

Создание банка клеточных культур: опыт Центра клеточных технологий "Покровский"

Приходько Е. М.^{1,2}, Супильникова О. В.^{1,3}, Масленникова И. В.¹, Енукашвили Н. И.^{1,3},
Котова А. В.^{1,3}, Багаева В. В.^{1,3}, Золина Т. Л.¹, Конкина А. И.¹, Яцемирский Г. С.¹

¹ООО "Покровский банк стволовых клеток". Санкт-Петербург; ²Медицинский институт, ФГБОУ ВО "Санкт-Петербургский государственный университет". Санкт-Петербург; ³ФГБОУ ВО "Северо-Западный государственный медицинский университет им. И. И. Мечникова". Санкт-Петербург, Россия

Современные исследования в области клеточной биологии предъявляют высокие требования к используемым модельным объектам, в т.ч. клеточным культурам. Эти требования продиктованы необходимостью избежать артефактов в работе и снизить потенциальные риски для окружающей среды, связанные с биологической опасностью. В статье представлен опыт создания в соответствии с существующей нормативно-правовой базой Российской Федерации и мировым опытом банка клеточных культур персонального и общественного хранения в Центре клеточных технологий "Покровский". Рассмотрены основные моменты организации сбора, входного контроля качества, паспортизации, обработки, подготовки к хранению и хранения биологических материалов человека. Разработанные подходы и алгоритмы работы позволили создать коллекцию культур ранних пассажей, состоящую из паспортизованных образцов, соответствующих требованиям к клеточным культурам для изготовления высокотехнологичных лекарственных препаратов и биомедицинских клеточных продуктов, а также для научных исследований.

Ключевые слова: биобанк, биоресурсная коллекция, клеточные культуры, контроль качества клеточных культур, паспортизация

клеточных биообразцов, мезенхимные стволовые клетки, стволовые клетки пульпы зуба, клетки эндотелия пупочной вены.

Отношения и деятельность: нет.

Поступила 31/08-2024

Рецензия получена 09/10-2024

Принята к публикации 06/11-2024



Для цитирования: Приходько Е. М., Супильникова О. В., Масленникова И. В., Енукашвили Н. И., Котова А. В., Багаева В. В., Золина Т. Л., Конкина А. И., Яцемирский Г. С. Создание банка клеточных культур: опыт Центра клеточных технологий "Покровский". *Кардиоваскулярная терапия и профилактика*. 2024;23(11):4173. doi: 10.15829/1728-8800-2024-4173. EDN KVZRMX

Creation of a cell culture bank: experience of the Pokrovsky Cell Technology Center

Prikhodko E. M.^{1,2}, Supilnikova O. V.^{1,3}, Maslennikova I. V.¹, Yenukashvili N. I.^{1,3}, Kotova A. V.^{1,3}, Bagaeva V. V.^{1,3}, Zolina T. L.¹, Konkina A. I.¹, Yatsemirsky G. S.¹

¹Pokrovsky Stem Cell Bank. Saint Petersburg; ²Medical Institute, Saint Petersburg State University. Saint Petersburg; ³Mechnikov North-Western State Medical University. Saint Petersburg, Russia

Modern research in cell biology places high demands on the model objects used, including cell cultures. These requirements are dictated by the need to avoid artifacts in work and reduce potential risks to the environment associated with biological hazard. The article presents the experience of creating cell culture bank for personal and public storage at the Pokrovsky Cell Technology Center. The main points of managing the collection, incoming quality control, certification, processing, preparation for storage and storage of human biological materials are considered. The developed approaches and work algorithms made it possible to create a collection of early passage cultures consisting of certified samples that meet the requirements for cell cultures for the manufacture of high-tech drugs and biomedical cell products, as well as for research.

Keywords: biobank, bioresource collection, cell cultures, cell culture quality control, certification of cell biosamples, mesenchymal stem cells, dental pulp stem cells, umbilical vein endothelial cells.

Relationships and Activities: none.

Prikhodko E. M.* ORCID: 0000-0002-5049-1368, Supilnikova O. V. ORCID: 0009-0003-2082-2140, Maslennikova I. V. ORCID: 0009-0005-5099-1572, Yenukashvili N. I. ORCID: 0000-0002-5971-7917, Kotova A. V. ORCID: 0000-0002-2887-344X, Bagaeva V. V. ORCID: 0009-0008-5104-2872, Zolina T. L. ORCID: 0009-0006-8795-6102, Konkina A. I. ORCID: 0009-0004-6803-9777, Yatsemirsky G. S. ORCID: 0009-0005-8628-5581.

*Автор, ответственный за переписку (Corresponding author):

e-mail: ceo@pokrovcell.ru

[Приходько Е. М.* — генеральный директор, ассистент кафедры пропедевтики внутренних болезней, ORCID: 0000-0002-5049-1368, Супильникова О. В. — зав. биотехнологическим центром, м.н.с. научно-исследовательской лаборатории клеточных технологий, ORCID: 0009-0003-2082-2140, Масленникова И. И. — к.б.н., советник биотехнологического центра, ORCID: 0009-0005-5099-1572, Енукашвили Н. И. — к.б.н., руководитель отдела научных проектов и разработок и зав. лабораторией клеточных культур, с.н.с. научно-исследовательской лаборатории клеточных технологий, ORCID: 0000-0002-5971-7917, Котова А. В. — биолог биотехнологического центра, н.с. научно-исследовательской лаборатории клеточных технологий, ORCID: 0000-0002-2887-344X, Багаева В. В. — руководитель отдела производства БМКП, м.н.с. научно-исследовательской лаборатории клеточных технологий, ORCID: 0009-0008-5104-2872, Золина Т. Л. — руководитель отдела контроля качества, ORCID: 0009-0006-8795-6102, Конкина А. И. — врач клинической лабораторной диагностики, ORCID: 0009-0004-6803-9777, Яцемирский Г. С. — зав. лабораторией проточной цитометрии, ORCID: 0009-0005-8628-5581].

*Corresponding author: ceo@pokrovcell.ru

Received: 31/08-2024

Revision Received: 09/10-2024

Accepted: 06/11-2024

For citation: Prikhodko E. M., Supilnikova O. V., Maslennikova I. V., Yenukashvili N. I., Kotova A. V., Bagaeva V. V., Zolina T. L., Konkina A. I., Yatsemirsky G. S. Creation of a cell culture bank: experience of the Pokrovsky Cell Technology Center. *Cardiovascular Therapy and Prevention*. 2024;23(11):4173. doi: 10.15829/1728-8800-2024-4173. EDN KVZRMX

БМКП — биомедицинский клеточный продукт, ВИЧ — вирус иммунодефицита человека, ВТЛП — высокотехнологичное лекарственное средство, ГСК — гемопоэтические стволовые клетки, КК — клеточная культура, КЛД — клиническая лабораторная диагностика, МНФ — моноклеарная фракция, МСК — мезенхимные стромальные клетки, ПБСК — Покровский банк стволовых клеток, СК — стволовые клетки, ФСВОК — Федеральная система внешней оценки качества, ЦКТ — Центр клеточных технологий, HUVEC — human umbilical vein endothelial cells (эндотелиальные клетки пупочной вены человека), РКТК (RCTCC) — Российская коллекция типовых клеточных культур, STR — short tandem repeat (короткие tandemные повторы).

Ключевые моменты

Что известно о предмете исследования?

- При создании биобанков клеточных культур для производства высокотехнологичных лекарственных препаратов и для проведения научных исследований исследователи сталкиваются со сложностями, связанными с недостаточной проработанностью нормативно-правовой базы, отсутствием жестких критериев контроля качества культур.

Что добавляют результаты исследования?

- Разработанные методы, в т.ч. по обеспечению и контролю качества позволили создать крупнейшую в Северо-Западном регионе коллекцию культур мезенхимных стромальных клеток, фибробластов, клеток эндотелия пупочной вены человека ранних пассажей, состоящую из паспортизованных образцов, соответствующих существующим требованиям к клеточным культурам для изготовления высокотехнологичных лекарственных препаратов, а также для научных исследований.

Key messages

What is already known about the subject?

- When creating cell culture biobanks for the production of high-tech drugs and for conducting studies, researchers encounter difficulties with insufficiently developed regulatory framework, the absence of strict criteria for culture quality control.

What might this study add?

- The developed methods, including quality assurance and control, made it possible to create the largest collection of cultures of mesenchymal stromal cells, fibroblasts, early-passaged human umbilical vein endothelial cells in the North-West region, consisting of certified samples that meet existing cell culture requirements for the production of high-tech drugs, as well as for research.

Введение

Среди самых больших достижений биологии XXв можно назвать развитие технологии культивирования клеток, тканей и органов вне организма. В настоящее время биомедицинская наука далеко продвинулась вперед в этом направлении — созданы технологии культивирования практически любых типов клеток: от гамет до полностью дифференцированных соматических клеток, разработаны методики репрограммирования клеток, растущих в культуре. На основе этих технологий и данных фундаментальных исследований разрабатываются протоколы лечения в рамках трансляционной медицины. Развитие как исследовательских программ, так и методов регенеративной медицины привело к появлению потребности в наличии полностью охарактеризованных (паспортизованных) клеточных культур (КК), полученных с соблюдением принципов биоэтики в условиях постоянного контроля качества. Для клинических целей КК должны быть получены и помещены в биобанк с соблюдением Правил надлежащей практики по

работе с биомедицинскими клеточными продуктами¹. Требования к биобанкированию являются обязательными при депонировании материала, предназначенного для клинических и доклинических исследований, а также для производства биомедицинских клеточных продуктов (БМКП) и/или высокотехнологичных лекарственных препаратов (ВТЛП). Помимо этих требований следует также принимать во внимание нормативную базу Евразийского экономического союза, в частности, Решения Совета Евразийской экономической комиссии (таблица 1), регламентирующие правила производства и регистрации ВТЛП, к которым относятся некоторые из клеточных продуктов. В случае ориентации продукции биобанка на Евразийский союз с целью приготовления сырья для производства ВТЛП необходимо соблюдение принципов всех надлежащих практик: лабораторной — Good

¹ Приказ Минздрава России от 08.08.2018г № 512н "Об утверждении Правил надлежащей практики по работе с биомедицинскими клеточными продуктами".

Таблица 1

**Нормативные документы, регламентирующие работу
биобанков и коллекций КК для различного применения**

Документ	Этапы биобанкирования, регламентируемые документом
Приказ Минздрава России от 20.10.2017 № 842н (ред. от 30.01.2019) "Об утверждении требований к организации и деятельности биобанков и правил хранения биологического материала, клеток для приготовления клеточных линий, клеточных линий, предназначенных для производства биомедицинских клеточных продуктов, биомедицинских клеточных продуктов"	Основные принципы организации биобанка, требования к персоналу и помещениям
Приказ Минздрава России от 27.03.2018 № 125н "Об утверждении порядка медицинского обследования донора биологического материала и перечня противопоказаний (абсолютных и относительных) для получения биологического материала"	Перечень показаний и противопоказания для донорства, перечень медицинских обследований донора
Приказ Минздрава России от 8.08.2018 № 512н "Об утверждении Правил надлежащей практики по работе с биомедицинскими клеточными продуктами"	Устанавливает правила производства клеточных линий для БМКП
Приказ Минздрава России от 11.08.2017 № 517н "Об утверждении формы информированного добровольного согласия донора биологического материала либо одного из родителей или иного законного представителя на безвозмездное предоставление биологического материала для производства биомедицинского клеточного продукта, в т.ч. в целях проведения доклинических исследований и/или клинических исследований, и формы письменного согласия супруга/супруги либо одного из родственников умершего лица на посмертное предоставление биологического материала для производства биомедицинского клеточного продукта, в т.ч. в целях проведения доклинических исследований и/или клинических исследований"	Устанавливает форму добровольного согласия донора для БМКП. Особенность формы — она заполняется как для аутологичного, так и для аллогенного материала
Приказ Минздрава России от 31.01.2017 № 32н (ред. от 30.01.2019) "Об утверждении Порядка представления документов, из которых формируется регистрационное досье на биомедицинский клеточный продукт, и формы заявления о государственной регистрации"	Приказ необходимо учитывать, если в биобанке получают линию для последующего производства БМКП, т.к. он устанавливает перечень необходимых документов для досье. Часть данных (например, элементы спецификации) можно получить только на этапе биобанкирования
Приказ Минздрава России от 19.01.2017 № 14н (ред. от 30.01.2019) "Об утверждении формы спецификации на биомедицинский клеточный продукт" (Зарегистрировано в Минюсте России 13.02.2017 № 45607)	Утверждает форму спецификации на БМКП. При депонировании клеточной линии должна учитываться необходимость последующего предоставления данных для спецификации клеточного продукта. Спецификация готовится производителем продукта, однако он вправе запросить данные и подтверждающие документы для включения в спецификацию
Приказ Росздравнадзора от 19.01.2022 № 184 "Об утверждении формы оценочного листа, в соответствии с которым Федеральной службой по надзору в сфере здравоохранения проводится оценка соответствия соискателя лицензии или лицензиата лицензионным требованиям при осуществлении деятельности по производству биомедицинских клеточных продуктов"	Проверочный лист (чек-лист) для предприятий по производству БМКП. Если биобанк одной из своих целей ставит производство клеточных линий для БМКП, этот чек-лист должен учитываться при создании системы биобанкирования
*Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 03.11.2016 № 78 (ред. от 29.05.2024) № 78 "О Правилах регистрации и экспертизы лекарственных средств для медицинского применения" с учетом Решения Совета Евразийской экономической комиссии от 17.03. 2022 № 36 "О внесении изменений в Правила регистрации и экспертизы лекарственных средств для медицинского применения"	Устанавливает понятие высокотехнологичного лекарственного препарата. Устанавливает требования к их регистрации, из которых вытекают некоторые принципы биобанкирования и получения клеточно-содержащих продуктов
*Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 03.11.2016 № 77 "Об утверждении Правил надлежащей производственной практики Евразийского экономического союза"	Устанавливает ряд требований к производству, банкированию продуктов на клеточной основе, подпадающих под определение высокотехнологичного лекарственного препарата
*ГОСТ Р 52249-2009 Национальный стандарт российской федерации правила производства и контроля качества лекарственных средств — GMP	Устанавливает стандарты GMP
Приказ Минздрава России от 31.08.2016 № 646н "Об утверждении Правил надлежащей практики хранения и перевозки лекарственных препаратов для медицинского применения"	Регламентирует процессы, связанные с транспортировкой и хранением лекарственных препаратов
Федеральный закон от 27.07.2006 № 152-ФЗ (ред. от 14.07.2022) "О персональных данных"	Защита персональных данных донора
**ОФС.1.7.2.0011.15. Общая фармакопейная статья. Требования к клеточным культурам — субстратам производства биологических лекарственных препаратов (утверждена и введена в действие Приказом Минздрава России от 31.10.2018 № 749) ("Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV издание. Том II")	Устанавливает требования к первичным и перерабатываемым (диплоидным и гетероплоидным) КК человека и животных, применяемым в качестве субстратов производства и контроля вирусных вакцин

Таблица 1. Продолжение

Документ	Этапы биобанкирования, регламентируемые документом
Приказ Минпромторга России от 14.06.2013 № 916 (ред. от 18.12.2015) "Об утверждении Правил надлежащей производственной практики" (Зарегистрировано в Минюсте России 10.09.2013 № 29938). Приложение 2	Технология производства биологических (в т.ч. иммунобиологических), фармацевтических субстанций и биологических лекарственных препаратов (далее — "биологические фармацевтические субстанции и лекарственные препараты")

Примечание: * — данные требования распространяются на процесс производства высокотехнологичного лекарственного препарата, т.е. при работе в рамках законодательства Евразийского экономического союза, ** — распространяется на КК человека и животных, применяемым в качестве субстратов производства и контроля вирусных вакцин, иммунобиологических препаратов. БМКП — биомедицинский клеточный продукт, КК — клеточные культуры, GMP — Good manufacturing practice for medicinal products.

Laboratory Practice (GLP), производственной — Good Manufacturing Practices (GMP), хранения — Good Storage Practices (GSP), дистрибуции — Good Distribution Practices (GDP). Подобные требования сформировали запрос на появление и развитие биобанков, соответствующих данным требованиям. В статье описывается опыт создания банка коллекции КК Центра клеточных технологий (ЦКТ) в соответствии с данными требованиями.

Структура ЦКТ "Покровский"

ЦКТ "Покровский" является подразделением общества с ограниченной ответственностью "Покровский банк стволовых клеток" (ПБСК). Структура ЦКТ "Покровский" разрабатывалась с учетом необходимости контроля и поддержания банка коллекции КК. В настоящий момент в ЦКТ "Покровский" создана коллекция первичных культур мезенхимных стромальных клеток (МСК) из разных источников, и продолжается работа по увеличению количества охарактеризованных первичных культур клеток для использования в научных исследованиях. Деятельность ЦКТ реализуется на основе гибридной модели [1], первоначально разработанной для банков пуповинной крови. В таких банках комбинируются две модели хранения биоматериала: публичное хранение донорских образцов за счет средств банка КК и персонализированное хранение, оплачиваемое физическим лицом или организацией-владельцем образца. Образцы публичного хранения, в отличие от персонализированного, могут быть предоставлены организациям для научной деятельности, доклинических и клинических исследований.

ЦКТ состоит из 3-х подразделений — Биотехнологического и Медицинского центров, Коммерческого отдела. Коммерческий отдел обеспечивает взаимодействие ЦКТ с клиентами, желающими воспользоваться услугами персонального хранения биоматериала. Биотехнологический центр, осуществляющий основную деятельность по получению и банкированию биоматериала, в свою очередь, состоит из 4-х отделений: отделения КК, криоконсервирования и хранения, клинической лабораторной диагностики (КЛД) и отдела науч-

ных проектов и разработок. Все эти отделения тесно взаимодействуют друг с другом, и каждое из них принимает участие в разных этапах обработки биоматериалов и контроля качества (рисунок 1).

Основная задача ЦКТ заключается в сохранении культур клеток и образцов моноклональной фракции (МНФ) пуповинной крови человека для использования в медицинской практике, создания новых клеточных технологий, проведения научных исследований и поддержания биологического разнообразия коллекций. В рамках этой задачи с 2021г ЦКТ включился в работу над проектом по созданию базового депозитария Российской коллекции типовых клеточных культур (РКТКК, RCTCC) вместе с Институтом цитологии, Институтом биологии развития и Институтом цитологии и генетики Сибирского отделения РАН. Цель ЦКТ в этом проекте — создание банка культур МСК ранних пассажей из разных источников: паспортизация уже имеющихся, получение и паспортизация новых культур для использования в научных исследованиях. Для паспортизации культур в ЦКТ осуществляется поэтапный контроль качества: каждый образец проходит путь от сбора, процедуры приемки, выделения, подготовки к криохранению до длительного хранения при температуре -196°С. На каждом этапе этого пути, в результате проведения исследований, образец приобретает документ (протокол), который становится частью его досье, и в итоге полностью охарактеризованный образец получает паспорт.

Нормативная документация

Работа ЦКТ выстроена на основе нормативных документов, регламентирующих работу биобанков и организацию процесса производства КК (таблица 1). Помимо этого, при создании банка КК ранних пассажей опирались на ряд признанных международных и национальных стандартов, таких как Передовые практики ISBER (International Society for Biological and Environmental Repositories, Международное общество биологических и экологических репозиториях) [2], ГОСТ Р ИСО 9001²; ГОСТ

² ГОСТ Р ИСО 9001–2015. Национальный стандарт Российской Федерации. Системы менеджмента качества. Требования.

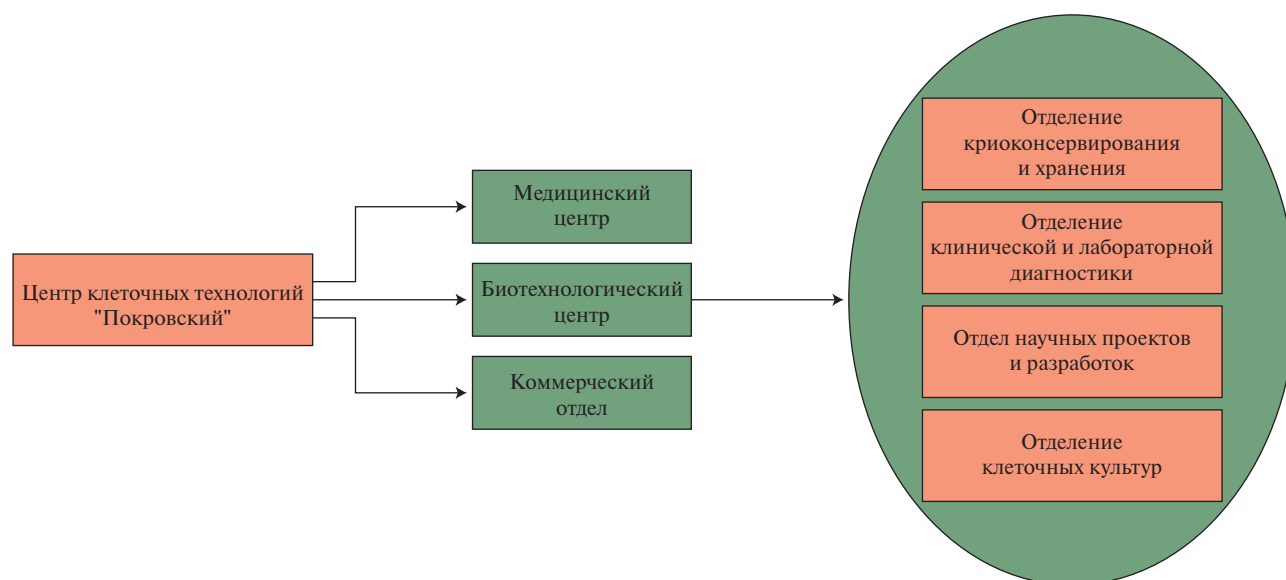


Рис. 1 Схема организации Центра клеточных технологий.

Р ИСО 20387³. С принятием Федерального закона № 180-ФЗ "О биомедицинских клеточных продуктах" от 23.06.2016, а также при вводе новой редакции Решения Совета Евразийской экономической комиссии от 03.11.2016 № 78 этот список пополняется нормативными актами, представленными в таблице 1.

Вышеприведенные документы позволили создать собственную систему документации и оформить все выполняемые манипуляции в виде стандартных операционных процедур в соответствии с ГОСТ Р ИСО 20387. ЦКТ получил сертификат соответствия стандарту менеджмента качества ГОСТ Р ИСО 9001 в 2022г на медицинские услуги по подготовке к хранению гемопоэтических стволовых клеток (ГСК), хранению ГСК и другого биологического материала и лабораторной диагностике и успешно подтвердил соответствие ему в 2023г. С 2014г отделение КЛД ПБСК ежегодно принимает участие во всех циклах межлабораторных сравнительных испытаний Федеральной системы внешней оценки качества (ФСВОК) проводимых исследований⁴.

Биоэтические принципы

Вся деятельность по сбору биологического материала и его последующему хранению осуществляется в соответствии с Хельсинкской декларацией Всемирной медицинской ассоциации⁵, а также

³ ГОСТ Р ИСО 20387–2021. Национальный стандарт Российской Федерации. Биотехнология. Биобанкинг. Общие требования.

⁴ Федеральная система внешней оценки качества (ФСВОК): <http://www.fsvok.ru/>.

⁵ Хельсинкская декларация: этические принципы медицинских исследований с участием человека, включая поправки, внесенные на 64-м заседании ВМА в Форталезе, Бразилия, октябрь 2013г (WMA declaration of Helsinki — ethical principles for medical research involving human subjects, 1964).

в соответствии с нормативными актами, регулирующими работу с донорами (таблица 1). Основные принципы деятельности ПБСК — это соблюдение конфиденциальности информации, обеспечение безопасности сотрудников, контактирующих с биологическим материалом, доступности биоматериала для научных исследований при анонимности доноров и их добровольного информированного согласия на использование биоматериала. Хранение данных осуществляется в соответствии с требованиями к защите персональных данных доноров.

Организация процессов

По нашему опыту, ключевым этапом для организации коллекции КК является изначальное правильное планирование и выстраивание общей схемы рабочего процесса: от поступления материала до выдачи из коллекции заказанного образца.

Биоматериал, предназначенный для получения КК, транспортируется в банк при условиях, обеспечивающих их сохранность. Различные виды биоматериала требуют разных условий транспортировки. Например, установили, что оптимальной температурой для транспортировки биоматериала для выделения МСК является диапазон 21-23°С. Соблюдение условий транспортировки контролируется во время транспортировки и при поступлении в ЦКТ. Обязательным условием является полная прослеживаемость всех этапов обработки материала (рисунок 2). При поступлении в ЦКТ биоматериала для обработки осуществляется регистрация — фиксируются данные о типе материала, дата и время поступления, количество образцов и название учреждения; информация о том, откуда доставлен материал, имя курьера и имя принявшего биоматериал работника, заносится в журнал регистрации образцов — бумажный и электронный. Доступ к электронному журналу разрешен



Рис. 2 Схема перемещения образца в ЦКТ "Покровский".

Примечание: ЦКТ — Центр клеточных технологий, STR — short tandem repeat (короткие tandemные повторы).

только санкционированным пользователям — тем, кто непосредственно занимается обработкой биоматериала и контролем качества.

Каждому образцу, поступившему в ЦКТ, присваивается индивидуальный код, под которым производится обработка и осуществляется хранение. Код позволяет обеспечить прослеживаемость пути образца в ЦКТ и деперсонализировать донора. Поступивший образец сопровождают документы: лист анамнеза донора и сопроводительная записка, содержащая информацию о дате, времени, способе сбора биоматериала, ФИО сотрудников, проводивших сбор материала и передачу его курьеру ЦКТ. На основании изучения этих документов и данных входного контроля принимается решение о дальнейшей обработке или утилизации образца. До изъятия биоматериала у донора получают информированное согласие, оформленное в соответствии с приказом Минздрава России № 517н от 11.08.2017 (таблица 1). Информацию об образце и обработке, которой он подвергся, записывают в протокол идентификации и протокол выделения (рисунок 2).

Для паспортизации проводится поэтапный контроль качества каждого полученного образца и расходных материалов, а именно:

- входной,
- промежуточный,
- выходной (при передаче образца заказчику в другое учреждение).

Под входным контролем подразумевается обследование донора — биоматериал для получения КК сопровождается аликвотой крови донора, которую исследуют на наличие антител к *Treponema pallidum*, а также к вирусам иммунодефицита человека (ВИЧ), гепатитам В и С, вне зависимости от того,

были ли выполнены эти исследования в месте сбора образца (например, лечебно-профилактическом учреждении). Согласно Приказу № 125н Минздрава России от 27.03.2018, образцы должны быть протестированы на присутствие антител к гепатиту В, в т.ч. — к HbsAg. Данные антитела могут появиться в результате вакцинации, поэтому все доноры предоставляют прививочные сертификаты. Согласно Приказу № 125н, в части, касающейся перечня абсолютных противопоказаний к донорству, указано, что образцы, наличие антител к гепатиту в которых подтверждено прививочным сертификатом, подлежат хранению. Также при наличии антител проводится ПЦР (полимеразная цепная реакция)-тест на присутствие в образце рибонуклеиновой кислоты (РНК), дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) возбудителей. При первичном обнаружении (ранее антитела у донора не выявляли) проводится повторное исследование в сторонней лаборатории для подтверждения результата. При выделении МНФ пуповинной крови, образцы пуповинной крови отбирают для анализа на присутствие бактериальной и грибковой контаминации, антител и антигена ВИЧ, вирусов гепатитов В и С, антител к цитомегаловирусу и токсоплазме, к *Treponema pallidum*, а также определяются группа крови и резус-фактор донора.

Таким образом, каждый образец на этапе обработки обладает следующими документами (в бумажной и электронной форме): анамнезом, информированным согласием донора, протоколами идентификации и выделения, результатами исследований на инфекции — ВИЧ, гепатиты В и С, сифилис и др.

Обработка образцов проводится согласно стандартным операционным процедурам, разработанным

ным для каждого вида биоматериала. Все этапы фиксируются в протоколе обработки биоматериала (в бумажной и электронной формах). После обработки биоматериала осуществляется его криоконсервация или культивирование клеток с последующей криоконсервацией. Образцы первоначально, до получения всех данных промежуточного контроля качества, хранятся в карантинном хранилище. Параллельно проводятся контроль качества, исследования, характеризующие образец, для создания досье и паспорта. После получения результатов на наличие/отсутствие контаминирующих агентов, образцы перемещают в основное криохранилище. КК переносят в сосуды Дьюара для основного хранения после полной консервации всей культуры и проведения исследований.

Неотъемлемой частью входного и промежуточного контроля является аутентификация образца методом профилирования по коротким tandemным повторам (short tandem repeat, STR) [3]. STR-профилирование помогает отследить кросс-контаминацию, идентифицировать культуру в случае утраты маркировки на криопробирке или в случае сомнения в её принадлежности конкретному донору. Для этого исследования отбирают фрагмент образца до его обработки и аликвоту КК после культивирования. Полученные STR-профили ткани и культуры сравнивают между собой для подтверждения аутентичности. STR-профилирование также проводится по запросу в рамках выходного контроля при передаче КК Заказчику. Важное значение имеет STR-профилирование при работе с МСК пупочного канатика, где особенно высока вероятность получения смешанной КК, состоящей из клеток матери и ребенка.

Для определения процентного состава КК в рамках промежуточного и выходного контроля качества применяется метод проточной цитометрии — анализируется набор поверхностных маркёров, характерных для данного типа клеток (например, МСК, ГСК, эндотелиальных клеток пупочной вены человека (human umbilical vein endothelial cells, HUVEC) и т.д. Так, для определения процентного содержания МСК используется набор маркёров, предложенный в 2006г — ISCT (International society for cell and gene therapy, Международным обществом клеточной и генной терапии) [4]. Проводится кариотипирование методом G-бандирования для подтверждения отсутствия хромосомных перестроек. Также проводится ПЦР или секвенирование для подтверждения наличия маркерного участка гена при наличии такового. Для контроля стерильности КК отбирают аликвоты среды для проверки на бактериальную и грибковую контаминацию. Аликвоты КК анализируют на отсутствие микоплазм. При наличии маркерных особенностей КК (способность к дифференцировке в трех направлениях для МСК,

поглощение Dil-Ac-LDL для HUVEC, колониеобразующий тест для ГСК и др.) проводят соответствующие исследования.

На основании протоколов проведённых исследований создается паспорт, в котором указаны результаты аутентификации КК и контроля качества, отражены характеристики клеток и описаны условия для оптимального культивирования и криоконсервации.

В создании характеристики образца и контроле качества участвуют как лаборатории ЦКТ, так и несколько сторонних организаций. Лаборатории ЦКТ, которые главным образом задействованы в контроле качества, зарегистрированы в программе ФСВОК (внешней оценки качества клинических лабораторных исследований) Ассоциации специалистов, некоммерческое партнёрство "Центр внешнего контроля качества клинических лабораторных исследований" (МСИ ФСВОК). Важность участия КДЛ в системах внешней оценки качества отражена в основополагающем международном стандарте ISO 15189:2012⁶, устанавливающем требования к деятельности КДЛ, а также в аналогичном отечественном стандарте ГОСТ Р ИСО 15189⁷, приказах Минздрава России и других ГОСТах (ГОСТ Р 53022.1⁸, ГОСТ Р 53079.2⁹ и др.). Пробы культуральной среды, пуповинной крови отправляются для исследований на бактериальную и грибную контаминацию в Северо-западный центр доказательной медицины¹⁰ (АО "СЗЦДМ", Санкт-Петербург). STR-профилирование образцов проводится в центре генетической экспертизы ООО "Медико-биологический центр"¹¹ (Великий Новгород).

Криоконсервация — наиболее длительный период в процессинге биообразцов, поэтому организация криохранилища в ЦКТ разработана с учетом анализа возможных рисков при хранении биоматериалов. Зона криоконсервирования состоит из двух помещений: зоны криоконсерви-

⁶ ISO 15189:2012 — Medical laboratories.

⁷ ГОСТ Р ИСО 15189–2015. Национальный стандарт Российской Федерации. Лаборатории медицинские. Частные требования к качеству и компетентности.

⁸ ГОСТ Р 53022.1–2008. Национальный стандарт Российской Федерации. Технологии лабораторные клинические. Требования к качеству клинических лабораторных исследований. Часть 1. Правила менеджмента качества клинических лабораторных исследований.

⁹ ГОСТ Р 53079.2–2008. Национальный стандарт Российской Федерации. Технологии лабораторные клинические. Обеспечение качества клинических лабораторных исследований. Часть 2. Руководство по управлению качеством в клиничко-диагностической лаборатории. Типовая модель.

¹⁰ АО "СЗЦДМ": <https://cdmed.ru/>.

¹¹ Судебно-генетическая экспертиза ООО "Медико-Биологический Центр": otcovo.ru.



Рис. 3 Состав коллекции КК ранних пассажей ЦКТ "Покровский".
Примечание: КК — клеточные культуры, МСК — мезенхимные стромальные клетки, СТ — стволовые клетки, ЦКТ — Центр клеточных технологий, HUVEC — human umbilical vein endothelial cells.

рования и хранения и зоны основного криохрани- ния. Вход в них ограничен, доступ в помещение осуществляется по отпечатку пальца. Помещения оснащены датчиками уровня кислорода. Каждый сосуд Дьюара оборудован датчиком уровня азо- та, а показания с датчиков обрабатывает систе- ма мониторинга COMCRYO (ООО "Криогентех", Санкт-Петербург). Система мониторинга изме- ряет уровень азота и температуру в сосуде Дьюа- ра и отображает данные на мониторе компьютера в криохранилище. В случае резких изменений тем- пературы или уровня азота система оповещения отправляет смс-сообщение в качестве сигнала тре- воги на номер ответственного работника и реги-стрирует в своей системе колебания показателей, создавая отчет. Кроме того, система оборудова-

на веб-интерфейсом: информация обо всех по- казаниях с датчиков хранится на сервере. Доступ к этим данным также является авторизованным. В ЦКТ разработана программа контроля за усло- виями криоконсервации и хранения биоматериа- ла. Контролем качества криоконсервации является количество живых клеток до и после криоконсер- вации образца. Наличие программных заморажи- вателей с валидированной программой заморозки обеспечивает контролируемые и воспроизводи- мые условия замораживания [5]. Мониторинг та- ких параметров, как температура и уровень азота, в криохранилищах в процессе длительного хране- ния свидетельствует о постоянстве или изменении факторов, влияющих на качество. По требованиям Российского стандарта "Рускорд" для сбора, про- цессинга, хранения и выдачи пуповинной кро- ви ежегодно оценивается минимум три единицы МНФ, находящиеся на хранении. Качество крио- хранения можно оценить только после разморозки образцов. За период с 2009г разморожено 769 об- разцов ГСК пуповинной крови. Из них успешно, с жизнеспособностью >80%, 751 образец.

КК ЦКТ

В настоящее время в банке хранится >2 тыс. КК пупочного канатика и >8 тыс. образцов пупо- винной крови, включая образцы персонального и общественного хранения. Коллекцию КК ранних пассажей составляют культуры МСК, полученные из периваскулярного пространства вены пупочного канатика, жировой ткани, костного мозга, печени, тканей ротовой полости, эндометрия, плаценты, хориона, лёгкого; фибробласты кожи, клетки эн- дотелия сосудов (в т.ч. HUVEC). Имеются образ- цы МСК и опухолевых клеток пациентов с множе- ственной миеломой. В коллекции также депони- рованы генетически тестированные образцы МСК пациентов с рецессивной множественной эпифи- зарной дистрофией. Перечень паспортизованных культур представлен в электронном каталоге¹² куль- тур ранних пассажей ЦКТ.

Основой коллекции ЦКТ являются МСК из источников, ставших классическими — пупочного канатика, жировой ткани и костного мозга (рису- нок 3). Клетки из этих источников обладают оди- наковой морфологией, иммунофенотипом, но раз- ным дифференцировочным потенциалом, разными характеристиками эпигенома, протеома, метаболо- ма. Их различия обусловлены влиянием локальной ниши [6, 7] и сохраняются в культуре.

МСК пупочного канатика. МСК пупочного ка- натика получают по запатентованной технологии из периваскулярного пространства пупочной ве-

¹² Каталог культур ранних пассажей ЦКТ "Покровский": <https://pokrovcell.ru/centr-kletochnyh-tehnologiy/priobresti-kletochnye-linii/katalog-kultur-ranni-passazhey/>.

ны¹³. Эта методика позволяет обработать ферментами только область, окружающую вену, минимально затронув вартонов студень и наружную ткань, что позволяет получить более однородную популяцию МСК, а также снизить риск бактериальной и грибковой контаминации, а также контаминации материнскими клетками. Несмотря на то, что этот метод разработан для получения однородной популяции МСК после двух циклов ферментации, с его помощью можно получить культуру HUVEC и после первого (краткого) цикла.

В банке хранится >2 тыс. образцов МСК пупочного канатика персонального хранения. Количество паспортизованных культур в разделе общественного хранения поддерживается на уровне 35–50 КК — вместо использованных образцов коллекция постоянно пополняется новыми.

МСК жировой ткани. Образцы жировой ткани, депонированные в ЦКТ, получены преимущественно в ходе оперативных вмешательств. В исследовательских целях в ЦКТ создана коллекция МСК жировой ткани от доноров с клиническими проявлениями рецессивной множественной эпифизарной дисплазии/диастрофической дисплазии. Множественная эпифизарная дисплазия IV типа (OMIM 226900) — наследственное системное заболевание скелета. Генетически обусловленная неполноценность суставного хряща приводит к раннему разрушению суставов — происходит их деформация. Наиболее нагруженные — тазобедренные, коленные, а также позвоночник — поражаются сильнее всего. Диастрофическая дисплазия (OMIM 222600) — одна из разновидностей скелетных дисплазий, которая также характеризуется нарушением формирования некоторых типов хрящевой ткани и связанным с этим затруднённым образованием эндохондральной кости. Симптомы заболевания выявляются сразу при рождении или в рамках пренатальной диагностики и заключаются в уменьшенной длине тела новорожденного и низкорослости в дальнейшем, в ограничении движения суставов, сколиозе и других пороках развития. Причиной развития заболевания является мутация в гене *SLC26A2* в гомозиготном или компаунд-гетерозиготном состоянии. Этот ген кодирует белок, отвечающий за транспортировку сульфат-ионов через мембрану. Описано несколько мутаций в данном гене, приводящих к развитию заболевания. Не исключено, что по мере внедрения методов генетического обследования пациентов количество известных мутаций будет увеличиваться.

В банке хранятся 13 КК от таких пациентов: 5 культур от пациентов с диагнозом диастрофическая дисплазия и 8 культур от пациентов с диагнозом множественная эпифизарная дисплазия. Представленные образцы содержат разные мутации гена *SLC26A2* в гомозиготном состоянии. От трёх пациентов — двух с эпифизарной, одного с диастрофической дисплазией — также удалось получить культуры хондроцитов и МСК жировой ткани.

В коллекции представлены и культуры МСК жировой ткани от доноров без диагностированных на момент забора материала заболеваний.

МСК костного мозга. МСК костного мозга являются одними из ключевых компонентов ниши ГСК. Особый интерес эти клетки представляют в связи с их ролью в развитии гематологических заболеваний и в формировании опухолевой гемopoэтической ниши. В банке имеется 32 культуры МСК костного мозга от пациентов с диагнозом множественная миелома. Множественная миелома — злокачественная плазмоклеточная опухоль, продуцирующая моноклональные иммуноглобулины, которые внедряются в прилежащую костную ткань и разрушают ее. МСК костного мозга, полученные у доноров с таким диагнозом, могут оказаться полезными в исследовании влияния опухолевых клеток на МСК.

Стволовые клетки (СК) ротовой полости. Ценной частью банка культур ЦКТ являются клетки, полученные из тканей ротовой полости. Эту коллекцию начали создавать с 2016г. Всего к настоящему моменту удалось получить 79 донорских культур из 43 зубов. Главным достижением стало получение парных КК из различных отделов одного и того же зуба. С помощью методики отдельной обработки периодонта и пульпы при получении клеток из зуба с закрытыми корневыми каналами удалось выделить 18 пар СК пульпа/периодонт. От ряда доноров удалось получить по три популяции клеток от каждого в разных комбинациях: СК пульпы, периодонта и десны; СК пульпы, периодонта и фолликула; СК пульпы, периодонта и апикальных папилл. У двоих доноров удалось выделить по 4 культуры у каждого: у одного — из пульпы, периодонта, десны и апикальных папилл, у другого — из пульпы, периодонта, фолликула и десны. От одного из доноров, помимо пары СК пульпы/периодонта, удалось получить клетки нёба. Изучение таких КК, выделенных одновременно от одного и того же донора, может оказаться полезным при исследовании вариативности свойств и между популяциями клеток из разных тканей, и между отдельными донорами [7].

Фибробласты кожи. Способность фибробластов секретировать компоненты внеклеточного матрикса соединительных тканей и поддерживать таким образом их целостность обуславливает интерес исследователей к этим клеткам с позиций регене-

¹³ Патент РФ № 2620981С2, 18.11.2015. Багаева В.В., Айзенштадт А.А., Александрова Л.В., Енукашвили Н.И., Адылов Ш.Ф., Золина Т.Л., Урусова М.Е. Способ получения культуры мезенхимных стволовых клеток человека из периваскулярного пространства вены пупочного канатика. Изобретения. Полезные модели № 16–2017, 28.05.2017–10.06.2017. Бюл. № 16.

ративной медицины [8]. Фибробласты стимулируют процессы регенерации тканей: в организме они играют ключевую роль в заживлении ран. ЦКТ ПБСК принимает участие в разработке клеточно-содержащих раневых покрытий на гелевой основе с 2009г [9]. Разработанные покрытия с успехом применяются в НИИ им. И. И. Джанелидзе почти 10 лет [10]. В ЦКТ создана коллекция фибробластов кожи в числе 19 культур.

HUVEC. HUVEC используются в фундаментальных и прикладных исследованиях как доступная модель эндотелиальных клеток. Последние являются одними из основных компонентов кровеносных сосудов. В ходе развития организма новые сосуды формируются путём васкулогенеза, а затем ангиогенеза. Помимо ведущей роли в ангиогенезе, гемостазе и регуляции сосудистого тонуса клетки эндотелия являются существенным и активным компонентом иммунных реакций [11]. Дисфункция кровеносных сосудов и нарушение регуляции образования новых кровеносных сосудов связаны с возникновением и прогрессированием многих заболеваний, включая рак, ишемическую болезнь сердца, воспаление и иммунные расстройства, поэтому клетки эндотелия могут быть терапевтической мишенью в лечении этих заболеваний, а HUVEC — удобной моделью при разработке новых терапевтических подходов. Примечательной их особенностью является также способность претерпевать эндотелиально-мезенхимный переход — процесс, в ходе которого HUVEC трансформируются в мезенхимные, приобретая таким образом высокую подвижность и способность к миграции [12]. Такое поведение у клеток наблюдается при ангиогенезе и воспалительных реакциях. HUVEC в связи со своими свойствами широко используются в качестве донорских клеток в тканевой инженерии, васкуляризации органоидов и разработке микрососудистых моделей *in vitro*. HUVEC являются бесценным инструментом для моделирования заболеваний и скрининга лекарств в фундаментальных исследованиях [13].

Коллекция HUVEC ЦКТ, полученных из пупочной вены, состоит из 12 паспортизованных культур ранних пассажей. Получаемые клетки методом проточной цитометрии исследуют на присутствие специфичного для HUVEC маркера — CD31+, а также оценивают способность поглощать липопротеины низкой плотности (Dil-Ac-LDL-тест).

Перспективы развития

Созданная система биобанкирования позволила ЦКТ "Покровский" стать членом ассоциации "Рускорд". "Рускорд" — это ассоциация специалистов и организаций в области заготовки, хранения, применения клеток пуповинной крови и клеточных технологий, которая зарегистрирована и работает с 2019г. Совместно с членами ассоциации ЦКТ

"Покровский" ведет работу по применению ГСК пуповинной крови. Собрана доклиническая база и разработан протокол клинического исследования: "Изучение безопасности и эффективности метода трансфузии аллогенных гемопоэтических клеток пуповинной крови пациентам с детским церебральным параличом". Результаты исследования будут включены в клинические рекомендации по применению ГСК пуповинной крови.

ЦКТ "Покровский" также занимается разработкой лекарственных препаратов на основе клеточных технологий. Некоторые из них находятся на завершающей стадии доклинических исследований и подготовки нормативной документации для составления заявки на получение разрешения на проведение клинических исследований. Планируется продолжать работу по созданию базового депозитария РКТКК вместе с Институтом цитологии, Институтом биологии развития и Институтом цитологии и генетики Сибирского отделения РАН. Продолжается сотрудничество с Северо-Западным государственным университетом им. И. И. Мечникова — ЦКТ является методической базой НИЛ клеточных технологий университета.

Суммируя описанный выше опыт сотрудничества, можно сказать, что в настоящий момент существуют возможности совместной работы коммерческого ЦКТ с государственными биобанками, коллекциями и научно-исследовательскими учреждениями.

Заключение

В настоящее время создание биобанков КК, в отличие от других биоресурсных коллекций, сталкивается с рядом сложностей, связанных с недостаточной нормативно-правовой базой: не до конца проработан статус таких коллекций, требования к сырью и получаемым культурам. Следует отметить, что в последнее время наметился существенный прогресс в этом направлении, однако отсутствие системы контроля и единых стандартов биобанкирования КК, затрудняет развитие биобанков. В настоящее время основные биобанки страны объединяются для создания единых правил и стандартов, для разработки единой системы контроля качества. Созданная в ЦКТ система контроля качества позволяет гарантировать получение надёжно охарактеризованных КК, в т.ч. первичных и ранних пассажей, соответствующих критериям, отраженным в действующих нормативных документах. Многие из разработанных в ЦКТ подходов планируется использовать в работе базового депозитария РКТКК.

Отношения и деятельность: все авторы заявляют об отсутствии потенциального конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

Литература/References

1. Laue J, Ambühl J, Surbek D. Hybrid umbilical cord blood banking: literature review. Arch Gynecol Obstet. 2024;309(1):93-104. doi:10.1007/s00404-023-07003-x.
2. Snapes E, Simeon-Dubach B. ISBER Best Practices for Repositories, Moving Toward the Fifth Edition. Biopreserv Biobank. 2022;20(1):107-8. doi:10.1089/bio.2022.29102.ejs.
3. Kosobokova EN, Malchenkova AA, Kalinina NA, et al. Using short tandem repeat profiling to validate cell lines in biobanks. Cardiovascular Therapy and Prevention. 2022;21(11):3386. (In Russ.) Кособокова Е. Н., Мальченкова А. А., Калинина Н. А. и др. Использование метода профилирования на основе коротких tandemных повторов для подтверждения подлинности клеточных линий в биобанках. Кардиоваскулярная терапия и профилактика. 2022;21(11):3386. doi:10.15829/1728-8800-2022-3386.
4. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. Cytotherapy. 2006;8(4):315-7. doi:10.1080/14653240600855905.
5. Ivolgin DA, Smolyaninov AB, Bagautdinov ShM, et al. Modern cryopreservation methods for umbilical cord blood stem cells in the public registry of donors. Journal of International Academy of Refrigeration. 2012;1:36-9. (In Russ.) Иволгин Д. А., Смолянинов А. Б., Багаутдинов Ш. М. и др. Современные способы криоконсервации стволовых клеток пуповинной крови для общественного регистра доноров. Вестник Международной академии холода. 2012;1:36-9. EDN OWQHUF.
6. Lobov A, Kuchur P, Khizhina A, et al. Mesenchymal Cells Retain the Specificity of Embryonal Origin During Osteogenic Differentiation. Stem Cells. 2024;42(1):76-89. doi:10.1093/stmcls/sxad081.
7. Kotova AV, Lobov AA, Dombrovskaya JA, et al. Comparative Analysis of Dental Pulp and Periodontal Stem Cells: Differences in Morphology, Functionality, Osteogenic Differentiation and Proteome. Biomedicines. 2021;9(11):1606. doi:10.3390/biomedicines9111606.
8. Foster DS, Jones RE, Ransom RC, et al. The evolving relationship of wound healing and tumor stroma. JCI Insight. 2018;3(18):e99911. doi:10.1172/jci.insight.99911.
9. Smolyaninov AB, Khrupina AS, Yurkevich YuV, et al. Use of hydroxyethylcellulose polymer as a carrier for allogeneic fibroblasts in thermal burns treatment. Herald of North-Western State Medical University named after I. I. Mechnikov. 2013;5(4):7-12. (In Russ.) Смолянинов А. Б., Хрупина А. С., Юркевич Ю. В. и др. Использование полимера гидроксизтилцеллюлозы в качестве носителя для аллогенных фибробластов при лечении последствий термических ожогов. Вестник Северо-Западного государственного медицинского университета им. И. И. Мечникова. 2013;5(4):7-12. EDN RWBUXB.
10. Vagner DO, Zinoviev EV, Krylov KM, et al. Experience in the clinical use of allogeneic fibroblasts in patients with severe burns. Herald of North-Western State Medical University named after I. I. Mechnikov. 2018;10(3):65-72. (In Russ.) Вагнер Д. О., Зиновьев Е. В., Крылов К. М. и др. Опыт клинического применения аллогенных фибробластов у пострадавших с обширными ожогами кожи. Вестник Северо-Западного государственного медицинского университета им. И. И. Мечникова. 2018;10(3):65-72. doi:10.17816/mechnikov201810365-72.
11. Sturtzel C. Endothelial Cells. Adv Exp Med Biol. 2017;1003:71-91. doi:10.1007/978-3-319-57613-8_4.
12. Alvandi Z, Bischoff J. Endothelial-Mesenchymal Transition in Cardiovascular Disease. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2021;41(9):2357-69. doi:10.1161/ATVBAHA.121.313788.
13. Deng D, Zhang Y, Tang B, Zhang Z. Sources and applications of endothelial seed cells: a review. Stem Cell Res Ther. 2024;15(1):175. doi:10.1186/s13287-024-03773-6.