

С. И. Кривенко

ОПЫТ ОРГАНИЗАЦИИ И ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ БАНКА СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК

ГУ «МНПЦ хирургии, трансплантологии и гематологии»

Представлены сведения об основных этапах организации и функционирования банка стволовых клеток в ГУ «МНПЦ хирургии, трансплантологии и гематологии». Приведены данные об основных нормативно-правовых документах, регулирующих порядок производства и контроля качества биомедицинских клеточных продуктов, формирующих фонд банка стволовых клеток. Отражены преимущества использованных инновационных технологий получения клеточных продуктов, что обеспечило успешное решение проблемы доступности клеточной терапии как метода оказания медицинской помощи.

Ключевые слова: банк стволовых клеток, биомедицинский клеточный продукт, мезенхимальные стволовые клетки, пуповинная-плацентарная кровь.

S. I. Krivenko

EXPERIENCE OF ORGANIZATION AND FUNCTIONING OF A STEM CELL BANK

Information about the main stages of the organization and functioning of the stem cell bank in the state institution «MNPC surgery, transplantation and hematology» is presented. Data on the main legal documents regulating the production and quality control of biomedical cell products that form the foundation of the stem cell bank are provided. The advantages of the used innovative technologies for obtaining cell products are reflected, which provided a successful solution to the problem of accessibility of cell therapy as a method of providing medical care.

Key words: stem cell Bank, biomedical cell product, mesenchymal stem cells, umbilical-placental blood.

Лечение хронических неинфекционных и наследственных заболеваний является приоритетной задачей для системы здравоохранения, поскольку именно эти патологии обеспечивают в XXI веке основной вклад в структуру смертности и затрат на здравоохранение во всем мире. Благодаря развитию фармакотерапии и высокотехнологичной медицинской помощи достигнуты значительные успехи в лечении этих заболеваний и продлении жизни пациентов. Однако существующие традиционные методы лечения не способны восстанавливать структуру тканей и органов, измененную заболеванием, и обеспечивать коррекцию нарушений функции органов и систем. Решением этих задач занимается регенеративная медицина, одним из важнейших направлений которой создание биомедицинских продуктов, содержащих живые клетки человека.

Терапевтический потенциал биомедицинских клеточных продуктов (БМКП), основыва-

ется на известных свойствах стволовых и/или плюрипотентных клеток и определяется несколькими факторами:

- возможностью получения аутологических клеточных продуктов из клеток/тканей пациента;
- возможностью дифференцировки стволовых и прогениторных клеток в заданном направлении;
- возможностью наращивания клеток в культурах *in vitro* и их заданной модификации;
- возможностью использования аллогенных клеточных продуктов.

Последнее десятилетие в мире наблюдается активный рост исследований и производств в области биомедицинских клеточных продуктов, проводится большое число клинических исследований с использованием стволовых клеток. Всего на начало июня 2020 года в мире зарегистрированы 36 163 клинических исследования в области клеточной тера-

пии, в том числе: 9120 – в Европе, 19 365 – в США, 4942 – в Китае (www.clinicaltrials.gov). По результатам завершенных исследований некоторые клеточные продукты различных производителей получили рекомендации национальных разрешительных органов для широкого клинического применения. Наиболее перспективным и активно исследуемым клеточным продуктом являются мезенхимальные стволовые клетки (МСК), которые являются предшественниками целого ряда тканей человека и имеют широкий спектр возможного применения в регенеративной медицине. Универсальным источником получения МСК является костный мозг. Однако, кроме костного мозга, эти клетки присутствуют и во многих других тканях организма, в том числе и в жировой ткани [13]. МСК жировой ткани по своим характеристикам не имеют существенных отличий от МСК костного мозга [10], что позволяет рассматривать ЖТ в качестве альтернативного источника этих клеток [9].

Терапевтический эффект МСК обусловлен их способностью как воздействовать с помощью секретируемых веществ на клетки реципиента, так дифференцироваться в остеогенном, адипогенном и хондрогенном направлениях. Процесс дифференцировки может контролироваться в лабораторных условиях, что позволяет получить материал для клеточной терапии с заданными свойствами.

В мировой медицинской практике накоплен определенный опыт успешного применения МСК в комплексной терапии различных заболеваний (рассеянный склероз, постинсультные состояния, сахарный диабет 1 и 2 типа, печеночная недостаточность, повреждения хрящей и связочного аппарата, болезни пародонта, эпилепсия, детский церебральный паралич). Кроме того, МСК, благодаря их способности стимулировать процессы васкуляризации тканей и подавлять воспалительные процессы, эффективны для восстановления целостности кожных покровов при ожоговых травмах, келоидных и гипертрофических рубцах, трофических язвах и ишемии нижних конечностей. Особый интерес представляет способность МСК стабилизировать

работу иммунной системы и возможность соответствующего применения МСК в комплексной терапии иммунопатологических состояний, таких как «реакция трансплантат против хозяина», острое и хроническое отторжение при трансплантации органов, рассеянный склероз.

Одним из серьезных ограничений клеточной терапии является невозможность получения БМКП достаточной клеточности на основе аутологичного материала пациента либо аллогенного донорского материала в короткие сроки, так как минимальный срок культивирования МСК при производстве терапевтически эффективного БМКП составляет не менее 10–14 дней.

Оптимальным решением данной проблемы, предложенным специалистами МНПЦ хирургии, трансплантологии и гематологии (МНПЦ ХТ и Г) стало получение биологического материала в ходе операции мультиорганного забора, что является принципиально новым подходом к получению клеточного продукта МСК и не имеет аналогов в мировой практике. Преимущество такого подхода заключается в возможности получения большого объема ткани (костный мозг и/или жировая ткань различной анатомической локализации) от одного донора, что позволяет в короткие сроки произвести БМКП большой клеточности. В течение года бригадой мультиорганного забора МНПЦ ХТ и Г производится около 150 процедур изъятия органов для трансплантации, что позволяет обеспечить получение достаточного количества БМКП МСК для терапии. Кроме того, получаемый аллогенный клеточный продукт не является персонифицированным и может быть использован по медицинским показаниям для терапии любого пациента. При проведении операции мультиорганного забора, в ходе которой получается биоматериал для производства БМКП МСК, строго соблюдается принцип временной приоритетности изъятия органов.

На начальном этапе организации производства и хранения БМКП МСК для формирования фонда банка клеточной терапии в качестве источника МСК рассматривалась

жировая ткань из трех анатомических зон: параумбиликальная и паранефральная жировая клетчатка, а также большой сальник (париетальная брюшина с «жировыми островками»). В ходе проведения сравнительного анализа качества МСК из жировой ткани вышеперечисленных анатомических локализаций, было установлено, что для клеток, полученных из большого сальника, на стадии P2-P3 культивирования происходит значительное снижение их пролиферативной активности, сопровождающееся удлинением срока пребывания клеток в культуре. На этом основании большой сальник как потенциальный источник для получения МСК с целью формирования фонда банка был исключен. МСК из паранефральной и параумбиликальной зон обладают достаточно высокой пролиферативной активностью (даже на стадии P3), а также морфологически и иммунофенотипически соответствуют критериям, предъявляемым к МСК для терапевтических целей [5].

С целью стандартизации этапов производства БМКП МСК была разработана технологическая инструкция, а также технические условия, содержащие основные требования к качеству клеточного продукта (таблица 1).

Биомедицинский клеточный продукт «Клетки мезенхимальные ТУ ВУ 100660677.001-2014» (регистрационное удостоверение Министерства здравоохранения Республики Беларусь № БМКП-7.103083 от 31.07.2015) производства МНПЦ ХТ и Г был одним из первых клеточных продуктов, разрешенных к медицинскому применению в Республике Беларусь. БМКП МСК производится в виде клеточной

взвеси в 0,9% растворе натрия хлорида. Индивидуальной упаковкой такого клеточного продукта является стерильный пластмассовый шприц или стеклянный флакон вместимостью 20 мл. Клеточный продукт не нуждается в дополнительной обработке и полностью готов для применения в клинике. На каждый БМКП МСК при выдаче оформляется паспорт, подтверждающий соответствие показателям качества ТУ.

Отличительной особенностью БМКП МСК производства МНПЦ ХТ и Г является исключение из всех этапов производства клеточного продукта компонентов животного происхождения, и, в первую очередь, эмбриональной телячьей сыворотки. В качестве альтернативы эмбриональной сыворотке выбран лизированный концентрат тромбоцитов, содержащий 7 фундаментальных факторов роста, активно секретируемых тромбоцитами (PDGF- $\alpha\alpha$ (platelet derived growth factor), - $\beta\beta$, - $\alpha\beta$, TGF- β 1 (transforming growth factor) и - β 2, VEGF (vascular endothelial growth factor), EGF (epidermal growth factor)) и являющихся митогенами для МСК. Использование тромболизата в качестве добавки к культуральной среде позволяет сократить сроки культивирования МСК в 1,6–2,4 раза по сравнению с применением ЭТС без изменения иммунофенотипических характеристик клеток [6]. С целью повышения качества БМКП МСК специалистами центра был разработан и зарегистрирован «Концентрат тромбоцитов лизированный ТУ ВУ 100660677.002-2014 (регистрационное удостоверение № ИМ-7.101630), используемый в качестве компонента пита-

Таблица 1. Показатели качества БМКП МСК (по ТУ ВУ 100660677.001-2014)

№ п/п	Наименование критериев	Характеристика и норма
1	Содержание МСК (клеток в 1 единице БМКП)	Не менее 20 × 10 ⁶
2	Имунофенотипическая характеристика	CD 90+, CD 105+, CD 13+, CD 44+, CD 73+, CD 54+, CD 29+, CD 9+, CD 34-, CD 45-, HLA-DR-
3	Пассаж, продолжительность культивирования	P1- P3, но не более 40 дней культивирования
4	Испытание на стерильность	Стерильно
5	Проверка на инфекционные агенты (гепатит В, С, ВИЧ/СПИД, сифилис, цитомегаловирус)	Отсутствуют
6	Жизнеспособность МСК	Не менее 95 % перед криоконсервированием, не менее 80 % после размораживания

тельной среды в процессе культивирования клеток.

Фонд банка клеточной терапии постоянно имеет неснижаемый запас не менее 60 БМКП МСК, полученных из жировой ткани умерших доноров в процессе операции мультиоргано-забора. Клеточность БМКП МСК ЖТ составляет $(39,8; 328,24) \times 10^6$ с медианным значением $95,35 \times 10^6$ клеток ($n = 10^3$). Эффективная доза клеток для терапии пациента определяется клиническими протоколами и инструкциями по применению методов лечения соответствующих заболеваний. БМКП МСК используются:

- совместно с трансплантацией гемопоэтических стволовых клеток при лечении различной гематологической и не гематологической патологии, требующей пересадки костного мозга, а также в качестве дополнительной терапии при развитии острой и хронической реакции трансплантат против хозяина [2, 11];
- в терапии фармакорезистентных форм рассеянного склероза [7];
- для терапии острого и хронического отторжения у пациентов после трансплантации печени или почек, а также для снижения доз иммуносупрессантов в раннем послеоперационном периоде у пациентов после ортотопической трансплантации печени или почек [3, 4];
- для лечения инфаркта мозга и черепно-мозговой травмы [12].

Другим важным направлением деятельности банка стволовых клеток МНПЦ ХТ и Г является заготовка и долгосрочное хранение пуповинной крови (ПК), которая является богатым источником гемопоэтических стволовых клеток (ГСК). Содержание ранних и коммитированных клеток-предшественников в ПК выше, чем в периферической крови взрослых даже после ее мобилизации факторами роста. По количеству гранулоцитарно-макрофагальных колониеобразующих единиц и их пролиферативному потенциалу ПК значительно превосходит мобилизованную периферическую кровь взрослых.

Существует целый ряд преимуществ использования ПК в качестве источника ГСК

для трансплантаций перед применением других источников кроветворных клеток [8]:

- отсутствие риска здоровью донора (матери и ребенка);
- возможность использования не полностью совместимых по антигенам HLA-системы трансплантатов в большей части случаев, что особенно актуально для некоторых этнических меньшинств;
- повышение вероятности подбора редких HLA-фенотипов трансплантатов за счет увеличения базы доступных HLA-фенотипов;
- меньшие затраты времени и средств на поиск трансплантата с необходимым HLA-фенотипом;
- значительное снижение риска передачи некоторых латентных инфекций, распространяющихся трансмиссивным путем;
- возможность страхования жизни в форме хранения собственных клеток ПК в криобанке в качестве потенциального аутологичного трансплантата.

Единственным принципиальным недостатком ПК по сравнению с КМ является ограниченное количество гемопоэтических клеток, получаемых от одного донора [1]. Согласно существующим данным, объем ПК варьирует от 40 до 200 мл. Если для КМ допустимой считается потеря до 40–50% клеточной массы в процессе сепарации, криоконсервирования, размораживания и тестирования, то для ПК такие потери клеток неприемлемы, так как они повышают вероятность несостоятельности трансплантата.

Для организации заготовки и долгосрочного хранения пуповинной крови были разработаны и утверждены инструкции по применению новых методов «Заготовка пуповинной крови с целью получения гемопоэтических стволовых клеток» (регистрационный № 151-1203 от 29.11.2004 г.) и «Получение, криоконсервирование, хранение и контроль качества гемопоэтических стволовых клеток пуповинной крови» (регистрационный № 151-1203 от 29.11.2004 г.), а также получено регистрационное удостоверение на изделие «Концентрат крови пуповинной-плацентарной»

ТУ ВУ 190572781.008-2005. В 2010 г. на базе лаборатории сепарации и замораживания костного мозга «УЗ 9-я ГКБ» г. Минска (сейчас – МНПЦ ХТ и Г) была организована заготовка ПК для персонального хранения клеток граждан Республики Беларусь (на платной основе). К настоящему времени заготовлено и помещено на долгосрочное хранение около 2500 образцов ПК, соответствующих требованиям ТУ ВУ 190572781.008-2005 (таблица 2).

Таблица 2. Показатели и методы контроля качества концентрата крови пуповинной-плацентарной (по ТУ ВУ 190572781.008-2005)

Наименование показателя	Характеристика и норма
Общее содержание ядросодержащих клеток, клетка, не менее	1,85 × 10 ⁸
Общее содержание CD34+ клеток, клетка, не менее	0,24 × 10 ⁶
Бактериальный рост	Отсутствует
Наличие инфекционных агентов и антител к ним: Anti-HIV-1 и -2; HIV1-Ag; Anti-HTLV-1 и -2; Anti-HBcor-Ag; HBS-Ag; Anti-HCV; Anti-CMV; Anti-Toxoplasma gondii; RW; Staphilococci; Streptococci; Enterococci; Neisseria gonorrhoeae; Candida species; Aspergillus species; Esherihia coli	Отсутствуют

Заготовка ПК осуществляется персоналом учреждений родовспоможения г. Минска и регионов. Учитывая малые объемы крови, которые можно собрать из плаценты (в среднем, не более 100 мл), важно получить максимальное количество крови из пупочной вены, а также снизить риск бактериальной контаминации. Процедура сбора осуществляется после рождения ребенка и отделения его от последа, а также при кесаревом сечении.

Выделение фракции ядросодержащих клеток, содержащей гемопоэтические стволовые клетки, и их криоконсервирование должно быть выполнено в течение 24 ч с момента заготовки ПК. Оптимальная температура краткосрочного хранения клеток, при которой их жизнеспособность принципиально не снижается, составляет +18–23 °С.

В банке стволовых клеток МНПЦ ХТ и Г используются два метода выделения стволовых клеток из пуповинной крови: ручной метод седиментации с использованием 6% гидроксипроцеллюлозы и автоматический на сепараторе Sepax (Biosafe, Швейцария). Автоматический метод используется с 2014 года и является международно признанным стандартом выделения стволовых клеток из ПК. Преимуществами автоматического метода выделения стволовых клеток являются максимальный выход стволовых клеток, отсутствие влияния человеческого фактора и снижение риска попадания в пуповинную кровь микробных агентов. Соотношение использования методов выделения клеток в работе банка стволовых клеток МНПЦ ХТ и Г составляет 67 % ручной и 33 % автоматический метод.

До этапа криоконсервирования выполняется контроль качества выделенной фракции клеток пуповинной крови в соответствии с требованиями ТУ ВУ 190572781.008-2005. Оценивается жизнеспособность клеток в стандартном тесте с трипановым синим, а также методом проточной цитометрии определяется количество CD34+ клеток. Посев образцов клеток на бактериальные инфекции проводится дважды: до начала процессинга ПК и после процедуры выделения фракции ядросодержащих клеток непосредственно перед криоконсервацией. Параллельно образцы тестируются методом ИФА анализа на наличие следующих инфекционных агентов и антител к ним: CMV Ig R; Anti-HBcor; HBSAg Qual; Anti-HCV; Syphilis; HIV Ag/Ab; Anti-Toxoplasma Ig G. Наличие антител к цитомегаловирусу, токсоплазме, а также Anti-HBcor (если обследование на HBSAg при этом отрицательно) не является противопоказанием к хранению образцов. Проведение контроля на наличие инфекционных агентов гарантирует биобезопасность находящегося на хранении в банке стволовых клеток биоматериала и является одним из важнейших этапов в функционировании банка стволовых клеток.

Таким образом, в МНПЦ ХТ и Г разработана нормативно-правовая база и организо-

вана работа крупнейшего в Республике Беларусь банка стволовых клеток, деятельность которого включает получение и персонифицированное хранение пуповинной-плацентарной крови и неперсонифицированное хранение БМКП МСК для терапевтических целей. Действующая система контроля на всех этапах получения клеточных продуктов гарантирует их высокое качество и биобезопасность. Предложенный инновационный подход к заготовке биоматериала для производства БМКП МСК в ходе операций мультиорганного забора и создание резервного запаса клеточного продукта, хранящегося в банке, обеспечило успешное решение проблемы доступности клеточной терапии как метода оказания медицинской помощи для всех пациентов при наличии соответствующих медицинских показаний.

Литература

1. Абдулкадыров, К. М. Плацентарная кровь: альтернативный источник кроветворных стволовых клеток для трансплантаций. Создание банков пуповинной крови / К. М. Абдулкадыров, Н. А. Романенко // Терапевтический архив. – 2001. – № 7. – С. 76–78.
2. Бузук, Е. С. Первичная оценка эффективности совместной трансплантации гемопоэтических клеток и мезенхимальных стволовых клеток жировой ткани при лечении онкогематологических заболеваний / Е. С. Бузук [и др.] // АрсМедика. – 2012. – № 13 (68) октябрь. – С. 105–109.
3. Коротков, С. В. Возможность индукции иммуносупрессии аллогенными мезенхимальными стволовыми клетками при трансплантации почки / С. В. Коротков [и др.] // Вестник Международного Казахско-Турецкого университета им. Х. А. Ясави. – Хабаршысы. – 2016. – № 4 (102). – С. 198–202.
4. Коротков, С. В. Использование мезенхимальных стволовых клеток при трансплантации печени у пациентов с острым почечным повреждением / С. В. Коротков [и др.] // Материалы IV Российского национального конгресса «Трансплантация и донор-

ство органов», 7–9 октября 2019 г., Москва, Россия. – М., 2019. – С. 153.

5. Кривенко, С. И. Сравнительная характеристика пролиферативной активности клеток из жировой ткани различной анатомической локализации / С. И. Кривенко [и др.] // Материалы VII съезда гематологов и трансфузиологов Республики Беларусь «Актуальные проблемы гематологии и трансфузиологии». Сб. Научных трудов к 80-летию гематологической и трансфузиологической служб Республики Беларусь; под ред. Г. Я. Хулупа. – 2012. – С. 61–64.

6. Кривенко, С. И. Эффективность применения лизата тромбоцитов в качестве ростового фактора мезенхимальных стволовых клеток / С. И. Кривенко [и др.] // Медицинские новости. – 2014. – № 4. – С. 48–50.

7. Федулов, А. С. Клеточная терапия рассеянного склероза / А. С. Федулов [и др.]. – Минск: НиктаграфиксПлюс, 2018. – 244 с.

8. David, T. H. Collection, processing, and banking of umbilical cord blood stem cells for clinical use in transplantation and regenerative medicine / T. H. David // Labmedicine. – 2008. – Vol. 39 – P. 43–48.

9. Frank, P. B. Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization / P. B. Frank, J. M. Murphy // Int. J. Biochemistry and Cell Biology. – 2003. – Vol. 22 – P. 569–581.

10. Kern, S. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue / S Kern [et al.] // Stem Cells. – 2006. – Vol. 24 – P. 1294–1301.

11. Minakovskaya, N. Influence of co-transplanted mesenchymal stem cell upon immunological recovery after allogeneic hematopoietic cell transplantation in children / N. Minakovskaya [et al.] // CTT Journal. – 2016. – Vol. 5, № 1. – P. 61–63.

12. Shanko, Y. Somatotopic principle of perineural implantation of stem cell in patients with brain injuries / Y. Shanko [et al.] // Journal of Neurology. – 2018. – Vol. 8 (5). – P. 259–261.

13. Zuk, P. A. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies / P. A. Zuk [et al.] // Tissue Eng. – 2001. – Vol. 7 – P. 211–228.

Поступила 08.06.2020 г.