клетки хранят в электрических морозильных камерах при температуре от -80 до -130 °С или в сосудах Дьюара: жидким азотом при температуре -196 °С. Чем ниже температура в хранилище, тем дольше можно сохранить жизнеспособные клетки.

ГЕМАФОНА
АЗОТ ОБЕРЕЖНО

- Для заморозки стволовые клетки помещаются в специальный герметичный контейнер: **криомешок** или **криопробирки**.
- Клетки из мешка можно использовать только один раз, в отличие от пробирок, которые можно размораживать по одной и использовать несколько раз.
- Каждый образец стволовых клеток снабжают несколькими пробирками-спутниками из той же крови, чтобы при необходимости можно было провести дополнительные анализы, не размораживая основной образец.



Контейнер для заморозки

Криохранилище TYALOR-WHARTON с образцами стволовых клеток пуповинной крови

Размораживание клеток

- Необходимо для восстановления функциональной активности клеток после хранения.
- Существенным моментом является предотвращение токсического действия криопротекторов после размораживания (особенно токсичен для клеток диметилсульфоксид).
- Размороженные клетки отмывают от криопротекторов in vitro путем постепенного добавления изотонического раствора, содержащего 10-20% сыворотки или альбумина, что смягчает эффекты изменения осмотического давления.

Использование стволовых клеток

- Клетки могут быть использованы для лечения гематологических и онкологических больных (трансплантация стволовых клеток крови собственно больного или здорового донора при заболеваниях крови или солидных опухолях).
- В гематологии, радиомедицине, иммунологии и других областях медицины: трансплантация клеток крови донора при приобретенных или врожденных апластических анемиях; острая и хроническая лучевая болезнь, врожденные иммунодефицитные состояния; рассеянный склероз; ревматоидный артрит, системная красная волчанка и др.

Только в одной Москве существует несколько государственных медицинских учреждений, использующих в лечении больных стволовые клетки.

Среди них можно выделить такие центры, как:

- Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина,
- Медико-хирургический центр им. Н.В. Пирогова,
- Гематологический научный центр,
- Научный Центр сердечно-сосудистой хирургии им. А. Н. Бакулева РАМН,
- ФНЦ трансплантологии и искусственных органов имени академика Шумакова и другие.

Сахарный диабет

- В настоящее время основным методом терапии диабета является инсулинотерапия, позволяющая поддерживать углеводный обмен больных в норме, или прием сахароснижающих препаратов.
- При ***диабете 1-го типа*** поджелудочная железа не вырабатывает инсулин. Сегодня ученые с помощью клеточных технологий научились выращивать бета-клетки поджелудочной железы, ответственные за производство этого гормона. А это значит, что, используя стволовые клетки, можно восстановить его выработку поджелудочной железой и таким образом добиться полного излечения сахарного диабета 1-го типа.
- При ***диабете 2-го типа*** инсулин вырабатывается, но ткани организма его не воспринимают. Благодаря стволовым клеткам можно нормализовать уровень сахара в крови больного, повлияв на иммунорезистентность тканей, что позволит отменить прием сахароснижающих препаратов.

Иммунотерапия в онкологии стволовыми клетками

Наиболее современной и действенной из них является клеточная терапия рака, а среди всех ее вариантов особое место занимает лечение стволовыми клетками. Онкология всегда возникает на фоне иммунодефицита – недостатка иммунных тел в организме, которые не способны обезвредить зарождающуюся злокачественную опухоль.

<u>Виды рака, которые можно лечить стволовыми клетками</u>

- лейкемия;
- лимфомы;
- нейробластомы;
- рак молочной железы;
- рак яичка;
- рак легких;

множественные миеломы (миеломная болезнь).

Аутизм

Аутизм - это расстройство, возникающее вследствие нарушения развития головного мозга и характеризующееся выраженным и всесторонним дефицитом социального взаимодействия и общения, ограниченными интересами и повторяющимися действиями, а также часто крайней неприязнью к определенным звукам, текстуре и вкусам.

- Одним из способов лечения аутизма является применение стволовых клеток, извлеченных из человеческой пуповины (аллогенные мезенхимальные и CD34 клетки).

Детский церебральный паралич.

- Стволовые клетки служат базовым материалом в строительстве тканей живого организма. На этом и построена методика лечения ДЦП стволовыми клетками. Вводя их в организм, врачи добиваются улучшения работы всех органов и систем, в частности нервной и мышечной.
- При лечении церебрального паралича с помощью клеток важно начинать процедуры как можно раньше. В растущем организме гораздо больше шансов добиться успеха, чем в уже сформировавшемся.
- Дети, по сравнению со сверстниками с аналогичным диагнозом, значительно быстрее развиваются, у них улучшается работа опорно-двигательного аппарата, речевого центра, головного мозга.

СПАСИБО ЗА ВНИМАНИЕ