

иммунокомплексного патологического процесса [20]. Подтверждением продолжающегося иммунопатологического процесса служило нарушение функции трансплантата у пациентов 3-й группы, что проявлялось в значительном увеличении содержания билирубина и ферментов печени.

При монокомпонентной терапии циклоспорином А наблюдали побочные эффекты, проявляющиеся АГ, нефропатией; при применении такролимуса у больных отмечалась тенденция к гипергликемии, однако эти данные по группам иммуносупрессии были недостоверны. Монотерапия СNI не приводила к увеличению частоты острых и хронических кризов отторжения.

Представленные результаты клинических, биохимических и иммунологических исследований пациентов, получавших монотерапию СNI после ОТП, подтвердили эффективность и достаточность монокомпонентной иммуносупрессии кальциневриновыми препаратами у этой категории пациентов. Результаты обследования больных 3-й группы выявляют у них зависимость проводимой иммуносупрессивной терапии от этиологического фактора развития цирроза печени, что может служить основанием для дифференцированного подхода к снижению проводимой иммуносупрессивной терапии в отдаленные сроки после ОТП.

## Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Starzl T.E., Murase N., Abu-Elmagd K. et al. Tolerogenic immunosuppression for organ transplantation. *Lancet* 2003;361:1502—10.
2. Starzl T.E., Demetris A.J. *Liver Transplantation*. Chicago, IL; 1990.
3. Reding R. Steroid withdrawal in liver transplantation: benefits, risks and unanswered questions. *Transplantation* 2000;70:405—10.
4. Kasiske B.L., Chakkerla H.A., Louis T.A., Ma J.Z. A meta-analysis of immunosuppression withdrawal trials in renal transplantation. *J Am Soc Nephrol*. 2000;11:1910—7.
5. Lerut J. Avoiding steroids in solid organ transplantation. *Transpl Int* 2003;16:213—24.
6. Lerut J., Mathys J., Verbaandert C. et al. Tacrolimus monotherapy in liver transplantation one-year results of a prospective, randomized, double-blind, placebo. *Ann Surg* 2008;248:956—67.
7. Sherlock S., Dooley J. *Diseases of the liver and biliary system*. 11. Oxford: Blackwell Science Ltd; 2002.
8. Vilatoba M., Contreras J.L., Eckhoff D.E. New immunosuppressive strategies in liver transplantation: balancing efficacy and toxicity. *Current Opin Organ Transplant* 2003;8:139—45.
9. Wiesner R.H., Demetris A.J., Belle S.H. et al. Acute hepatic allograft rejection: incidence, risk factors, and impact on outcome. *Hepatology* 1998;28:638—45.
10. Neuberger J., Adams D.H. What is the significance of acute liver allograft rejection? *J Hepatol* 1998;29:143—50.
11. Lowes J.R., Hubscher S.G., Neuberger J.M. Chronic rejection of the liver allograft. *Gastroenterol Clin North Am* 1993;22:401—20.
12. Ojo A.O., Held P.J., Port F.K. et al. Chronic renal failure after transplantation of a nonrenal organ. *N Engl J Med* 2003;349: 931—40.
13. Kahan B.D. The limitations of calcineurin and mTOR inhibitors: new directions for immunosuppressive strategies. *Transplant Proc* 2002;34:130—3.
14. The U.S. Multicenter FK506 Liver Study Group. A comparison of tacrolimus (FK 506) and cyclosporine for immunosuppression in liver transplantation. *N Engl J Med* 1994;331:1110—5.
15. Neuhaus P., Langrehr J.M., Williams R. et al. Tacrolimus-based immunosuppression after liver transplantation: a randomised study comparing dual versus triple low-dose oral regimens. *Transplant Int* 1997;10:253—61.
16. Ekberg H. Tailoring minimal immunosuppression long term. *Transplant Proc* 2003;35:755—7.
17. Schreuder T.C., Hübscher S.G., Neuberger J. Autoimmune liver diseases and recurrence after orthotopic liver transplantation: what have we learned so far? *Transpl Int* 2009;22(2):144—52.
18. Duclos-Vallée J.C. Recurrence of autoimmune hepatitis, primary biliary cirrhosis and primary sclerosing cholangitis after liver transplantation. *Acta Gastroenterol Belg* 2005;68 (3):331—6.
19. Washburn K., Speeg K.V., Esterl R. et al. Steroid elimination 24 hours after liver transplantation using daclizumab, tacrolimus, and mycophenolate mofetil. *Transplantation* 2001;72(10):1675—9.
20. Nancy Agmon-Levin MD1, Bat-sheva Porat Katz MD2 and Yehuda Shoenfeld MD FRCP1. Infection and primary biliary cirrhosis. *IMAJ* 2008;10:112—5.

## Требования, предъявляемые к линиям диплоидных аллогенных клеток, предназначенных для регенеративной медицины

О.И. Конюшко, В.Б. Хватов, С.В. Смирнов, В.С. Бочарова

*НИИ скорой помощи им. Н.В. Склифосовского, Москва*

Requirements for diploid allogenic cell lines used for regenerative medicine

*O.I. Konyushko, B.V. Khvatov, S.V. Smirnov, V.S. Bocharova  
N.V. Sklifosovsky Research Institute of Emergency Care, Moscow*

*Cell transplantation becomes a mode of correcting the functional failure of organs and tissues in injury and a number of diseases. The paper considers the issues concerning the biological safety of therapy with differential cells: in vitro cultured fibroblasts. The Russian line M-22 derived from the skin and muscle of diploid human embryonic cells has persisted just for more than 40 years and successfully used to treat patients with severe burns.*

**Key words:** stem cell transplantation, biological safety, diploid cell line.

Конец XX в. ознаменовался рядом крупнейших достижений молекулярной и клеточной биологии, создавших основу для становления клеточных технологий, выделившихся в самостоятельное направление — регенеративную медицину [1]. Метод клеточной трансплантации рассматривается как способ коррекции функциональной несостоятельности органов и тканей при травме и ряде заболеваний. Такие повсеместно используемые медицинские манипуляции, как переливание крови и ее форменных элементов, а также трансплантация костного мозга, бесспорно, относятся к методам клеточной терапии. В настоящее время заместительная клеточная терапия представляется самостоятельным клиническим направлением, основанным на введении в организм пациента живых аутологичных, аллогенных и ксеногенных клеток для направленного терапевтического воздействия на организм с целью восстановления или замены утраченной функции органа или ткани [2]. Стремительное развитие методов и совершенствование технологий длительного культивирования диплоидных клеток млекопитающих послужили основой для реализации теоретических представлений об использовании искусственно размноженных клеток с терапевтическими целями.

Восстановление поврежденных тканей происходит за счет стволовых клеток. Показана высокая эффективность трансплантации мезенхимальных стволовых клеток костного мозга в клинической практике [3, 4]. Для стимуляции заживления ран дифференцированные клетки используют локально [2, 5]. Однако в нашей стране отсутствует законодательная база применения стволовых клеток, что существенно ограничивает их широкое клиническое использование. Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) предлагает странам самостоятельно формировать собственную законодательную базу по этой проблеме. В 2009 г., после широкого обсуждения, опубликовано «Руководство для передачи в клинику стволовых клеток» (Guidelines for the clinical transplantation of stem cell research), представляющее мнение группы экспертов Международного общества стволовых клеток (ISSCR) из 13 стран. Согласно основным рекомендациям необходимы проведение независимого научного и этического контроля на каждом этапе изучения клеточных материалов, индивидуальной экспертизы особенностей стволовых клеток, оценки возможных рисков в результате применения клеточных продуктов с измененными функциями, проведение *in vitro* и *in vivo* доклинических исследований, клинических исследований, тщательный мониторинг и обеспечение своевременной информацией о результатах исследований. Проведение доклинических испытаний необходимо для доказательства безопасности клеточного материала и постоянства терапевтического действия. Клинические испытания должны проводиться с тем же самым клеточным материалом и по тому же направлению исследований, что и доклинические. Проведение клинических испытаний возможно только при добровольном информированном согласии пациента.

Определенная регламентация деятельности в области клеточных технологий закреплена в законах РФ «Об охране здоровья населения Российской Федерации», «О трансплантации органов и тканей человека», во «Временной инструкции о порядке исследований в области клеточных технологий и их использования в учреждениях здравоохранения» от 18.04.2002 г., в Приказе МЗ РФ № 325 от 25.07.2003 г. «О развитии клеточных технологий в Россий-

ской Федерации». Федеральная служба по надзору в сфере здравоохранения и социального развития принимает к регистрации только технологии применения клеточного материала для лечения конкретных заболеваний, но не проводит сертификацию конкретных клеточных линий, предлагаемых для клинического применения.

Настоящее сообщение посвящено анализу и предложениям по системному контролю обеспечения безопасности клинического применения линий диплоидных аллогенных фибробластов.

К линиям диплоидных клеток (ЛДК) отнесены клеточные линии с морфологически однородной популяцией клеток (стабилизированной в процессе культивирования *in vitro*), имеющие ограниченный срок жизни с тремя фазами развития (становление, активный рост и старение), сохраняющие в процессе пассирования кариотип, свойственный исходной ткани, свободные от контаминантов и не обладающие опухолевой активностью при трансплантации иммунодепрессированным животным [6].

Изначально эти клеточные системы создавались для обеспечения производства медицинских вакцин, требовавшего большого количества стандартного и безопасного субстрата для размножения вакцинных штаммов вирусов. Разрабатывалась и постоянно совершенствовалась система контроля безопасности ЛДК, подробно изложенная в документах ВОЗ [7]. В РФ существует регламент, определяющий требования к качеству клеточного материала, предназначенного для использования в производстве медицинских иммунобиологических препаратов — МИБП, и после необходимых дополнений он может быть принят как система контроля и аттестации линий диплоидных аллогенных фибробластов, которые могут применяться в клинике [8].

Приготовление клеточного материала для медицинского использования — сложный, многоступенчатый процесс, включающий в себя ряд манипуляций: выделение, сортировку, культивирование, консервирование и подготовку к трансплантации, которые в разной степени оказывают влияние на биологические свойства клеток [1, 9, 10]. Требования к условиям подготовки клеточных препаратов в целом должны соответствовать стандартам GMP (Good Manufacturing Practice) — системе норм, правил и указаний в отношении производства, позволяющей гарантировать получение стандартного и безопасного клеточного материала при работе с любыми типами клеток. Стандарт GMP отражает целостный подход, регулирует и оценивает именно параметры производства и лабораторной проверки. Все работы, связанные с получением и применением клеток в клинике, должны выполняться только организациями, располагающими специализированными производственными помещениями, оснащенными современным оборудованием для выполнения работ по культивированию клеток и имеющими подготовленные квалифицированные кадры, т.е. способными обеспечить работу в соответствии со стандартами GMP.

В соответствии с Методическими указаниями аттестации перевиваемых клеточных линий — субстратов производства и контроля МИБП [11] — система аттестации включает контроль инфекционной безопасности доноров ткани, собственно ткани и клеточного материала, полученного из этой ткани, изучение культуральных, биологических и цитогенетических свойств линии клеток; контроль, касающийся внутривидовой и межвидовой контаминации клеток в целях ее исключения, и контроль онкогенности.

### Основные положения системы аттестации перевиваемых клеточных линий

**1. Контроль инфекционной безопасности** доноров ткани и клеточного материала — общее положение, касающееся всех типов клеток и тканей. Его необходимо проводить на всех этапах подготовки клеточного материала для выявления возможных контаминантов. Контроль инфекционной безопасности первичного клеточного материала следует начинать на этапе забора тканей, который должен выполняться в стерильных условиях. Инфекционная безопасность исходного материала — наиболее проработанная тема, отраженная в законодательстве РФ. Требования по обеспечению инфекционной безопасности суммированы коллективом авторов под руководством К.Н. Ярыгина [12, 13] и заключаются в следующем:

— биопсийный материал и сыворотка крови донора должны быть обследованы микробиологическими методами на бактерии и грибы, методами иммуноферментного анализа и полимеразной цепной реакции (ПЦР) на отсутствие ДНК- и РНК-содержащих вирусов, хламидий, токсо- и микоплазм, даже если в последующем предполагается использование клеток для самого донора (в связи с необходимостью обеспечить инфекционную безопасность банка) [14];

— культуры клеток подвергаются анализу методом ПЦР для выявления провирусной ДНК и вирусной РНК ВИЧ-1 и ВИЧ-2, РНК вируса гепатита С, ДНК вируса гепатита В, ДНК вирусов простого герпеса 1-го и 2-го типов, ДНК цитомегаловируса, ДНК вируса Эпштейна — Барр, ДНК микоплазмы, ДНК токсоплазмы [12, 13];

— при использовании абортного или послеродового материала необходимо проводить тестирование в целях выявления возбудителя урогенитальных инфекций, при использовании кожи — на наличие папилломавирусов 6-го и 11-го типов [13].

**2. Обследование ЛДК на онкогенность** проводят перитонеальным введением тестируемой клеточной суспензии иммунодепрессированным животным. Выявление ретровирусов, способных вызывать образование опухолей, проводят путем определения в клетках активности обратной транскриптазы [15, 16].

**3. Кариологический анализ культивируемых клеток.** В процессе культивирования *in vitro* возможно появление клеток с измененными генетическими характеристиками, способных к неограниченному размножению и образованию опухолей [10, 17, 18]. В связи с этим проводят кариотипирование клеток на каждом 10-м пассаже при изучении жизненного цикла диплоидной линии, анализируя по 1000 метафазных пластинок. Это тестирование приобретает особое значение при искусственном размножении аутологичных клеток *in vitro*. Форсированное размножение мезенхимальных клеток костного мозга приводит к появлению хромосомных аномалий уже на 6—10-м пассажах [3, 10]. В связи с этим кариологическое тестирование нелинейных клеток необходимо проводить перед их непосредственным применением в клинике. В отличие от клеток костного мозга линии диплоидных фибробластов обладают исключительно стабильным кариотипом в фазе активного роста. Накопление хромосомных аномалий наблюдается только в фазе старения. Поэтому проведение трудоемкого кариологического анализа клеточной линии и банков посевных и рабочих клеток оправдывается возможностью работать в течение многих лет с клетками, сохраняющими нормальный кариотип донора.

**4. Контроль видоспецифичности.** Для клеток, длительно культивируемых *in vitro*, возможна контаминация другими клетками. Для выявления межвидовой контаминации проводят определение электрофоретической подвижности в полиакриламидном геле изоэнзимов глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы и лактатдегидрогеназы. Межвидовая контаминация также может быть обнаружена при кариологическом анализе. Для первичных клеток проведение этих методов контроля не требуется. Для определения внутривидовой контаминации применяется HLA-генотипирование клеток. Такую индивидуальную идентификацию материала желательнее проводить и при обследовании первичного клеточного материала.

**5. Криоконсервирование клеточного материала** [5, 19]. Процедура криоконсервирования должна выполняться только с использованием программируемого замораживания. Программа замораживания подбирается для каждого типа клеток индивидуально на основе оценки их жизнеспособности после реконсервации. Протокол программного криозамораживания составляет неотъемлемую часть паспорта клеточного материала, используемого в клинике. Для успешного криоконсервирования необходим подбор криопротектора, состава криозащитной среды, концентрации клеточного материала, режимов замораживания (программируемое замораживание с обязательным протоколом проведения процедуры для архивного хранения) и реконсервации.

Особенностью ЛДК является возможность их длительного хранения (более 30 лет — срок наблюдения) в жидком азоте (при температуре  $-196^{\circ}\text{C}$ ). Однако для использования клеток в клинике после такого длительного хранения банк посевных клеток необходимо повторно проверить на онкогенность.

**6. Паспортизация клеточного материала** линии диплоидных фибробластов [8, 15, 16].

По результатам проведенных исследований свойств клеточного материала и его безопасности составляется паспорт — документ, отражающий его качество и биологическую безопасность. Для линий диплоидных фибробластов предложена стандартная форма паспорта [8].

В дополнение к этому паспорту для ЛДК, применяемых в клинике, определение HLA-фенотипа клеток позволило бы выявить возможную внутривидовую контаминацию клеток и четко контролировать использование клеточного материала.

В клинике перед использованием с клетками проводят ряд манипуляций, в результате которых получают клеточный продукт, пригодный для трансплантации. Его характеристики также должны быть отражены в паспорте клеточного продукта. Предложенный паспорт клеточных продуктов мезенхимального происхождения [12], в частности мезенхимальных клеток из пуповины человека, включает следующие данные: название и происхождение клеток; маркировка образца; сведения о доноре; количество живых клеток; внешний вид (цвет, консистенция), стерильность, величина pH, концентрация клеток и объем образца; время выдачи, срок годности, условия хранения; результаты тестирования образца на отсутствие инфекционных агентов, общих для всех типов клеток и специфических для данного типа.

**7. Создание и аттестация банка клеток** [16, 19]. Повседневные потребности клиники могут быть обеспечены только клеточным банком, содержащим стандартный, всесторонне обследованный клеточный материал, находящийся в условиях, способных обеспечить его длительное хранение без изменения свойств. Клеточные линии должны быть ли-

цензированы соответствующей национальной контролирующей организацией.

Для сохранения генетических характеристик коллекционных клеток необходимо строгое соблюдение режима криоконсервации, возможное лишь при автоматическом программном замораживании.

Банк линии клеток содержит запас однородного материала, полученного от одного донора. Для линий диплоидных фибробластов необходимо иметь аттестованные банки посевных и рабочих клеток. Посевной и рабочие банки ЛДК обязательно должны быть лицензированы ГНИИСК МИБП им. Л.А. Тарасевича. При аттестации банка клеток приводятся данные о количестве заложенных в нем единиц хранения (суммарное количество клеток).

Стандартная единица хранения — аликвота (криопробирка), содержащая одинаковое количество клеток.

Банк посевных ЛДК — одновременно замороженное максимальное, не менее 200, число криопробирок, содержащих одинаковое количество (6—8 млн) клеток ранних пассажей (с 12-го по 16-й). В дальнейшем при необходимости из каждой криопробирки банка посевных клеток может быть приготовлен один банк рабочих клеток.

Банк рабочих ЛДК состоит из аликвот клеточной суспензии. Для его приготовления используют клетки 20—25 пассажей, находящиеся в фазе активного роста.

В маркировке криопробирок указывают название линии, номер пассажа, количество клеток в криопробирке, дату замораживания.

Протоколы программируемого замораживания формируют архив криобанка.

#### **ЛДК кожи и мышц эмбриона человека М-22**

ЛДК кожи и мышц эмбриона человека М-22 была установлена более 40 лет назад. Она прошла все виды контроля на безопасность, рекомендуемые национальным и международным контрольными органами, и была лицензирована ГНИИСК МИБП им. Л.А. Тарасевича в качестве субстрата для производства любых видов медицинских вакцин. На уровне

9-го пассажа был заложен банк посевных клеток, который хранится в жидком азоте более 30 лет. Проведено изучение сохранения клетками морфологических, биологических, цитогенетических свойств и чувствительности к вирусам после длительного пребывания при сверхнизкой температуре. Показано, что при восстановлении клетки банка сохраняли высокую жизнеспособность, достигавшую 75±5%. При пассировании дважды в неделю с коэффициентом рассева 1:2 — 1:3 монослой формировался каждые 3—4 сут. Он состоял из фибробластоподобных клеток, образующих характерный рисунок в виде потоков.

Дополнительно к системе аттестации, применяемой для ЛДК — субстратов для производства МИБП, для линии М-22 было проведено HLA-генотипирование класса I и II методом PSR-SSP (HLA-A\*24,31; HLA-B\*35,40; HLA-Cw\*04,03; HLA-DRB1\*01,12; HLA-DRB3\*; HLA-DQB1\*05,03), дающее возможность ее индивидуальной идентификации.

Клетки были применены для лечения ожогов II—IIIa степени у 130 пациентов. При этом применяли биологические повязки с аллогенными фибробластами линии М-22 в активной фазе роста (12—20-й пассаж). Независимо от уровня пассажа клеток клинические результаты применения были равнозначными [17].

Таким образом, предлагаемая система аттестации ЛДК — субстратов для производства МИБП в основном может быть применена для аттестации линий диплоидных фибробластов, предназначенных для трансплантации.

Банк криоконсервированных стандартных ЛДК позволяет на протяжении длительного времени в любой момент располагать стандартными, биологически безопасными и доступными клетками, которые могут быть предоставлены в необходимом количестве по запросу клиники.

Применение клеточного материала для клинических целей надо вводить с разумной осторожностью для исключения возможных рисков. Это позволит приблизиться к формированию нормативной базы, регламентирующей клиническое применение клеточных культур, и практически расширить возможности клеточной терапии.

## Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Адамс Р. Методы культуры клеток для биохимиков. М., 1983.
2. Шевченко Ю.Л. Медико-биологические и физиологические основы клеточных технологий в сердечно-сосудистой хирургии. СПб., 2006.
3. Бочков Н.П. Клеточная терапия в свете доказательной медицины. Клинический журнал 2006;(10):4—10.
4. Шалунова Н.В., Петручук Е.Н., Бердникова З.Е. и др. Контроль культур клеток, пригодных для производства иммунобиологических препаратов. Тезисы Всероссийской научно-практ. конф. «Вакцинология 2008».
5. Белоус А.М., Гордиенко Е.А., Розанов Л.Ф. Замораживание и криопротекция. М., 1987.
6. Ярыгин К.Н. Роль резидентных и циркулирующих стволовых клеток в физиологической и репаративной регенерации. Патол физиол и экспер тер 2008;1:2—7.
7. WHO, Technical Report Series 1983;(658); 1987;(745); 1988;(747).
8. Колокольцова Т.Д., Шалунова Н.В., Петручук Е.М. К вопросу о контроле безопасности культур клеток, пригодных для заместительной терапии. Биопрепараты 2006;июнь:8—12.
9. Никольский Н.Е., Вахтин Ю.Б., Игнатова Т.Н. и др. Биология клетки в культуре. Л., 1984.
10. Бочков Н.П., Воронина Е.С., Косякова Н.В. и др. Хромосомная изменчивость мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток человека. Клеточн технол в биол и мед 2007;1:11—5.
11. Методические указания аттестации перевиваемых клеточных линий — субстратов производства и контроля медицинских иммунобиологических препаратов. РД 42-28-10—89.
12. Бурунова В.В., Суздальцева Ю.Г., Воронин А.В. и др. Разработка и внедрение производственных стандартов для клеточных продуктов мезенхимального происхождения. Клеточн технол в биол и мед 2008;2:97—101.
13. Бурунова В.В., Суздальцева Ю.Г., Чеглаков И.Б. и др. Сборник тезисов докладов Британско-российского совещания в сотрудничестве с Европейской комиссией «Стволовые клетки: законодательство, исследования и инновации. Международные перспективы сотрудничества». М., 2007. с. 8—9.
14. Кузьмина С.В. Малигнизация нормальных клеток в условия длительного культивирования in vitro. М., 1983.
15. Медицинская вирусология. Под ред. Д.К. Львова. М., 2007.
16. Hayflick L., Moorhead P. The serial cultivation of human diploid cells. Strains. Exp Cell Res 1961;25(3):285—621.
17. Ермолов А.С., Смирнов С.В., Хватов В.Б. и др. Применение биологически активных раневых покрытий, стимулирующих эпителизацию ожоговых ран IIIa степени. Клеточн технол в биол и мед 2008;3:166—70.
18. Green H. Cultured cells for the treatment of disease. Sci Am 1991;265(5):96—102.
19. Дьяконов Л.П., Ситьков В.И. Животная клетка в культуре. Методы и применение в биотехнологии. М., 2000.