

Центры клеточных и генных технологий и современные банки стволовых клеток: криогенные предприятия, соответствующие GMP-стандартам

Д-р мед. наук А.Б. СМОЛЯНИНОВ, А.Н. ГРОМЫКО

Центр клеточной и генной терапии, Покровский банк стволовых клеток, «КриоЦентр Санкт-Петербург»,
д-р мед. наук Е.В. ЖАРОВ, канд. мед. наук Д.А. КИРИЛЛОВ

Институт восстановительной медицины, Москва,
канд. тех. наук Ш.М. БАГАУТДИНОВ

Военно-медицинская академия, Санкт-Петербург

*It is very important to develop GMP-standard stem cell banks in Russia,
because of frequent popularity of different diseases and absence of registers
of bone marrow and cord blood stem cells. Practical experience of work of
centers of cell and gene therapy, stem cell banks have to take into account
developing of technological base for new cell technologies in clinical practice.*

Развитие криогенных технологий и достижения клеточной криобиологии последних десятилетий позволяют сегодня развивать принципиально новые направления в клеточной терапии ранее неизлечимых, а порой смертельных заболеваний [1, 5]. В апреле 2006 г. в Чикаго (штат Иллинойс, США) состоялся международный конгресс «БИО-2006». В работе конгресса особая роль придавалась развитию центров клеточной и генной терапии, банкам стволовых клеток (БСК), криогенным предприятиям, соответствующим GMP- стандартам. Во время работы конгресса было отмечено, что 2006 – 2026 гг. пройдут под девизом развития клеточных и генных технологий, а значит, очень бурно будет развиваться криогенная технология и техника, понадобится большое число инженеров по криогенной технике [2].

Стволовые клетки являются предшественниками всех 250 видов клеток организма человека [1]. Их уникальность заключается в способности самоподдержания и дифференцирования в высокоспециализированные клетки. Так, гемопоэтические стволовые клетки являются родоначальниками всех элементов крови и большинства клеток иммунной системы [3]. Подтверждена ключевая роль мезенхимных стволовых клеток в регенерации тканей сердца, печени, мозга и нервных стволов, костей, хряща и мышц [2, 3].

Сегодня клиническое применение стволовых клеток на лицензионной основе ограничено гематологической и онкологической практикой. Только в гематологии насчитывается более 30 заболеваний, при которых единственным шансом больного на выживание является трансплантация стволовых клеток. Сейчас в экономически развитых странах мира самым активным образом проводятся клинические испытания по клеточной терапии почти во всех отраслях практической медицины. Россия в этом смысле не является исключением. Не

вызывает сомнений, что в ближайшее время будут выработаны протоколы (стандарты) для широкого клинического применения стволовых клеток в кардиологии, гепатологии, неврологии и нейрохирургии, диабетологии и других клинических дисциплинах [2, 4, 8].

Сегодня наиболее приемлемыми источниками стволовых клеток являются костный мозг, периферическая кровь после мобилизации стволовых клеток костного мозга гранулоцитарным колониестимулирующим фактором, пуповинная кровь, жировая ткань.

Костный мозг – традиционный источник стволовых клеток – более 30 лет используется гематологами для терапии больных злокачественными заболеваниями системы крови [3, 6]. За эти годы накоплен колоссальный практический опыт выделения, хранения и клинического применения гемопоэтических и стромальных стволовых клеток. На основании этого опыта сформированы международные протоколы (стандарты) использования стволовых клеток костного мозга в терапии заболеваний [1,7].

В силу ряда причин особым уникальным источником стволовых клеток является кровь пуповины и плаценты. Во-первых, стволовые клетки пуповинной крови обладают самым высоким биологическим потенциалом и соответственно самым высоким клиническим потенциалом. Во-вторых, эти клетки в силу своей «молодости» и «иммунной наивности» менее иммуноагgressивны. Это делает круг лиц, которым может быть успешно проведена трансплантация, более широким, нежели в случае с костным мозгом. На сегодняшний день количество хранимых образцов пуповинной крови составляет более 400 000 единиц. На основании этого материала проведено более 5000 трансплантаций гематологическим больным. Более 90% из них были успешны. Это очень хороший результат, за которым стоят спасенные жизни взрослых и детей. В последнее время звучит мнение о

рассмотрении пуповинной крови как альтернативы костному мозгу. Мы не считаем эту точку зрения корректной. Эти два источника стволовых клеток не заменяют, а дополняют друг друга [6].

Успехи исследований в сфере клеточной терапии потребовали решения технологических проблем получения и хранения стволовых клеток с сохранением их жизнеспособности и функциональной активности. Развитие криогенных технологий в 80 – 90-е годы позволило начать создание специализированных биотехнологических предприятий – БСК, решаяющих перечисленные задачи на высокотехнологичном уровне [4].

Центры клеточной и генной терапии, как и БСК, строятся с учетом стандартов чистых помещений [2, 6, 7]. Эпоха, когда клеточные и генные технологии развивались на уровне научной лаборатории института или университета, закончилась. Сейчас это крупные предприятия с криогенными хранилищами, соответствующие стандартам GMP и GTP.

Современный БСК, соответствующий GMP-стандарту (далее БСК с GMP-стандартом), решает следующие задачи:

- ✓ получение постнатального биологического материала, содержащего стволовые клетки;
- ✓ выделение и характеристика стволовых клеток;
- ✓ культивирование стволовых клеток;
- ✓ подготовка и длительное криогенное хранение образцов стволовых клеток;
- ✓ выдача образцов для клинического применения.

Создание таких БСК в экономически развитых странах мира ведется последние 15 лет [6], их работа, ее актуальность и целесообразность понятны обществу. Существует два типа БСК с GMP-стандартом, работающих на различных принципах:

- ✓ «банки-регистры», деятельность которых финансируется государством и продуктом деятельности которых распоряжается государство в рамках национальных реестров стволовых клеток;
- ✓ «именные банки», в которых все расходы по заготовке и хранению стволовых клеток конкретного человека (в том числе и новорожденного) оплачивает семья этого человека, и распоряжается образцами только эта семья.

Технологическая работа обоих типов БСК с GMP-стандартом выглядит абсолютно аналогичной.

В России практика создания БСК с GMP-стандартом насчитывает более 4 лет. Деятельность их в России подчинена приказу МЗ РФ № 325 от 25 июля 2003 г. «О развитии клеточных технологий в Российской Федерации», который регламентирует ключевые этапы работы по заготовке пуповинной крови, выделению из нее стволовых клеток и их длительное хранение.

Рассмотрим работу этих учреждений на примере ведущего в нашей стране БСК с GMP-стандартом «КриоЦентр» (Москва) на территории Северо-Западного региона РФ (выбор «КриоЦентра» неслучайен – этот БСК с GMP-стандартом соответствует лучшим банкам Европы).

Этап I. Получение постнатального материала – пуповинной крови и ее транспортировка в лаборатории БСК с GMP-стандартом.

Получение пуповинной крови не является технически сложной процедурой и не несет никакой опасности для жизни и здоровья матери и ребенка. Специалисты БСК с GMP-стандартом или обученный медицинский персонал производят забор крови в максимально возможном количестве при минимальном инфицировании материала.

После получения пуповинной крови в Санкт-Петербурге или любом другом городе Северо-Западного региона образец в термоконтейнере курьерской службой доставляется в лаборатории БСК с GMP-стандартом «КриоЦентр» в течение 12 – 24 ч без предварительного замораживания.

Этап II. Выделение и характеристика стволовых клеток.

Все манипуляции с постнатальным материалом и стволовыми клетками проводятся в «чистых» помещениях, соответствующих правилам GMP и GTP. Воздух в лаборатории подвергается особой очистке и кондиционированию. Так, в зоне непосредственных манипуляций с клетками (зона А) количество колониеобразующих единиц (КОЕ) в 1 м³ воздуха не должно превышать 2 – 3. Давление в лабораториях избыточно, что создает ламинарные потоки воздуха в наружном направлении и исключает приток извне.

Из цельной крови методом сепарирования выделяют стволовые клетки, концентрируют их и помещают в аутологичную плазму с добавлением криопротектора. Выделение концентрата стволовых клеток из цельной крови является ключевым моментом. Весь полученный материал в равных объемах размещают в пробирках, которые маркируют и запаивают в защитные пеналы. С основными пробирками помещают пробирки-спутники для последующего контроля за хранением образца или дополнительных исследований.

Параллельно проводятся исследования по изучению общего числа стволовых клеток, их фенотипированию, оценке жизнеспособности клеток и их инфицированности.

Этап III. Подготовка и длительное криогенное хранение образцов стволовых клеток.

Подготовка к хранению состоит в предварительном замораживании концентрата стволовых клеток. С помощью программного замораживателя с выполнением протокола температурного режима образец замораживается до –70 °C. Это позволяет максимально сохранить жизнеспособность клеток. Далее образец помещается в контейнер с жидким азотом в карантинном хранилище.

После получения негативных результатов бактериологических и вирусологических исследований образец из карантинного хранилища переводится в основное для постоянного хранения.

Все этапы работы БСК с GMP-стандартом «КриоЖентр» контролируются компьютерной программой «Freezerwork» для исключения ошибки с участием человеческого фактора.

Основное хранилище БСК с GMP-стандартом «КриоЖентр» представляет собой помещение-сейф, стены которого выдерживают пожар в течение 5 ч. Лабораторо-

рии и хранилища БСК с GMP-стандартом обеспечены автономными источниками электроснабжения, круглосуточной физической и электронной охраной.

Высокое качество услуг по заготовке и хранению стволовых клеток пуповинной крови в «КриоЦентре» объясняется рядом причин как организационного, так и технологического характера.

✓ Отлаженная работа сотрудников банка и четкий контроль на всех этапах планирования, заготовки, транспортировки пуповинной крови, выделения и хранения стволовых клеток.

✓ Поэтапная ответственность БСК с GMP-стандартом от начала и до конца технологического процесса организации, заготовки и транспортировки материала, выделения и хранения стволовых клеток.

✓ Наличие собственных лабораторий и хранилищ, соответствующих стандартам GMP и GTP.

✓ Современные сертифицированные клеточные технологии.

✓ Страхование образца во время транспортировки и хранения.

Развитие БСК с GMP-стандартом в России крайне актуально на фоне большой распространенности онкологических и гематологических заболеваний в нашей стране и отсутствия регистров костного мозга и пуповинной крови. БСК с GMP-стандартом «КриоЦентр» может служить показательным образцом банка пуповинной крови. Практический опыт этого учреждения необходимо учитывать в развитии технологической базы для новых клеточных технологий в клинической практике в России.

Развитие БСК с GMP-стандартом в нашей стране в последние годы обнадеживает. Строительство новых БСК с GMP-стандартом дает надежду детям, больным лейкемией. Работа банков стволовых клеток должна подчиняться жестким стандартам и правилам международного образца. Это немыслимо без современных надежных криогенных технологий. Позитивное движение в этой сфере в России должно послужить толчком для отечественной промышленности в развитии криогенных технологий и криотехники.

Список литературы

1. Смолянинов А.Б., Жаров Е.В., Козлов К.Л. Кириллов Д.А. Основы клеточной и генной терапии сердечно-сосудистых заболеваний. – М., 2005.
2. Смолянинов А.Б. Современные биотехнологические центры клеточных и генных технологий и банки стволовых клеток // Технология чистоты. 2006. № 1.
3. Gluckman E., Broxmeyer H.A., Auerbach A.D. et al. Hematopoietic reconstitution in patient with Fanconi's anemia by means of umbilical-cord blood from an HLA-identical sibling // N. Engl. J. Med. – 1989, Vol.321.
4. Oh W., Cairo M.S., Desposito F. et al. Cord blood banking for potential future transplantation: subject review // Pediatrics. 1999. Vol.104, № 1.
5. Stamm C., Westphal B., Kleine H.D. et al. Autologous bone-marrow stem-cell transplantation for myocardial regeneration // Lancet. 2003, Vol.361, № 9351.
6. Steinbrook R. The cord-blood-bank controversies // N. Engl. J. Med. – 2004, Vol.351, № 22.
7. Sugarman J., Kaalund V., Kodish E. et al. Ethical issues in umbilical cord blood banking // JAMA. – 1997, Vol.278.
8. Yoon P.D., Kao R.L., Magovern G.J. Myocardial regeneration: transplanting satellite cells into damaged myocardium // Tex Heart Inst. J. – 1995, Vol. 22.