ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО

ПО ТЕХНИЧЕСКОМУ РЕГУЛИРОВАНИЮ И МЕТРОЛОГИИ

НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ГОСТ Р ИСО 24651— 2024

Биотехнология

БИОБАНКИНГ

Требования к мезенхимальным стромальным клеткам человека, полученным из костного мозга

(ISO 24651:2022, IDT)

Издание официальное

Москва
Российский институт стандартизации
2024

gost.e-ecolog.ru

Предисловие

1 ПОДГОТОВЛЕН Федеральным государственным бюджетным учреждением «Российский институт стандартизации» (ФГБУ «Институт стандартизации») на основе собственного перевода на русский язык англоязычной версии стандарта, указанного в пункте 4

2 ВНЕСЕН Техническим комитетом по стандартизации ТК 326 «Биотехнологии»

3 УТВЕРЖДЕН И ВВЕДЕН В ДЕЙСТВИЕ Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 26 апреля 2024 г. № 552-ст

4 Настоящий стандарт идентичен международному стандарту ИСО 24651:2022 «Биотехнология. Биобанкинг. Требования к мезенхимальным стромальным клеткам человека, полученным из костного мозга» (ISO 24651:2022 «Biotechnology — Biobanking — Requirements for human mesenchymal stromal cells derived from bone marrow», IDT).

Международный стандарт разработан Техническим комитетом ИСО/ТК 276 «Биотехнология» Международной организации по стандартизации (ИСО).

При применении настоящего стандарта рекомендуется использовать вместо ссылочных международных стандартов соответствующие им национальные и межгосударственные стандарты, сведения о которых приведены в дополнительном приложении ДА

5 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

6 Некоторое элементы настоящего стандарта могут являться объектами патентных прав

*Правила применения настоящего стандарта установлены в статье 26 Федерального закона от 29 июня 2015 г. № 162-ФЗ «О стандартизации в Российской Федерации». Информация об изменениях к настоящему стандарту публикуется в ежегодном (по состоянию на 1 января текущего года) информационном указателе «Национальные стандарты», а официальный текст изменений и поправок — в ежемесячном информационном указателе «Национальные стандарты». В случае пересмотра (замены) или отмены настоящего стандарта соответствующее уведомление будет опубликовано в ближайшем выпуске ежемесячного информационного указателя «Национальные стандарты». Соответствующая информация, уведомление и тексты размещаются также в информационной системе общего пользования — на официальном сайте Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии в сети Интернет (*gost.e-ecolog.ru

© ISO, 2022
© Оформление. ФГБУ «Институт стандартизации», 2024

Настоящий стандарт не может быть полностью или частично воспроизведен, тиражирован и распространен в качестве официального издания без разрешения Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии

Содержание

1 Область применения 1
2 Нормативные ссылки 1
3 Термины и определения 1
4 Сокращения 4
5 Общие требования 6
6 Отбор проб костного мозга и связанных с ними данных 7
7 Транспортирование проб костного мозга или МСК-КМ человека и связанных с ними данных в биобанк 8
8 Получение и прослеживаемость костного мозга или МСК-КМ человека и связанных с ними данных 8
9 Выделение и размножение МСК-КМ человека 9
10 Характеристика МСК-КМ человека 10
11 Контроль качества 16
12 Хранение 16
13 Размораживание 17
14 Утилизация 18
15 Распространение МСК-КМ человека. Информация для пользователей 18
16 Транспортирование МСК-КМ человека 18
Приложение А (справочное) Получение мононуклеарных клеток костного мозга человека (МНК-КМ человека) 20
Приложение ДА (справочное) Сведения о соответствии ссылочных международных стандартов национальным стандартам 21
Библиография 22

Введение

Мезенхимальные стромальные клетки представляют собой гетерогенную популяцию клеток, характеризуемую множеством функциональных свойств, включая способность секретировать паракринные факторы, регулировать иммунные эффекторные клетки [8]—[11], поддерживать примитивные фенотипы других клеточных популяций [12], [13] и поддерживать регенерацию тканей [14], [15]. Мезенхимальные стромальные клетки могут содержать субпопуляцию стволовых клеток или клеток-предшественников, которые демонстрируют самообновление и дифференцировку *in vitro*, что было четко продемонстрировано для клеток-предшественников, полученных из костного мозга [16].

Мезенхимальные стромальные клетки и мезенхимальные стволовые клетки имеют одинаковое сокращение «МСК» [17]. В настоящем стандарте аббревиатура «МСК» относится к мезенхимальным стромальным клеткам.

Функциональное определение МСК эволюционировало с течением времени по мере того, как биология этих клеток становилась все более понятной. Несмотря на эти достижения, сохраняется существенная неопределенность в отношении номенклатуры, природы, идентичности, функционирования, способа выделения и работы с этими клетками в ходе исследований. МСК не могут быть полностью определены начальными минимальными критериями [18], предложенными Международным обществом клеточной и генной терапии [International Society of Cell and Gene Therapy (ISCT)], и требуют подробной характеристики с помощью матрицы функциональных анализов [19], [20].

МСК были выделены из костного мозга [12], [21]—[24], пуповины [25] и некоторых других тканей и широко используются для неклинических исследований. МСК из разных тканей организма имеют разные свойства. В разных учреждениях используют разные методы выделения, обработки и биобанкирования этих клеток, что осложняет сопоставление данных и результатов среди этих учреждений. Таким образом, возникла потребность в стандартизации подходов к выделению, обработке, размножению и криоконсервации МСК, полученных из конкретных источников ткани.

В настоящем стандарте представлены требования к биобанкированию мезенхимальных стромальных клеток человека, полученных из костного мозга (МСК-КМ человека) для целей исследования. Настоящий стандарт применим для академических центров, общественных и частных учреждений, выполняющих услуги по биобанкингу МСК-КМ человека для исследований и развития (R&D) и доклинической практики, а не для клинического применения.

Важно отметить, что настоящий стандарт посвящен МСК, которые были выделены, подвергнуты манипуляциям и/или размножены при культивировании в исследовательских целях.

ISBT 128 [26] представляет терминологию и аббревиатуры для всех медицинских изделий, включая клеточную терапию, и приводит сокращенное наименование «МСК(М)» для обозначения мезенхимальных стромальных клеток из костного мозга. В настоящем стандарте признается это сокращение, но используется более широко применяемое в научных исследованиях условное обозначение мезенхимальных стромальных клеток человека, полученных из костного мозга (МСК-КМ человека) [27].

НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

Биотехнология

БИОБАНКИНГ

Требования к мезенхимальным стромальным клеткам человека, полученным из костного мозга

Biotechnology. Biobanking. Requirements for human mesenchymal stromal cells derived from bone marrow

Дата введения — 2025—03—01

1 Область применения

Настоящий стандарт устанавливает требования к биобанкингу мезенхимальных стромальных клеток человека, выделенных из костного мозга (МСК-КМ человека), включая сбор костного мозга и связанных с ним данных, выделение, культивирование, характеристику, контроль качества, криоконсервацию, хранение, размораживание, утилизацию, распространение и транспортирование.

Настоящий стандарт применим ко всем организациям, выполняющим биобанкинг для МСК-КМ человека, используемых в научно-исследовательских целях.

Настоящий стандарт не распространяется на МСК-КМ человека для предполагаемого использования *in vivo* на людях, в том числе для клеточной терапии, тканевой инженерии и иного клинического или терапевтического применения.

Примечание — Международные, национальные и/или региональные регламенты/требования также могут применяться к конкретным положениям, рассматриваемым в настоящем стандарте.

2 Нормативные ссылки

В настоящем стандарте использованы нормативные ссылки на следующие стандарты [для датированных ссылок применяют только указанное издание ссылочного стандарта, для недатированных — последнее издание (включая все изменения)]:

ISO 8601-1, Date and time — Representations for information interchange — Part 1: Basic rules (Дата и время. Представление для обмена информацией. Часть 1. Основные правила)

ISO 20387:2018, Biotechnology — Biobanking — General requirements for biobanking (Биотехнология. Биобанкинг. Общие требования)

ISO 21709:2020, Biotechnology — Biobanking — Process and quality requirements for establishment, maintenance and characterization of mammalian cell lines (Биотехнология. Биобанкинг. Требования к организации, обслуживанию, определению характеристик и контролю качества клеточных линий млекопитающих)

3 Термины и определения

В настоящем стандарте применены термины по ИСО 20387:2018, ИСО 21709:2020, а также следующие термины с соответствующими определениями.

Издание официальное

Терминологические базы данных ИСО и МЭК доступны по следующим адресам:

- платформа онлайн-просмотра ИСО по адресу: gost.e-ecolog.ru ;
- Электропедия МЭК по адресу: gost.e-ecolog.ru .

3.1 **подлинность** (authenticity): Истинность и правдивость.

[ISO/TS 22859:2022, 3.1]

3.2 **биобанк** (biobank): Юридическое лицо или часть юридического лица, осуществляющие *биобанкинг* (3.3).

[ИСО 20387:2018, 3.5]

3.3 **биобанкинг** (biobanking): Процесс приобретения и хранения биологического материала, включая конкретные действия или все действия, связанные со сбором, подготовкой, консервацией, испытанием, анализом и передачей определенного биологического материала, а также соответствующих информации и данных.

[ИСО 20387:2018, 3.6]

3.4 **костный мозг;** *ткань костного мозга* (bone marrow; bone marrow tissue): Мягкая, похожая на губку ткань, находящаяся в середине большинства костей, производящая лейкоциты (белые кровяные тельца), эритроциты (красные кровяные тельца) и тромбоциты.

3.5 **культивирование клеток** (cell culture): Выращивание клеток, отделенных от исходной ткани путем спонтанной миграции, механического или ферментативного диспергирования для размножения в условиях *in vitro*.

[ISO/TS 22859:2022, 3.5]

3.6 **досье на клеточный образец** (cell master file): Полное досье всех процедур и записей, используемых для получения клеточного образца.

[ISO/TS 22859:2022, 3.6]

3.7 **морфология клетки** (cell morphology): Форма и структура клетки.

Примечание 1 — Морфология может быть представлена одним параметром или комбинацией двух или более параметров.

[ИСО 21709:2020, 3.3]

3.8 **чистота клеточной популяции** (cell population purity): Процент клеток определенного типа в популяции, обладающих одинаковыми специфическими биологическими характеристиками, такими как маркеры клеточной поверхности, генетические полиморфизмы и биологическая активность.

[ISO/TS 22859:2022, 3.8]

3.9 **колониеобразующая единица фибробластов;** КОЕ-Ф (colony forming unit fibroblast; CFU-F): Типичный анализ *in vitro* для демонстрации потенциала *самообновления* (3.22) клеток-предшественников, засеянных на чашки с низкой частотой, в результате чего образуется колония клеток, похожих на фибробласты.

Примечание 1 — Подсчет таких колоний является показательным для потенциала колониеобразования или способности к самообновлению этих клеток *in vitro*.

[ISO/TS 22859:2022, 3.9]

3.10 **криоконсервация** (cryopreservation): Хранение клеток и тканей в замороженном состоянии в условиях, когда их жизнеспособность сохраняется.

[ИСО 21709:2020/Amd 1:2021, 3.6]

3.11 **дифференцировка** (differentiation): Процесс приведения клеток в определенное состояние или направление развития.

[ISO/TS 22859:2022, 3.11]

3.12 **потенциал дифференцировки** (differentiation potential): Способность, относящаяся к концепции, что стволовые клетки и клетки-предшественники могут продуцировать дочерние клетки, которые способны в дальнейшем дифференцировать в другие типы клеток.

[ISO/TS 22859:2022, 3.12]

3.13 **проточная цитометрия** (flow cytometry): Методологически ориентированная поддисциплина аналитической цитологии, которая измеряет количество клеток, находящихся во взвешенном состоянии в жидком носителе, по мере их прохождения, обычно по одной клетке за раз, через измерительную станцию.

Примечание 1 — Это измерение представляет преобразование изменений в выходной мощности детектора (или детекторов) за счет изменения рассеяния света, поглощения света, испускания света (флуоресценция) клеткой или изменения электрического сопротивления по мере прохождения клеток через измерительную станцию.

Примечание 2 — Проточная цитометрия позволяет провести одновременную оценку морфологических характеристик клеток (размер и внутренняя сложность) и мембранных или внутриклеточных антигенов.

[CLSI H44-A2:2004, раздел 4, с изменениями — добавлено примечание 2]

3.14 **гетерогенность (клеток)** (heterogeneity <cells>): Неоднородность состава, качества или структуры популяции клеток.

[ISO/TS 22859:2022, 3.14]

3.15 **мезенхимальная стромальная клетка, полученная из костного мозга человека;** МСК-КМ человека (human mesenchymal stromal cell derived from bone marrow; hBM-MSC): Гетерогенная клеточная популяция, выделенная из *костного мозга* (3.4), которая способна модулировать иммунный ответ, секретировать паракринные факторы и проходить адипогенез, остеогенез и хондрогенез *in vitro*.

Примечание 1 — Без каких-либо манипуляций выражение «адаптированные к культивации МСК» является альтернативой термину, используемому для обозначения клеток, которые отличаются от клеток, обнаруженных *in vivo*. Становится все более очевидным, что эти типы клеток обладают другими свойствами с точки зрения экспрессии генов, функциональности и фенотипа.

3.16 **активация (мезенхимальных стромальных клеток)** (licensing <mesenchymal stromal cells>): Стимулирующее действие в отношении *МСК-КМ человека* (3.15) с использованием воспалительных цитокинов для усиления иммуносупрессии.

Примечание 1 — Термин «активация» в данном случае является биологическим термином, а не нормативным или законодательным.

[ISO/TS 22859:2022, 3.17, с изменениями — в определении «hUC-MSCs» заменено на «МСК-КМ человека»]

3.17 **пассаж;** *субкультивирование* (passage; subculture): Процесс дальнейшего культивирования клеток в новом сосуде с питательной средой для получения большей площади поверхности/объема роста клеток.

[ISO/TS 22859:2022, 3.18, с изменениями — в определении добавлено слово «новом». Примечание 1 удалено]

3.18 **число пассажей** (passage number): Количество проведенных пассажей.

Примечание 1 — В настоящем стандарте под P_0 понимается исходная популяция клеток.

[ИСО 21709:2020, 3.13, с изменениями — добавлено примечание 1]

3.19 **время удвоения популяции;** ВУП; *время удвоения* (population doubling time; PDT; doubling time): Время, необходимое для удвоения количества культивируемых клеток.

Примечание 1 — Время измеряют в часах.

[ИСО 21709:2020, 3.8, с изменениями — «время удвоения популяции» и «ВУП» добавлены как предпочтительный термин. Добавлено примечание 1]

3.20 **первичная культура** (primary culture): Культура, происходящая из клеток, тканей или органов, взятых непосредственно из организма, и предшествующая стадии ее субкультурирования, размножения и получения последовательных *пассажей* (3.17) *in vitro*.

[ИСО 21709:2020, 3.16, с изменениями — удалено примечание 1]

3.21 **пролиферация** (proliferation): Увеличение числа клеток за счет клеточного деления.

3.22 **самообновление** (self-renewal): Способность *стволовых клеток* (3.23) проводить деление симметрично, образуя две идентичные дочерние стволовые клетки.

Примечание 1 — Взрослые стволовые клетки также могут делиться асимметрично и образовывать одну дочернюю клетку, которая может необратимо перейти к дифференцированной клеточной линии и в конечном счете привести к специализированным функционально дифференцированным клеткам, тогда как другая дочерняя клетка сохраняет характеристики родительской стволовой клетки.

[ISO/TS 22859:2022, 3.23]

3.23 **стволовая клетка** (stem cell): Неспециализированные клетки, способные к *самообновлению* (3.22) и имеющие потенциал *дифференцировки* (3.12), а также способные дифференцироваться в один или несколько различных типов специализированных клеток.

Примечание 1 — Большинство взрослых стволовых клеток являются мультипотентными стволовыми клетками.

[ISO/TS 22859:2022, 3.24]

3.24 **жизнеспособность** (viability): Признак живого организма (например, метаболически активного, способного к воспроизводству, имеющего неповрежденную клеточную мембрану или обладающего способностью возобновлять эти функции), определенный на основе предполагаемого использования.

[ИСО 21709:2020, 3.17]

3.25 **жизнеспособные клетки** (viable cells): Клетки в пробе, обладающие признаком жизни (например, метаболически активны, способны к размножению, обладают неповрежденной клеточной мембраной или способны к возобновлению этих функций), определенным на основе предполагаемого использования.

[ИСО 20391-1:2018, 3.29]

4 Сокращения

ACAN — аггрекан;

AHR — рецептор ароматических углеводородов;

ALP — щелочная фосфатаза;

ANGPT2 — ангиопоэтин 2;

AP2 — адипатит протеин-2;

BCL-2 — B-клеточная лимфома 2;

CCL2 — лиганд 2 C-C мотива хемокина;

CCL7 — лиганд 7 C-C мотива хемокина;

CCR7 — C-C-рецептор хемокина 7;

CCR10 — рецептор хемокина 10;

CD — кластеры дифференцировки;

CEBPα — CCAAT/альфа-белок, связывающий энхансер;

CFSE — сукцинимидиловый эфир карбоксифлуоресцеина;

CIITA — трансактиватор основного комплекса гистосовместимости II класса;

CO_2 — диоксид углерода;

COL10 — коллаген типа X;

COL2A1 — коллаген типа 2A1;

COX-2 — циклооксигексаназа 2;

CX3CR1 — рецептор 1 хемокина CX3C;

CXCL9 — лиганд 9 C-X-C мотива хемокина;

CXCL10 — лиганд 10 C-X-C мотива хемокина;

CXCL11 — лиганд 11 C-X-C мотива хемокина;

CXCL12 — лиганд 12 C-X-C мотива хемокина;

CXCR1 — рецептор хемокина 1;

CXCR4 — рецептор хемокина 4;

CXCR6 — рецептор хемокина 6;

DMEM — модифицированная среда (Dulbecco's modified eagle medium);

GAL-1 — галектин-1;

HLA — антиген лейкоцита человека;

HLA-DR — антиген лейкоцита человека DR;

НО-1 — гемоксигеназа-1;

HSP70A — белок теплового шока 1;

HSP70B — белок теплового шока 70B;

ICAM-1 — молекула межклеточной адгезии 1;

IL-1RA — антагонист рецептора интерлейкина-1;

MTT — 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-2H-тетразолий бромид;

N — число собранных клеток;

N_0 — число высеянных клеток;

P_0 — исходная популяция клеток;

PBS — фосфатный забуференный физиологический раствор;

PDL-1 — лиганд-1 программируемой гибели клетки;

PPAR-γ — рецептор, активируемый пероксисомным пролифератором гамма;

R&D — научные исследования и развитие;

RUNX2 — транскрипционный фактор 2, связанный с карликовостью;

SOX9 — HMG бокс-9, связанный с SRY;

T — конечная точка инкубации, ч;

T_0 — начальная точка инкубации, ч;

TIMP-1 — тканевой ингибитор металлопротеиназ 1;

TIMP-2 — тканевой ингибитор металлопротеиназ 2;

TLR-4 — звоноподобный рецептор 4;

TSG-6 — белок, индуцируемый геном 6 фактора некроза опухоли;

ULBP-3 — UL16, связывающий белок 3;

VCAM-1 — васкулярная молекула клеточной адгезии 1;

БС — бледная спирохета;

ВГВ — вирус гепатита В;

ВГС — вирус гепатита С;

ВИЧ — вирус иммунодефицита человека;

ВУП — время удвоения популяции;

ИДО — индоламин 2,3-диоксигеназа 1;

ИЛ-6 — интерлейкин-6;

ИФН-γ — интерферон гамма;

КК — контроль качества;

КОЕ-Ф — колониеобразующая единица фибробластов;

ЛПЛ — липопротеинлипаза;

МСК — мезенхинальные стромальные клетки;

МСК-КМ человека — мезенхимальные стромальные клетки человека, полученные из костного мозга;

ОПН — остеопонтин;

ОЦН — остеокальцин;

ПЦР — полимеразная цепная реакция;

ТРФ-бета — трансформирующий ростовой фактор бета;

ФРГ — фактор роста гепатоцитов;

ФРК — фактор роста кератиноцитов;

ФРЭС — фактор роста эндотелия сосудов;

ЭДТА — этилендиаминтетрауксусная кислота;

ЭТС — эмбриональная телячья сыворотка.

5 Общие требования

5.1 Общие положения

Биобанк должен соблюдать требования ИСО 20387 и ИСО 21709 в дополнение к настоящему стандарту. В качестве дополнительной ссылки для внедрения ИСО 20387 допускается использовать ISO/TR 22758.

Биобанк обязан установить критерии и процедуры для выделения, культивирования, хранения, размораживания и транспортирования МСК-КМ человека.

Необходимо создать, задокументировать, внедрить, регулярно анализировать и обновлять процедуру анализа данных.

Биобанк должен использовать валидированные и/или верифицированные методы и процедуры для всей деятельности, относящейся к МСК-КМ человека, в соответствии с ИСО 20387:2018, 7.9.2 и 7.9.3, на всех стадиях жизненного цикла биологического материала (как определено в ИСО 20387:2018, 3.29).

Необходимо создать, задокументировать, внедрить, регулярно анализировать и обновлять процедуры, документы КК для процедур сбора, выделения, распространения, хранения, транспортирования, испытания и анализа данных в соответствии с характеристиками МСК-КМ человека.

Подлинность и свойства МСК-КМ человека подлежат мониторингу в течение всего процесса биобанкинга, от выделения до распространения.

5.2 Персонал, помещения и оборудование

Необходимо соблюдать требования ИСО 20387:2018, раздел 6, и ИСО 21709:2020, 4.3, 4.4, 4.7.

Персонал биобанка должен быть обучен надлежащим образом, в особенности размножению, характеристике, культивированию, криоконсервации, размораживанию и транспортированию МСК-КМ человека.

Операторы внешних организаций, предоставляющие услуги для МСК-КМ человека, обязаны продемонстрировать соответствующие профессиональные знания, опыт и навыки, а также регулярно проводить документированное обучение и оценку квалификации персонала.

Биобанк должен обеспечить, чтобы помещения и условия окружающей среды не оказывали негативного влияния на качество МСК-КМ человека или не аннулировали результаты анализов.

Следует разработать процедуры менеджмента оборудования, включая эксплуатацию оборудования и план технического обслуживания.

Биобанк должен контролировать рабочее оборудование и условия (например, температуру, влажность, чистоту) в соответствии с рассматриваемыми характеристиками МСК-КМ человека и потребностью в асептической обработке.

5.3 Реактивы, расходные материалы и другие принадлежности

Необходимо соблюдать требования ИСО 21709:2020, 4.5.

Биобанк должен разработать критерии приемлемости для материалов, включая реактивы и расходные материалы, необходимые для выделения, культивирования, хранения, размораживания и транспортирования МСК-КМ человека.

5.4 Управление информацией и данными

Необходимо соблюдать требования ИСО 20387:2018, 7.8.3 и 7.10.

Биобанк должен управлять и поддерживать данные, связанные с МСК-КМ человека, включая, помимо прочего, следующее:

a) техническую информацию: методы, используемые при выделении клеток, условия культивирования, данные о пассировании, включая число пассажей, характеристику и данные микробиологических анализов;

b) информацию о хранении и консервации;

c) данные по проверке безопасности.

Необходимо обеспечить определенные сроки и безопасность хранения данных, а также целостность хранимых данных.

Необходимо установить минимальный срок хранения записей для МСК-КМ человека. Специальные требования к условиям и срокам хранения допускается применять в будущих задачах. Персональ-

ные данные каждого донора-человека необходимо хранить в защищенном месте и управлять ими в соответствии с ИСО 20387:2018, 4.3.

Для обеспечения возможности просмотра данных и записей для конкретного применения необходимо хранить досье на клеточный образец.

6 Отбор проб костного мозга и связанных с ними данных

6.1 Информация о доноре костного мозга

Необходимо выполнить и документально подтвердить оценку риска.

Чтобы защитить персональные данные донора, биобанк должен разработать методы защиты данных донора в соответствии с ИСО 20387:2018, 4.3.

Необходимо документировать информацию о доноре. При возможности необходимо подготовить документацию до отбора проб. Документация должна включать, помимо прочего:

a) идентификатор донора, который может иметь вид кода [например, псевдонимизированный (снабженный псевдонимом), анонимизированный (обезличенный)];

b) информацию о состоянии здоровья донора костного мозга (например, справка о здоровье или пригодности донора, тип заболевания, сопутствующее заболевание, демографические данные, например возраст, пол);

c) информацию о медицинском и специальном лечении до сбора костного мозга (например, дата, сроки лечения, принимаемые медикаменты, заключение медицинского специалиста);

d) отрицательный результат на гепатиты B и C, ВИЧ, БС и токсоплазмоз, если для конкретных целей исследования не требуется положительный результат.

Примечание 1 — Возможно проведение дополнительного анализа на вирусы, при необходимости;

e) если применимо, данные об информированном добровольном согласии, данном донором (например, копия подписанного информированного добровольного согласия с отредактированными данными имени донора); см. ИСО 20387:2018, 7.2.3.4.

Документирование информации о доноре, при необходимости, должно включать географический регион донора в зависимости от цели исследования.

Доноры считаются непригодными для сдачи биологического материала (если иное не требуется для выполнения конкретной цели исследования) в том случае, если:

- были нездоровы на момент сдачи материала.

Примечание 2 — Периоды воздержания от донорской деятельности могут существовать и/или варьироваться в зависимости от местных нормативных рекомендаций для отдельных клеточных и тканевых материалов;

- получили положительный результат по крайней мере на одно инфекционное заболевание, см. 6.1 d).

В процессе сбора клеток человека необходимо принять меры по защите здоровья и безопасности донора и персонала биобанка.

Выделение МСК-КМ человека не следует проводить от доноров, имеющих медицинские противопоказания на извлечение пунктата костного мозга, на седативные средства или анестезию по результатам оценки соответствующего риска.

Выявлено, что статус доноров костного мозга, такой как возраст, вирусные инфекции, опухолевые и иммунологические нарушения, влияют на некоторые характеристики МСК [28].

6.2 Анатомическая область сбора материала

Что касается анатомической области сбора материала, применяют рекомендации протоколов [29].

Если сбор костного мозга проводят при помощи пункции интрамедуллярного канала, то его допускается проводить из головки бедренной кости [12], [21], [30].

Для каждой процедуры анатомическую область сбора материала документируют.

6.3 Объем собранного материала

Выявлено, что объем собранного материала костного мозга влияет на число выделенных мононуклеарных клеток и, следовательно, играет важную роль в эффективном выделении МСК-КМ человека из костного мозга [21]. Таким образом:

a) аспираты костного мозга следует отбирать в минимальном объеме, равном 10 мл, и документально подтверждать этот объем по [24], [31]—[33];

b) пробы, полученные пункцией интрамедуллярного канала, следует отбирать в минимальном объеме, равном 15 мл, и документально подтверждать этот объем по [12], [13], [21], [30].

6.4 Процедура сбора материала

6.4.1 Общие положения

Необходимо соблюдать требования ИСО 20387:2018, 7.2.

Биобанк обязан разработать, внедрить, валидировать и задокументировать процедуру сбора костного мозга для каждого используемого метода (см. 6.4.2 и 6.4.3).

Все реактивы и материалы, используемые для сбора костного мозга, должны быть стерильными.

Биобанк обязан соблюдать требования ИСО 35001 или [34] при работе с биологическим материалом, зараженным патогенами.

Риск микробиологической контаминации (бактериальной, грибковой, вирусной, паразитарной) следует снизить, акцентируя внимание на тех агентах, которые, вероятнее всего, могут стать контаминантами, исходя из места проживания, когорты доноров и извлекаемой ткани.

6.4.2 Получение материала костного мозга пункцией из интрамедуллярного канала

Пробу собирают в стерильный контейнер однократного применения и наполняют антикоагулянтом.

Признанными на международном уровне и валидированными антикоагулянтами являются ЭДТА (этилендиаминтетрауксусная кислота) или гепарин в концентрации от 15 до 25 МЕ/мл.

6.4.3 Получение костного мозга путем аспирации

Аспирацию костного мозга проводят в соответствии с протоколами [29].

Аспираты костного мозга следует собирать в шприцы, содержащие ЭДТА или гепарин в концентрации от 15 до 25 МЕ/мл [29].

7 Транспортирование проб костного мозга или МСК-КМ человека и связанных с ними данных в биобанк

Необходимо соблюдать требования ИСО 20387:2018, 7.4. ISO/TS 20658 возможно применять для организации транспортирования и погрузочно-разгрузочных работ, а также для учета требований к безопасности помещений.

При обращении с биологическим материалом, зараженным патогенами, биобанк обязан соблюдать требования ИСО 35001 или [34].

Биобанк должен определить подходящие условия для транспортирования костного мозга из помещения для сбора материала в биобанк. Следует применять инструкции по транспортированию костного мозга до места подготовки, а также транспортирование подготовленных МСК-КМ человека в биобанк.

Необходимо учитывать следующие факторы при транспортировании костного мозга:

a) упаковку, материал, контейнеры и вторичную упаковку;

b) среду или растворитель;

c) продолжительность транспортирования, температуру и средства мониторинга температуры.

Среда и условия сбора исходного биологического материала должны быть установлены, внедрены, задокументированы и валидированы для обеспечения поддержания жизнеспособности и других ключевых параметров.

Проба подлежит транспортированию в соответствующих условиях биобезопасности.

Необходимо установить, внедрить и задокументировать процедуру для критических контрольных точек.

8 Получение и прослеживаемость костного мозга или МСК-КМ человека и связанных с ними данных

Необходимо соблюдать требования ИСО 20387:2018, 7.3.1, 7.3.2, 7.5.

9 Выделение и размножение МСК-КМ человека

9.1 Процессы

Для создания линии МСК-КМ человека необходимо соблюдать требования ИСО 21709:2020, 5.1.

Биобанк обязан установить, внедрить, задокументировать, валидировать и поддерживать процедуры выделения МСК-КМ человека в первичной культуре и субкультуре в зависимости от используемого для сбора биоматериала метода (см. 6.4.2, 6.4.3).

Процедуры следует выполнять в боксе биологической безопасности или в ламинарном шкафу, используя соответствующие асептические техники.

9.2 Уникальная идентификация

Уникальную идентификацию МСК-КМ человека устанавливают согласно ИСО 20387:2018, 7.5. Она может включать уникальное имя клетки или номер пробы, номер биобанковской партии и номер пробирки биобанка. Клетки следует анонимизировать или деидентифицировать.

9.3 Анализы на возбудителей инфекции

Клетки, полученные из донорского биологического материала, следует анализировать на соответствующие передаваемые возбудители инфекции, например ВИЧ, ВГВ, ВГС, токсоплазмоз и БС.

Аналитические данные и результаты, а также соответствующие анализы должны быть документированы и доступны для персонала биобанка и исследователей, которые обрабатывают полученные клетки.

9.4 Выделение МСК-КМ человека из проб костного мозга, полученных пункцией из интрамедуллярного канала, и первичное культивирование

Для оптимальной функциональности процедуру выделения МСК-КМ человека следует начинать в течение 2 ч, но не позднее 8 ч после сбора костного мозга (см. 6.4.2) [21], [35].

Процедуры выделения МСК-КМ человека из костного мозга могут отличаться. Необходимо выполнить следующую последовательность действий:

a) выполнить стерильное механическое разрушение путем пункции интрамедуллярного канала для создания клеточной суспензии. Клеточная суспензия может быть приготовлена по процедуре, описанной в приложении A, b);

b) отфильтровать полученную пробу, например, как указано в приложении A, c);

c) собрать отфильтрованную пробу и центрифугировать ее, например, как указано в приложении A, d) и e);

d) собрать клетки (светлый слой кровяного сгустка) и разбавить с помощью PBS. Следует добавить антибиотики. Затем мононуклеарные клетки необходимо отделить центрифугированием по градиенту плотности. См. примеры этапов рабочего процесса в приложении A, f)—j);

e) как только мононукреарные клетки будут отделены, выполнить подсчет клеток и определить жизнеспособность клеток, используя метод исключения красителя (например, трипанового голубого) либо вручную, либо при помощи автоматизированного устройства;

f) начинать культивирование клеток следует, когда их жизнеспособность превышает 90 %, а количество подсчитанных клеток составляет от $100 \cdot 10^3$ до $160 \cdot 10^3$ клеток/см^2. Условия культивирования следует задокументировать, например давление O_2, pH, температуру, условия влажности и условия нормального содержания кислорода (нормоксические) или нехватки кислорода (гипоксические);

g) спустя 72 ч удалить неприкрепившиеся клетки и добавить свежую питательную среду. Питательную среду не удаляют, чтобы наблюдать прикрепившиеся клетки (приблизительно от пяти до семи дней);

h) когда наблюдается слияние слипшихся клеток от 70 % до 80 %, произвести пассирование клеток путем трипсинизации (обработки трипсином). Для культивирования следует использовать среды, не содержащие сыворотку крови. В качестве альтернативы также допускается использовать питательную среду с добавлением ЭТС (обычно от 5 % до 10 %), лизата тромбоцитов (обычно от 5 % до 10 %) или сыворотки крови человека (обычно от 5 % до 10 %).

9.5 Выделение МСК-КМ человека из проб костного мозга, полученных аспирацией, и первичное культивирование

Чтобы поддержать жизнеспособность МСК-КМ человека, необходимо выполнять процедуру выделения МСК-КМ человека в рамках заранее определенного интервала времени.

a) Аспират костного мозга переносят в стерильную(ые) пробирку(и) и центрифугируют. Затем снова готовят суспензию клеток в питательной среде [35]—[37]. Примерная последовательность действий приведена в приложении А.

b) Подсчитывают клетки и определяют их жизнеспособность.

c) Прямой посев: культивирование следует начинать при жизнеспособности клеток ≥ 90 % и плотности клеток $1 \cdot 10^6$ клеток/см^2.

d) Инкубируют при температуре (36,5 ± 0,5) °С в атмосфере 5 %-ного CO_2 и 95 %-ной относительной влажности. Затем следуют 9.4, f) и g).

e) МСК-КМ человека, полученные из аспирата костного мозга, должны выращиваться после первого пассажа при плотности от $3 \cdot 10^3$ до $7 \cdot 10^3$ клеток/см^2.

МСК-КМ человека не рекомендуется использовать после пятого пассирования, поскольку вероятность фенотипической и хромосомной нестабильности возрастает, см. [38]—[40].

9.6 Пассирование и ограниченное размножение

В целях дальнейшего биобанкинга культура может быть дополнительно размножена после успешного создания исходной культуры; такая культура известна как «субкультура». Каждое пассирование культуры называют «субкультивированием» или «пассажем».

Культуры следует проверять на присутствие микробиологических контаминантов (включая бактерии, грибы, дрожжи, микоплазму, эндотоксины и случайные вирусные возбудители болезней) перед последующим размножением.

Пассаж клеток происходит по соответствующим протоколам после создания исходной культуры. Размножение МСК-КМ человека рекомендуется проводить до трех пассажей, чтобы обеспечить достаточную жизнеспособность материала, сохраняя биологические особенности исходной культуры, и, таким образом, предотвращая адаптацию, связанную с культивированием. Биобанк должен следить за размножением, наблюдая за изменениями конкретных биологических характеристик (например, КОЕ-Ф, статус отсутствия дифференцировки и иммунофенотипирование).

10 Характеристика МСК-КМ человека

10.1 Общие положения

Биобанк обязан разработать, задокументировать и внедрить процедуры для характеристики МСК-КМ человека и регистрировать связанные с ними данные, так чтобы пользователи могли определить их соответствие предполагаемому назначению.

Биобанк должен разработать матрицу анализов и набор маркеров по крайней мере на основе раздела 10.

Биобанк должен проводить постоянную характеристику МСК-КМ человека при культивировании. Такая характеристика должна включать среди прочего:

a) подтверждение подлинности;
b) морфологию клеток;
c) кинетику роста: может быть вычислена с помощью ВУП;
d) жизнеспособность;
e) способность к дифференцировке *in vitro*;
f) иммунофенотип;
g) функциональную характеристику *in vitro*;
h) отсутствие микробной контаминации.

10.2 Жизнеспособность

Биобанк должен разработать, внедрить и задокументировать процедуру определения жизнеспособности клеток.

Контроль качества анализа жизнеспособности клеток проводят с использованием живых и мертвых клеток. Необходимо определять и документировать показатель жизнеспособности клеток.

Биобанк обязан регулярно проводить оценку количества жизнеспособных клеток при культивировании, особенно после изменения условий культивирования клеток.

Жизнеспособность необходимо оценивать после размораживания криоконсервированных образцов.

Биобанк должен установить предельное значение приемлемого процента нежизнеспособных клеток в популяции в процессе анализа.

Количество жизнеспособных МСК-КМ человека перед криоконсервацией должно составлять ≥ 90 %.

Непосредственно после размораживания количество жизнеспособных МСК-КМ человека должно быть ≥ 70 % при определении валидированным методом.

Примечание — Анализ на жизнеспособность обычно выполняют перед криоконсервацией и непосредственно после размораживания. Жизнеспособность, определенная после размораживания клеток, обычно является завышенной.

Следует выполнить автоматизированный анализ на жизнеспособность клеток.

Биобанк обязан разработать, внедрить и задокументировать процедуру оценки апоптоза клеток при культивировании.

10.3 Морфология

Под микроскопом высеянные МСК-КМ человека обычно имеют вид, подобный фибробластам (веретенообразная форма), и растут, прикрепляясь ко дну чашки, при этом размер/длина клетки ≥ 15 мкм. Колонии имеют спиральные или радиальные конфигурации. Необходимо определить морфологические особенности, которые должны соответствовать характеристикам МСК-КМ человека, выделенных из костного мозга.

10.4 Время удвоения популяции и пассаж

10.4.1 ВУП

ВУП [41] — это время, ч, необходимое для удвоения популяции МСК-КМ человека. ВУП вычисляют, используя подсчет клеток, полученных до и после собирания для исследования, по формуле

$$D = \frac{(T - T_0) \cdot \log^2}{(\log N - \log N_0)}, \quad (1)$$

где D — значение ВУП;

$(T - T_0)$ — время инкубации, ч;

N — число собранных клеток;

N_0 — число засеянных клеток.

Примечание 1 — Формула (1) применима в линейном диапазоне размножения клеток.

Среднее значение ВУП для МСК-КМ человека, выделенных из костного мозга человека, находится в интервале от 40 до 100 ч [30], [42], [43].

Примечание 2 — В зависимости от условий культивирования, пассажа культуры, плотности клеток и характеристик донора (например, возраст донора) значение ВУП может варьироваться.

Биобанку следует определить значение ВУП для МСК-КМ человека после вторичного культивирования.

ВУП может отражать кинетику роста МСК-КМ человека при культивировании. Биобанк может использовать значение ВУП культур МСК-КМ человека при различных пассажах, чтобы оценить изменения кинетики роста клеток при культивировании.

Значение ВУП необходимо документировать.

10.4.2 Пассаж

P_0, номер(а) пассажа(ей) вместе с указанием плотности при посеве и конечной плотности клеток, а также площадь поверхности емкости для культивирования необходимо задокументировать. Когда МСК-КМ человека покроют емкость для культивирования приблизительно на 70 % — 80 %, можно пассировать клетки.

Лаборатории часто нумеруют пассажи. В то же время номер пассажа коррелирует с площадью поверхности/объемом емкости для культивирования и способом определения первоначального P_0. Рекомендуется, чтобы биобанк определил P_0 как первоначальный пассаж клеток костного мозга на чашки.

Документально подтвержденное значение ВУП наряду с номерами пассажей может облегчить и улучшить понимание динамики роста МСК-КМ человека и взаимосвязи между пассажами и ВУП.

10.5 Чистота популяции клеток

Биобанк обязан оценить чистоту МСК-КМ человека. Нежелательные популяции клеток, таких как кроветворные и эндотелиальные клетки (см. таблицу 1), должны присутствовать в количестве ниже определенных пределов, например ≤ 5 %. Иммунофенотипирование МСК-КМ человека, приведенное в 10.9, допускается использовать для оценки и верификации чистоты и идентичности. Нежелательные микробные контаминанты должны быть определены и проверены в соответствии с 10.12.

Примечание — Верификация идентичности является частью процесса верификации подлинности клеточной линии, в которой происхождение клеток подтверждено генетически.

10.6 Оценка самообновления *in vitro*

Биобанк обязан разработать, внедрить и задокументировать процедуру оценки самообновления *in vitro* с использованием анализа КОЕ-Ф.

Клетки с ядрами, выделенные из аспирата костного мозга, должны быть использованы для анализа колониеобразования до каких-либо манипуляций.

Инкубируют клетки в течение от 10 до 14 дней при температуре (36,5 ± 0,5) °С в увлажненной атмосфере 5 %-ного CO_2 [44]—[46].

Пример — Ядросодержащие клетки, выделенные из аспирата костного мозга, культивируют в течение 14 дней при 5 %-ном содержании CO_2. Клетки могут присутствовать в диапазоне концентраций от $0,5 \cdot 10^6$ до $2,5 \cdot 10^6$ клеток. Клетки обычно культивируют в Альфа-среде с добавлением 20 %-ного ЭТС, но можно использовать другую среду и другие концентрации ЭТС. Замену среды выполняют после 4-ного и после 7-ного дня. Клетки фиксируют в метаноле и окрашивают 1 %-ным кристаллическим фиолетовым для подсчета колоний с морфологией фибробласта под микроскопом (КОЕ-Ф) [47].

10.7 Пролиферация

Биобанк должен разработать, внедрить и задокументировать анализ пролиферации клеток.

Анализ пролиферации клеток необходимо задокументировать, включая внутренние критерии КК в соответствии с разделом 11.

Примечание — Пролиферацию клеток можно оценить валидированным методом, например, при помощи CFSE или MTT.

10.8 Способность к дифференцировке. Мультилинейная дифференцировка *in vitro*

10.8.1 Общие положения

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ — Чтобы оценить мультилинейную дифференцировку МСК-КМ человека *in vitro*, биобанку следует разработать, задокументировать и внедрить процедуры и требования к конкретным анализам (МСК-КМ человека, способных подвергаться мультилинейной дифференцировке *in vitro*). Следующие анализы мультилинейной дифференцировки *in vitro* являются частью характеристики *in vitro* МСК-КМ человека, но не всегда отражают способность к дифференцировке этих клеток *in vivo*.

Мультилинейная дифференцировка *in vitro* в остеобласты, адипоциты и хондробласты в определенных условиях является полезным инструментом для характеристики МСК-КМ человека. Эта информация может быть полезна при оценке в формате количественного анализа, прошедшего валидацию и достаточно чувствительного для оценки МСК-КМ человека, выращенных в течение разных интервалов времени и в разных условиях.

10.8.2 Адипогенная дифференцировка *in vitro*

МСК-КМ человека могут дифференцировать в адипобласты *in vitro* в адипогенной индукционной среде. Обычно рекомендуется адипогенная индукционная среда, содержащая дексаметазон, 3-изобутил-1-метилксантин, рекомбинантный инсулин человека и индометацин.

Должны использоваться МСК-КМ человека с конфлуэнтностью ≥ 80 % в третьем — пятом пассажах. Не следует использовать культуры МСК-КМ человека после пятого пассажа. Рекомендуется использовать контрольные группы без применения адипогенной дифференциальной среды.

Следует использовать окрашивание красителем Oil Red O для обнаружения адипогенной дифференцировки, особенно спустя три недели. Этот краситель окрашивает образованные нейтральные липидные вакуоли. Чтобы избежать ложных положительных результатов, необходимо строго контролировать время окрашивания и промывания.

Для дополнительного подтверждения адипогенной способности МСК-КМ человека необходимо оценить экспрессию генов, кодирующих белки, связанные со статусом адипогенной дифференцировки. Следует оценить экспрессию различных генов (аддитивные факторы), связанных с адипогенной дифференцировкой, такие как PPAR-γ (рецептор, активируемый пероксисомным пролифератором гамма), CEBPα (CCAAT/альфа-белок, связывающий энхансер), FABP4 (белок 4, связывающий жирные кислоты) и PREF-1 (преадипоцитарный фактор 1), AP2 (адипатит протеин-2) и ЛПЛ (липопротеиновая липаза), используя количественную реакцию ПЦР в реальном времени [48]—[50].

10.8.3 Хондрогенная дифференцировка *in vitro*

МСК-КМ человека могут дифференцировать в хондробласты *in vitro* в хондрогенной индукционной среде. Обычно рекомендуется хондрогенная индукционная среда, содержащая ТРФ-бета-3, дексаметазон, аскорбиновую кислоту, пируват натрия, инсулин, трансферрин, селеновую кислоту, альбумин из бычьей сыворотки и линолевую кислоту в глюкозе с высоким содержанием DMEM [48], [51], [52].

В дополнение к двумерной дифференцировке *in vitro* также можно выполнить хондроцитовую дифференцировку с использованием 3D культур микромассы, как было описано ранее для МСК [53].

Необходимо использовать культуры МСК-КМ человека с конфлуэнтностью ≥ 80 % в третьем — пятом пассажах. Культуры МСК-КМ человека после пятого пассажа использовать не рекомендуется. Следует включить контрольные группы без хондрогенной дифференциальной среды или условий.

Хондрогенная дифференцировка должна сопровождаться образованием многослойной, богатой матриксом морфологии и внеклеточного матрикса, который после окрашивания Толуидиновым синим или азаном по Гейденгайну (Heidenhain) демонстрирует накопление сульфатного протеогликана и коллагеновых волокон соответственно. Допускается использовать другие методы окрашивания, например, Альциановым синим или Сафранином О.

Для дополнительного подтверждения хондрогенной способности МСК-КМ человека необходимо оценить экспрессию генов, кодирующих белки, связанные со статусом хондрогенной дифференцировки. Подмножество генов, таких как SOX9 (HMG бокс-9, связанный с SRY), COL2A1 (коллаген типа 2A1), COL10 (коллаген типа X) и ACAN (аггрекан), следует оценивать, используя количественную реакцию ПЦР в реальном времени [48], [50], [51].

10.8.4 Остеогенная дифференцировка *in vitro*

МСК-КМ человека могут дифференцировать в остеобласты *in vitro* в остеогенной индукционной среде. Рекомендуемая остеогенная индукционная среда содержит дексаметазон, аскорбат и β-глицерофосфат.

Примечание — Плотность клеток, а также выбор определенных партий ЭТС влияют на дифференцировку остеобластов.

Следует использовать культуры МСК-КМ человека с конфлуэнтностью ≥ 80 % на третьем — пятом пассаже. После пятого пассажа МСК-КМ человека использовать не рекомендуется. Следует включить контрольные группы без остеогенной дифференциальной среды.

Остеогенную дифференцировку подтверждают после трехнедельной индукции по отложенному кальцию, выявляемому окрашиванием. В контрольной группе (без использования остеогенной среды) не должно наблюдаться остеогенного фенотипа.

Для выявления остеогенной дифференцировки следует использовать красители ализариновый красный S или краситель фон Косса (von Kossa). Время окрашивания и промывания следует строго контролировать, чтобы избежать ложных положительных результатов.

Для дополнительного подтверждения остеогенной способности МСК-КМ человека необходимо оценить экспрессию генов, кодирующих белки, связанные со статусом остеогенной дифференцировкой. Эти гены, такие как ALP (щелочная фосфатаза), RUNX2 (транскрипционный фактор 2, связанный с карликовостью), ОЦН (остеокальцин) и ОПН (остеопонтин), следует оценивать, используя количественную реакцию ПЦР в реальном времени [48], [50]. Также внутриклеточное окрашивание поможет оценить экспрессию белка ОПН или другие маркеры костеобразования.

10.9 Иммунофенотипирование посредством проточной цитометрии

МСК-КМ человека следует характеризовать с помощью набора, включающего по крайней мере маркеры (антигены) и экспрессии антигенов, перечисленных в таблице 1. Дополнительно, при необходимости, допускается применять другие международные руководства.

Примечание — Антигены: CD146 и CD271 идентифицированы в МСК-КМ человека.

Таблица 1 — Антигены и клоны антител, рекомендованные для иммунофенотипирования

Антиген	Клоны антител [12], [13], [54]—[59]	Необходимая скорость обнаружения, %
CD31–	Недостаточно информации для предложения клонирования	≤ 5
CD34– [a]	581, Q-BEN 10, 8G12, AC136, 4H11	≤ 5
CD45– [b]	2D1, t29/33, HI30	≤ 5
HLA-DR± [c]	L243	Зависит от питательной среды
CD44+	MEM-85, G44-26	≥ 90
CD73+	AD2	≥ 90
CD90+	Thy-1, F15-42-1, 5E10	≥ 90
CD105+	SN6	≥ 90
CD146+	Недостаточно информации для предложения клонирования	≥ 90
CD271+	Недостаточно информации для предложения клонирования	≥ 90
Неопределенность		≤ 5

[a] CD34– предполагает, что клетки негативны по отношению к эндотелиальным антигенам.

[b] CD45– предполагает, что клетки негативны по отношению к дополнительным гемопоэтическим антигенам, включая CD11b, CD14 и CD19.

[c] HLA-DR–. Несмотря на то, что нестимулированные МСК-КМ человека являются негативными для HLA-DR, это зависит от донора. Важно, что МСК-КМ человека синтезируют HLA-DR при стимуляции гамма-интерфероном (ИФН-γ).

10.10 Паракринная секреция/экспрессия (анализ секретома на основе белка)

Известно, что МСК-КМ человека секретируют/экспрессируют множество цитокинов, хемокинов и факторов роста, включая (но не ограничиваясь ими) ТРФ-бета, ИДО, COX-2, PDL-1, ФРЭС, WNTS, ФРГ, IL6, IL1RA, ФРК, CCL2, CXCL12, экзосомы, содержащие микро-РНК, липиды, митохондрии и другие карго-молекулы, где это применимо. Эти факторы могут воздействовать на местные и дистальные иммунные эффекторы и ткани, тем самым модулируя иммунный ответ и процессы восстановления тканей [19], [60]—[62].

Следует заранее определить, задокументировать и испытать набор соответствующих факторов в зависимости от цели исследования [61].

Примечание 1 — Анализы на основе белка, такие как ИФА или мультиплекс, могут быть использованы для измерения секретируемых факторов с помощью МСК-КМ человека.

Примечание 2 — Важно отметить, что, как показано, МСК-КМ человека требуют стимуляции для проявления своих иммуносупрессивных свойств. Это может быть осуществлено путем воздействия растворимых медиаторов аллергического воспаления, таких как ИФН-γ TNF, интерлейкин, или путем физического контакта с воспалительными клетками. Данный метод «активации» МСК-КМ человека имеет большое значение, и существует несколько вариантов его выполнения [63].

Неактивированные МСК-КМ человека могут служить в качестве контрольных.

Уровни мРНК следует определять методами ПЦР в реальном времени или методом мультиплексной ПЦР. Дополнительно измеряют уровни белка для паракринной секреции/экспрессии с помощью ИФА или мультиплексных методов в супернатанте клеточной культуры.

10.11 Иммунорегуляция (модуляция иммунных клеток)

Известно, что МСК-КМ человека модулируют иммунные клетки. Конкретный тип иммунных клеток может варьироваться в зависимости от доклинической модели, интересующего заболевания и механизма изучаемого действия. Поэтому рекомендуется использовать конкретные популяции очищенных иммунных эффекторов при совместном культивировании с МСК-КМ человека, чтобы измерить влияние МСК на эту популяцию.

Факторы, которые характеризуют иммуномодулирующие свойства МСК-КМ человека и которые следует учитывать в этом функциональном анализе, включают соотношение МСК-КМ человека и иммунных эффекторных клеток, условия среды, активацию МСК-КМ человека, активацию иммунных эффекторов и гетерогенность доноров иммунных эффекторов.

Матричный анализ должен применяться следующим образом [19]:

a) необходимо выполнить количественный анализ выбранных генных продуктов:

1) МСК-КМ человека должны быть активированными, неактивированные клетки МСК следует использовать в качестве контроля,

2) необходимо выполнить количественную экспрессию в реальном времени по меньшей мере трех генов; допускается измерить следующие гены (не конечный перечень): ИДО, CXCL10, CXCL9, CXCL11, CIITA, ICAM-1, CCL5, TRAIL, TLR-3, CCL7, VCAM-1, HLA-DR, ФРГ, ИЛ-6, CCL2, PI9, CCR7, ФРЭС, PDL-1, CX3CR1, COX-2, AHR, TSG-6, ФРК, TLR-4, CXCL12, CD46, PDL-2, ТРФ-бета, CXCR6, CCR10, TIMP-2, CD55, BCL-2, ANGPT2, A20, HSP70A, ИЛ-8, ULBP-3, HSP70B, CXCR1, GAL-1, CXCR4, НО-1, TIMP-1, ИЛ-1РА [61], [64].

Примечание — Эти гены являются примерами, анализировать полный перечень необязательно. Пользователю следует выбрать гены из этого перечня (или других перечней из литературных источников), разработать набор показателей секретируемых/экспрессируемых факторов, подходящих для контекста доклинических исследований;

b) необходимо выполнить экспрессию белка выбранных секретируемых/экспрессируемых факторов [см. 10.11, a) 2)];

c) иммуномодуляцию МСК следует оценивать с помощью анализа их влияния на пролиферацию *in vitro* иммунных эффекторов. С этой целью инкубацию МСК следует осуществлять с использованием либо общих периферических лимфоцитов из мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC), либо очищенных суб-популяций лимфоцитов. Предпочтительно использовать стандартизованные методы анализа, которые могут подтвердить клинические подходы на основе МСК в качестве теоретически полезного метода лечения иммунологических заболеваний [62].

Дополнительно рекомендуют следующий подход к матричному анализу:

- количественный анализ выбранных генных продуктов;
- анализ функционально значимых поверхностных маркеров методом проточной цитометрии;
- белковый анализ секретома для тестирования иммуномодулирующих функций МСК [19].

Исследования показали, что функциональная гетерогенность МСК-КМ человека зависит, среди прочего, от условий культивирования, числа пассажей и состояния активации. Поэтому в дополнение к мультилинейной дифференцировке *in vitro*, относящейся к иммуномодуляторной способности МСК-КМ человека, рекомендуется выполнять функциональную оценку, чтобы подтвердить их функциональный статус.

10.12 Микробная контаминация

Необходимо разработать, валидировать, внедрить и задокументировать процедуры анализа МСК-КМ человека на микробную контаминацию для всего процесса.

На протяжении всего процесса, начиная со сбора клеток у донора и их приобретения, подготовки реактивов и оборудования для культивирования и заканчивая обслуживанием и криоконсервацией культур, важно придерживаться целостного подхода и проводить микробиологический контроль на всех критических этапах процесса. Кроме того, необходимо подготовить процедуры минимизации рисков для отдельных созданных культур. Хорошей практикой является поддержание процедур КК для первичных тканей или клеток, заново вносимых в биобанк. Такие культуры следует держать в специально

отведенной зоне и использовать для них отдельное оборудование до тех пор, пока не будет получено достаточных данных для обоснования их перемещения.

Методы, используемые для микробиологических исследований, необходимо валидировать. Важно подтвердить использование соответствующих уровней чувствительности, специфичности и устойчивости в отношении анализируемых клеточных культур.

В течение всего процесса необходимо осуществлять менеджмент риска с оценкой микробной контаминации.

МСК-КМ человека, используемые для исследований, не должны содержать контаминантов. К этим контаминантам относят, среди прочего, бактерии, дрожжи, грибы и микоплазму.

a) Анализы на присутствие бактерий, дрожжей, грибов и микоплазмы должны проводиться регулярно. Следует по мере возможности избегать использования антибиотиков. В случае использования антибиотиков их следует удалить перед отбором проб.

b) Также необходимо знать о влиянии, которое могут оказать контаминанты на биологические характеристики культивируемой клеточной популяции. Например, низкий уровень вирусной инфекции, вероятно, не окажет значительного воздействия на гибель клеток, но может заметно сказаться на биологической активности. Такой тип контаминантов может воздействовать на любые данные проводимых исследований.

Пример — Микоплазма считается обычным контаминантом клеточных культур ввиду риска контаминации из различных источников. Микоплазму бывает очень трудно удалить из клеточной культуры, поскольку маленький размер ограничивает фильтрование, при этом ее сложно обнаружить без повседневного анализа.

Риски, вызванные трансмиссивными губчатыми энцефалопатиями (TSE) в питательной среде (бычья сыворотка), следует учитывать независимо от происхождения или истории клеток. Существует ряд заболеваний TSE в мире, показывающих их способность передаваться человеку.

11 Контроль качества

Необходимо соблюдать требования ИСО 20387:2018, 7.8, и ИСО 21709:2020, 5.5.

Биобанк обязан разработать, внедрить и задокументировать процедуру КК, включающую анализ биологических характеристик, связанных с функциональностью МСК-КМ человека *in vitro* в соответствии с разделом 10.

КК биологических характеристик (см. раздел 10) МСК-КМ человека должен выполняться для всех важных процедур, от выделения до размораживания.

Биобанк должен разработать, внедрить и задокументировать критерии приемлемости КК для всех биологических характеристик МСК-КМ человека, включенных в раздел 10.

Биобанк должен разработать, внедрить и задокументировать критерии приемлемости КК для всех важных контрольных точек, например питательных сред, реактивов, оборудования.

В ходе процессов биобанкинга необходимо периодически анализировать питательные среды на присутствие *Mycoplasma* spp.

КК разрабатывают с учетом риск-ориентированного подхода, связанного с безопасностью лаборатории.

12 Хранение

Необходимо соблюдать требования ИСО 20387:2018, 7.5, 7.7, пункт A.6, и ИСО 21709:2020, 5.3.4.

Оптимизация процедуры криоконсервации и методов минимизации повреждения клеток при замораживании и размораживании является критической для обеспечения гарантированного присутствия жизнеспособных клеток.

Примечание — Контроль скорости замораживания с использованием подходящего криопротектора и поддержание стабильной температуры хранения может свести к минимуму негативное влияние на жизнеспособность клеток.

Для криоконсервированных МСК-КМ человека необходимо документировать следующую информацию:

a) наименование клеток;

b) номер партии консервированных МСК-КМ человека;
c) дату консервации в соответствии с ИСО 8601-1;
d) условия культивирования;
e) число пассажей;
f) ФИО оператора.

Каждая хранящаяся пробирка из одной и той же партии культивируемых клеток должна иметь уникальный идентификационный номер (т. е. номер биобанка или номер партии), прослеживаемый на протяжении сбора, выделения и размножения в соответствии с ИСО 20387:2018, 7.5.

Перед замораживанием необходимо проанализировать морфологию клеток (см. 10.3), иммунофенотип, иммуномодуляторную функциональность (см. 10.11), жизнеспособность (см. 10.2) и паракринную секрецию (см. 10.10); полученные результаты должны коррелировать со свойствами МСК, выделенных из костного мозга. Для оценки способности к дифференцировке (см. 10.8), кинетики роста и анализа самовосстановления (см. 10.6) следует собирать репрезентативные пробы, результаты оценки могут быть использованы после криоконсервации. Результаты этих анализов следует документировать и включать в досье на клеточный образец.

Количество жизнеспособных клеток должно быть ≥ 80 %, при этом они не должны содержать контаминантов.

Клетки должны быть в фазе роста, отцентрифугированы и суспендированы в среде для криоконсервации. Количество клеток должно оставаться в интервале от 500 000 до 5 000 000 клеток/мл.

Замораживание с контролируемой скоростью МСК-КМ человека выполняют следующим образом:

- документируют дату и время начала процесса криоконсервации в соответствии с ИСО 8601-1;
- начинают быстрое охлаждение от комнатной температуры до минус 10 °С со скоростью от 0,5 до 1 °С/мин;
- выдерживают при температуре минус 10 °С в течение 5 мин; этот шаг является критическим для обеспечения формирования зародыша кристалла льда;
- понижают температуру до минус 80 °С со скоростью 1 °С/мин (целевая температура);
- переносят в жидкий азот для последующего хранения.

Биобанк обязан вести записи процесса криоконсервации, включая плотность, жизнеспособность клеток и контроль температуры.

13 Размораживание

В процессе размораживания замороженные клетки должны оттаивать при температуре (36,5 ± 0,5) °С или быть обработаны для культивирования с добавлением среды по каплям, введены в культуру и затем перенесены в инкубатор с соответствующей газовой атмосферой и влажностью. Для оптимизации процесса инкубатор следует установить на соответствующую температуру культивирования, обычно она равна (36,5 ± 0,5) °С.

Замороженные клетки следует быстро размораживать при помощи тепла и переноса непосредственно в предварительно подогретую до температуры (36,5 ± 0,5) °С питательную среду, чтобы обеспечить максимальную жизнеспособность и биологическую активность МСК-КМ человека.

Для клеток, консервированных методами витрификации, этот этап может быть более критичным, поэтому следует получить консультацию специалиста.

Следующую информацию необходимо четко задокументировать, включая среди прочего:

a) номер партии, указанный на замороженных пробирках;
b) наименование клеток;
c) число пассажей;
d) состояние культуры;
e) ФИО оператора;
f) дату проведения операции по размораживанию в соответствии с ИСО 8601-1;
g) время размораживания в соответствии с ИСО 8601-1 с момента, когда замороженные клетки покидают жидкий азот до момента, когда клетки вводят в культуру;
h) дату в соответствии с ИСО 8601-1, при которой культура достигает достаточной плотности колоний для пассирования.

После размораживания необходимо проверить жизнеспособность клеток.

14 Утилизация

Для контроля утилизации отходов соблюдают требования ИСО 20387:2018, 4.1.8, 7.1.1, 7.5.3, 8.4.2, пункт А.7, и ИСО 21709:2020, 5.3.6.

Утилизация МСК-КМ человека должна осуществляться в соответствии с действующими требованиями по защите окружающей среды, биобезопасности и этики.

15 Распространение МСК-КМ человека. Информация для пользователей

Необходимо соблюдать требования ИСО 20387:2018, 7.12.

Пользователям МСК-КМ человека предоставляют инструкции по использованию (IFU) и/или стандартные рабочие процедуры выделения, консервации, хранения и транспортирования МСК-КМ человека. IFU обычно содержат информацию с общими положениями, связанными с культивированием, методами и процедурами консервации.

Пользователям МСК-КМ человека должны быть предоставлены номера партий, прослеживаемые до партии или биобанка, и заявление или паспорт безопасности материала, содержащие опасности для поставляемых МСК-КМ человека.

Пользователям МСК-КМ человека в обязательном порядке предоставляют условия или гарантии, которые квалифицируют потенциал и характеристики МСК-КМ человека на основе анализов, выполненных биобанком.

Характеристика и данные микробиологических анализов от лица, внесшего МСК-КМ человека в биобанк, должны быть доступны пользователям.

Биобанк обязан разработать документированную политику по качеству и поиску источников сырья, которые могут воздействовать на качество клеточных препаратов, с учетом национальных или международных ограничений, например фетальная бычья сыворотка, трипсин, факторы роста.

Биобанк должен обеспечить наличие сведений для облегчения эффективного выбора подходящих клеток. Эти сведения должны включать, среди прочего:

a) дату сбора и консервации ткани в соответствии с ИСО 8601-1;

b) дату, согласно ИСО 8601-1, попытки выделения (для МСК-КМ человека обычно принимают дату выделения клеток из костного мозга или посева на чашки *in vitro*);

c) использование свежего или замороженного источника биологического материала;

d) где применимо, информацию, касающуюся информированного добровольного согласия, полученного от донора-человека на использование исходной ткани для исследования;

e) любые ограничения на использование производных клеток;

f) данные и их интерпретацию, полученные в результате характеристики и КК.

16 Транспортирование МСК-КМ человека

16.1 Общие положения

Необходимо соблюдать требования ИСО 20387:2018, 7.4, и ИСО 21709:2020, 5.4.4.

Биобанк обязан разработать, внедрить и задокументировать процедуры для транспортирования и обращения с МСК-КМ человека и связанных с ними данных.

Следует избегать непредусмотренного воздействия радиации в ходе перевозки.

МСК-КМ человека допускается транспортировать в виде замороженных ампул/пробирок или в виде живых культур; в любом из вариантов следует:

a) сообщить получателю дату предполагаемой отправки клеток;

b) предоставить письменные инструкции, в т. ч.:

   1) инструкции по получению МСК-КМ человека,
   2) инструкции по размораживанию и восстановлению МСК-КМ человека,
   3) инструкции по условиям вторичного хранения,
   4) требуемую среду или сыворотку,
   5) любые специальные дополнения,
   6) режим пассирования;

c) прикрепить технический паспорт клеток и копию инструкций к внешней стороне упаковки, чтобы получатель знал, что делать, прежде чем открывать ее.

Каждую замороженную ампулу/пробирку или контейнер с живой культурой (первичный контейнер) помещают в предварительно стерилизованную самоклеящуюся герметичную упаковку. На упаковку наносят следующую маркировку:

- данные о пробе;
- дату производства и окончания срока службы;
- наименование и контакты учреждения, осуществляющего биобанкинг.

16.2 МСК-КМ человека, замороженные в ампулах или криопробирках

При транспортировании на дальние расстояния МСК-КМ человека, замороженные в ампулах или криопробирках, следует перевозить помещенными в сухой лед или дьюар с жидким азотом.

Примечание 1 — Оптимальное количество сухого льда или дьюаров с жидким азотом зависит от условий транспортирования, например продолжительности.

Наружный контейнер с теплоизоляцией, например толстостенный контейнер из пенополистирола, следует использовать для перевозки ампул и/или криопробирок. Если используют наружный контейнер, его необходимо дезинфицировать, наполнить соответствующим хладоносителем (например, сухим льдом), оснастить термометром-регистратором данных для температурного контроля.

Примечание 2 — Если МСК-КМ человека оттаивают медленно, их жизнеспособность будет снижаться быстро.

Ампулы/криопробирки должны быть герметично укупорены во избежание утечки.

16.3 Живые культуры МСК-КМ человека

МСК-КМ человека можно транспортировать в виде живой культуры в питательной среде в соответствующих флаконах, обычно в течение небольшого периода, т. е. ≤ 2 ч. В таких случаях для отправки следует использовать МСК-КМ человека на средней и последней стадии кривой роста. Температура при подготовке к отправке и отгрузке должна быть ≤ 37 °C и > 2 °C.

Следует использовать как можно больше питательной среды (например, наполнять флакон питательной средой доверху).

Примечание 1 — Если среда касается крышки флакона, это может привести к контаминации.

Примечание 2 — Конфлуэнтные или сверхконфлуэнтные культуры быстрее истощают питательные среды и могут иметь тенденцию к отделению при транспортировании.

Приложение А
(справочное)

Получение мононуклеарных клеток костного мозга человека (МНК-КМ человека)

Используют только свежий костный мозг. Необходимо избегать замораживания и размораживания клеток костного мозга и выполнять все следующие шаги в стерильных условиях в вытяжном шкафу с ламинарным потоком.

a) Отбирают пробу костного мозга в соответствии с 6.4.2 или 6.4.3.

b) Разбавляют пробу костного мозга в соотношении 7:1 буфером (PBS), например 30 мл костного мозга разбавляют 5 мл буфера до конечного объема 35 мл.

c) Пропускают клетки через фильтр 100 мкм, чтобы удалить фрагменты костей и скопления клеток.

d) Осторожно наносят 35 мл разбавленной клеточной суспензии поверх 15 мл среды Ficoll-Paque в коническую пробирку вместимостью 50 мл.

e) Центрифугируют со скоростью 445*g* в течение 35 мин при температуре 20 °C в ротор-бакете без торможения.

f) Отсасывают верхний слой, оставляя слой мононуклеарных клеток нетронутым в межфазном промежутке.

g) Осторожно переносят клетки МНК-КМ человека в межфазном промежутке в новую коническую пробирку вместимостью 50 мл.

h) Промывают клетки добавлением до 40 мл буфера (PBS). Осторожно перемешивают и центрифугируют со скоростью 300*g* в течение 10 мин при температуре 20 °C. Осторожно полностью удаляют надосадочную жидкость.

i) Для удаления тромбоцитов снова суспендируют клеточный осадок в 50 мл буфера и центрифугируют со скоростью 200*g* в течение 10—15 мин при температуре 20 °C. Затем осторожно полностью удаляют надосадочную жидкость.

j) Повторно суспендируют клеточный сгусток в соответствующем количестве буфера для последующего применения.

Приложение ДА
(справочное)

Сведения о соответствии ссылочных международных стандартов национальным стандартам

Таблица ДА.1

Обозначение ссылочного международного стандарта	Степень соответствия	Обозначение и наименование соответствующего национального стандарта
ISO 8601-1	—	*
ISO 20387:2018	IDT	ГОСТ Р ИСО 20387—2021 «Биотехнология. Биобанкинг. Общие требования»
ISO 21709:2020	IDT	ГОСТ Р ИСО 21709—2024 «Биотехнология. Биобанкинг. Требования к процессу и качеству для создания, поддержания и характеристики клеточных линий млекопитающих»

* Соответствующий национальный стандарт отсутствует. До его принятия рекомендуется использовать перевод на русский язык данного международного стандарта.

Примечание — В настоящей таблице использовано следующее условное обозначение степени соответствия стандартов:

- IDT — идентичные стандарты.

Библиография

[1] ISO 20391-1:2018, Biotechnology — Cell counting — Part 1: General guidance on cell counting methods

[2] ISO/TS 20658, Medical laboratories — Requirements for collection, transport, receipt, and handling of samples

[3] ISO 21709:2020/Amd 1:2021, Biotechnology — Biobanking — Process and quality requirements for establishment, maintenance and characterization of mammalian cell lines — Amendment 1

[4] ISO/TR 22758, Biotechnology — Biobanking — Implementation guide for ISO 20387

[5] ISO/TS 22859:2022, Biotechnology — Biobanking — Requirements for human mesenchymal stromal cells derived from umbilical cord tissue

[6] ISO 35001, Biorisk management for laboratories and other related organisations

[7] CLSI H44-A2:2004, Methods for Reticulocyte Counting (Automated Blood Cell Counters, Flow Cytometry, and Supravital Dyes); Approved Guideline—Second Edition

[8] Zhou, B.O., Yue, R., Murphy, M.M., Peyer, J.G., Morrison, S.J. Leptin-receptor-expressing mesenchymal stromal cells represent the main source of bone formed by adult bone marrow. Cell Stem Cell. 2014, 15(2), pp. 154—68

[9] Ghazanfari, R., Li, H., Zacharaki, D., Lim, H.C., Scheding, S. Human Non-Hematopoietic CD271(pos)/CD140a (low/neg) Bone Marrow Stroma Cells Fulfill Stringent Stem Cell Criteria in Serial Transplantations. Stem Cells Dev. 2016, 25(21), pp. 1652—8

[10] Sacchetti, B., Funari, A., Michienzi, S., Di Cesare, S., Piersanti, S., Saggio, I. et al. Self-renewing osteoprogenitors in bone marrow sinusoids can organize a hematopoietic microenvironment. Cell. 2007, 131(2), pp. 324—36

[11] Bianco, P., Robey, P.G., Simmons, P.J. Mesenchymal stem cells: revisiting history, concepts, and assays. Cell Stem Cell. 2008, 2(4), pp. 313—9

[12] Rodriguez-Pardo, V.M., Vernot, J.P. Mesenchymal stem cells promote a primitive phenotype CD34+c-kit+ in human cord blood-derived hematopoietic stem cells during ex vivo expansion. Cell Mol. Biol. Lett. 2013, 18(1), pp. 11—33

[13] Rodriguez-Pardo, V.M., Aristizabal, J.A., Jaimes, D., Quijano, S.M., de los Reyes, I., Herrera, M.V. et al. Mesenchymal stem cells promote leukaemic cells aberrant phenotype from B-cell acute lymphoblastic leukaemia. Hematol. Oncol. Stem Cell Ther. 2013, 6(3—4), pp. 89—100

[14] Liu, Y., Holmes, C. Tissue Regeneration Capacity of Extracellular Vesicles Isolated From Bone Marrow-Derived and Adipose-Derived Mesenchymal Stromal/Stem Cells. Front. Cell Dev. Biol. 2021, 9, 648098

[15] Wang, Y.H., Wang, D.R., Guo, Y.C., Liu, J.Y., Pan, J. The application of bone marrow mesenchymal stem cells and biomaterials in skeletal muscle regeneration. Regen. Ther. 2020, 15, pp. 285—94

[16] Wilson, A., Hodgson-Garms, M., Frith, J.E., Genever, P. Multiplicity of Mesenchymal Stromal Cells: Finding the Right Route to Therapy. Front Immunol. 2019, 10, 1112

[17] Zhou, T., Yuan, Z., Weng, J., Pei, D., Du, X., He, C. et al. Challenges and advances in clinical applications of mesenchymal stromal cells. J. Hematol. Oncol. 2021, 14(1), 24

[18] Viswanathan, S., Shi, Y., Galipeau, J., Krampera, M., Leblanc, K., Martin, I. et al. Mesenchymal stem versus stromal cells: International Society for Cell & Gene Therapy (ISCT(R)) Mesenchymal Stromal Cell committee position statement on nomenclature. Cytotherapy. 2019, 21(10), pp. 1019—24

[19] Galipeau, J., Krampera, M., Barrett, J., Dazzi, F., Deans, R.J., DeBruijn, J. et al. International Society for Cellular Therapy perspective on immune functional assays for mesenchymal stromal cells as potency release criterion for advanced phase clinical trials. Cytotherapy. 2016, 18(2), pp. 151—9

[20] Mendicino, M., Bailey, A.M., Wonnacott, K., Puri, R.K., Bauer, S.R. MSC-based product characterization for clinical trials: an FDA perspective. Cell Stem Cell. 2014, 14(2), pp. 141—5

[21] Barreto-Duran, E., Mejia-Cruz, C.C., Leal-Garcia, E., Perez-Nunez, R., Rodriguez-Pardo, V.M. Impact of donor characteristics on the quality of bone marrow as a source of mesenchymal stromal cells. Am. J. Stem Cells. 2018, 7(5), pp. 114—20

[22] Mejia-Cruz, C.C., Barreto-Duran, E., Pardo-Perez, M.A., Jimenez, M.C., Rincon, J., Vanegas, K. et al. Generation of Organotypic Multicellular Spheres by Magnetic Levitation: Model for the Study of Human Hematopoietic Stem Cells Microenvironment. Int. J. Stem Cells. 2019, 12(1), pp. 51—62

[23] Henao, J.C., Grismaldo, A., Barreto, A., Rodriguez-Pardo, V.M., Mejia-Cruz, C.C., Leal-Garcia, E. et al. TRPM8 Channel Promotes the Osteogenic Differentiation in Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells. Front Cell Dev Biol. 2021, 9, 592946

[24] Drela, K., Stanaszek, L., Snioch, K., Kuczynska, Z., Wrobel, M., Sarzynska, S. et al. Bone marrow-derived from the human femoral shaft as a new source of mesenchymal stem/stromal cells: an alternative cell material for banking and clinical transplantation. Stem Cell Res. Ther. 2020, 11(1), 262

[25] Nagamura-Inoue, T., He, H. Umbilical cord-derived mesenchymal stem cells: Their advantages and potential clinical utility. World J. Stem Cells. 2014, 6(2), pp. 95—202

[26] ICCBBA. ISBT 128 Standard Technical Specification. In. PO Box 11309, San Bernardino, CA 92423-1309 USA: ICCBBA, 2009

[27] Viswanathan, S., et al. Consensus International Council for Commonality in Blood Banking Automation-International Society for Cell & Gene Therapy statement on standard nomenclature abbreviations for the tissue of origin of mesenchymal stromal cells. Cytotherapy, Dec 2021, 23(12), 1060—1063. gost.e-ecolog.ru

[28] Shuanhu Zhou, Joel S. Greenberger, Michael W. Epperly, Julie P. Goff, Carolyn Adler, Meryl S. LeBoff, Julie Glowacki. Age-related intrinsic changes in human bone-marrow-derived mesenchymal stem cells and their differentiation to osteoblasts. Aging Cell. 2008, 7, pp. 335—343

[29] Lee, S.-H., Erber, W.N., Porwit, A., Tomonaga, M., Peterson, L.C., International Council for Standardization. ICSH guidelines for the standardization of bone marrow specimens and reports. Int. J. Lab. Hematol. 2008, 30(5), pp. 349—64

[30] Pardo-Pérez, M.A., Mejía-Cruz, C.-C., Leal-García, E., Pérez-Núñez, R., Useche-Gómez, L.F., Rodríguez-Pardo, V.M. Femoral Head Bone vs Acetabular Subchondral Bone: Selecting the Optimal Anatomical Site to Obtain Mesenchymal Stromal Cells from Human Bone Marrow for Regenerative Medicine. Annals of Stem Cells and Regenerative Medicine. 2018, 1(1), 1005

[31] Wolfe, M., Pochampally, R., Swaney, W., Reger, R.L. Isolation and culture of bone marrow-derived human multipotent stromal cells (hMSCs). Methods Mol. Biol. 2008, 449, pp. 3—25

[32] Pittenger, M.F. Mesenchymal stem cells from adult bone marrow. Methods Mol. Biol. 2008, 449, pp. 27—44

[33] Beyer Nardi, N., da Silva Meirelles, L. Mesenchymal stem cells: isolation, in vitro expansion and characterization. Handb. Exp. Pharmacol. 2006, 174, pp. 249—82

[34] WHO. Laboratory biosafety manual. World Health Organization

[35] Lechanteur, C., Briquet, A., Giet, O., Delloye, O., Baudoux, E., Beguin, Y. Clinical-scale expansion of mesenchymal stromal cells: a large banking experience. J. Transl. Med. 2016, 14(1), 145

[36] Oikonomopoulos, A., van Deen, W.K., Manansala, A.R., Lacey, P.N., Tomakili, T.A., Ziman, A. et al. Optimization of human mesenchymal stem cell manufacturing: the effects of animal/xeno-free media. Sci. Rep. 2015, 5, 16570

[37] Perez-Ilzarbe, M., Diez-Campelo, M., Aranda, P., Tabera, S., Lopez, T., del Canizo, C. et al. Comparison of ex vivo expansion culture conditions of mesenchymal stem cells for human cell therapy. Transfusion. 2009, 49(9), pp. 1901—10

[38] Yang, Y.K., Ogando, C.R., Wang See, C., Chang, T.Y., Barabino, G.A. Changes in phenotype and differentiation potential of human mesenchymal stem cells aging in vitro. Stem Cell Res. Ther. 2018, 9(1), 131

[39] Shall, G., Menosky, M., Decker, S., Nethala, P., Welchko, R., Leveque, X. et al. Effects of Passage Number and Differentiation Protocol on the Generation of Dopaminergic Neurons from Rat Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells. Int. J. Mol. Sci. 2018, 19(3)

[40] Gu, Y., Li, T., Ding, Y., Sun, L., Tu, T., Zhu, W. et al. Changes in mesenchymal stem cells following long-term culture in vitro. Mol. Med. Rep. 2016, 13(6), pp. 5207—15

[41] Gruber, H.E., Somayaji, S., Riley, F., Hoelscher, G.L., Norton, H.J., Ingram, J. et al. Human adipose-derived mesenchymal stem cells: serial passaging, doubling time and cell senescence. Biotech Histochem. 2012, 87(4), pp. 303—11

[42] Jin, H.J., Bae, Y.K., Kim, M., Kwon, S.J., Jeon, H.B., Choi, S.J. et al. Comparative analysis of human mesenchymal stem cells from bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord blood as sources of cell therapy. Int. J. Mol. Sci. 2013, 14(9), pp. 17986—8001

[43] Heo, J.S., Choi, Y., Kim, H.S., Kim, H.O. Comparison of molecular profiles of human mesenchymal stem cells derived from bone marrow, umbilical cord blood, placenta and adipose tissue. Int. J. Mol. Med. 2016, 37(1), pp. 115—25

[44] Pochampally, R. Colony forming unit assays for MSCs. Methods Mol. Biol. 2008, 449, pp. 83—91

[45] Owston, H.E., Ganguly, P., Tronci, G., Russell, S.J., Giannoudis, P.V., Jones, E.A. Colony Formation, Migratory, and Differentiation Characteristics of Multipotential Stromal Cells (MSCs) from “Clinically Accessible” Human Periosteum Compared to Donor-Matched Bone Marrow MSCs. Stem Cells Int. 2019, 6074245

[46] Tormin, A., Li, O., Brune, J.C., Walsh, S., Schutz, B., Ehinger, M. et al. CD146 expression on primary nonhematopoietic bone marrow stem cells is correlated with in situ localization. Blood. 2011, 117(19), pp. 5067—77

[47] Kaveh Baghaei, Seyed Mohmoud, Samaneh Tokhanbigli, et al. Isolation, differentiation, and characterization of mesenchymal stem cells from human bone marrow. Gastroenterology and Hepatology. 2017, 10(3), pp. 208—213

[48] Pittenger, M.F., Mackay, A.M., Beck, S.C., Jaiswal, R.K., Douglas, R., Mosca, J.D. et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. Science. 1999, 284(5411), pp. 143—7

[49] Zheng, Y.H., Xiong, W., Su, K., Kuang, S.J., Zhang, Z.G. Multilineage differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells in vitro and in vivo. Exp Ther Med. 2013, 5(6), pp. 1576—80

[50] Robert, A.W., Marcon, B.H., Dallagiovanna, B., Shigunov, P. Adipogenesis, Osteogenesis, and Chondrogenesis of Human Mesenchymal Stem/Stromal Cells: A Comparative Transcriptome Approach. Front Cell Dev Biol. 2020, 8, 561

[51] Johnstone, B., Hering, T.M., Caplan, A.I., Goldberg, V.M., Yoo, J.U. In vitro chondrogenesis of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells. Exp Cell Res. 1998, 238(1), pp. 265—72

[52] Yoo, J.U., Barthel, T.S., Nishimura, K., Solchaga, L., Caplan, A.I., Goldberg, V.M. et al. The chondrogenic potential of human bone-marrow-derived mesenchymal progenitor cells. J. Bone Joint Surg Am. 1998, 80(12), pp. 1745—57

[53] Zhang, L., Su, P., Xu, C., Yang, J., Yu, W., Huang, D. Chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells: a comparison between micromass and pellet culture systems. Biotechnol Lett. 2010, 32(9), pp. 1339—46

[54] Wagner W, Wein F, Seckinger A, Frankhauser M, Wirkner U, Krause U, et al. Comparative characteristics of mesenchymal stem cells from human bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord blood. Exp Hematol. 2005, 33(11), pp. 1402—16

[55] Campioni, D., Moretti, S., Ferrari, L., Punturieri, M., Castoldi, G.L., Lanza, F. Immunophenotypic heterogeneity of bone marrow-derived mesenchymal stromal cells from patients with hematologic disorders: correlation with bone marrow microenvironment. Haematologica. 2006, 91(3), pp. 364—8

[56] Chase, L.G., Lakshmipathy, U., Solchaga, L.A., Rao, M.S., Vemuri, M.C. A novel serum-free medium for the expansion of human mesenchymal stem cells. Stem Cell Res Ther. 2010, 1(1), 8

[57] Pachon-Pena, G., Yu, G., Tucker, A., Wu, X., Vendrell, J., Bunnell, B.A. et al. Stromal stem cells from adipose tissue and bone marrow of age-matched female donors display distinct immunophenotypic profiles. J Cell Physiol. 2011, 226(3), pp. 843—51

[58] Poloni, A., Maurizi, G., Leoni, P., Serrani, F., Mancini, S., Frontini, A. et al. Human dedifferentiated adipocytes show similar properties to bone marrow-derived mesenchymal stem cells. Stem Cells. 2012, 30(5), pp. 965—74

[59] Vernot, J.P., Bonilla, X., Rodriguez-Pardo, V., Vanegas, N.P. Phenotypic and Functional Alterations of Hematopoietic Stem and Progenitor Cells in an In Vitro Leukemia-Induced Microenvironment. Int J Mol Sci. 2017, 18(2)

[60] Baberg, F., Geyh, S., Waldera-Lupa, D., Stefanski, A., Zilkens, C., Haas, R. et al. Secretome analysis of human bone marrow derived mesenchymal stromal cells. Biochim Biophys Acta Proteins Proteom. 2019, 1867(4), pp. 434—41

[61] Romanov, Y.A., Volgina, N.E., Vtorushina, V.V., Romanov, A.Y., Dugina, T.N., Kabaeva, N.V. et al. Comparative Analysis of Secretome of Human Umbilical Cord- and Bone Marrow-Derived Multipotent Mesenchymal Stromal Cells. Bull Exp Biol Med. 2019, 166(4), pp. 535—40

[62] Krampera, M., Galipeau, J., Shi, Y., Tarte, K., Sensebe, L., Therapy MSCCotISfC. Immunological characterization of multipotent mesenchymal stromal cells—The International Society for Cellular Therapy (ISCT) working proposal. Cytotherapy. 2013, 15(9), pp. 1054—61

[63] Krampera, M. Mesenchymal stromal cell 'licensing': a multistep process. Leukemia. 2011, 25(9), pp. 1408—14

[64] Kuci, S., Kuci, Z., Schafer, R., Spohn, G., Winter, S., Schwab, M. et al. Molecular signature of human bone marrow-derived mesenchymal stromal cell subsets. Sci Rep. 2019, 9(1), 1774

УДК 615.07:006.354 ОКС 07.080

Ключевые слова: биотехнология, биобанкинг, мезенхимальные стромальные клетки человека, костный мозг, МСК-КМ человека

Редактор *М.В. Митрофанова*
Технический редактор *В.Н. Прусакова*
Корректор *М.И. Першина*
Компьютерная верстка *Е.А. Кондрашовой*

Сдано в набор 27.04.2024. Подписано в печать 07.05.2024. Формат 60×84⅛. Гарнитура Ариал.
Усл. печ. л. 3,72. Уч.-изд. л. 2,97.

Подготовлено на основе электронной версии, предоставленной разработчиком стандарта

Создано в единичном исполнении в ФГБУ «Институт стандартизации»
для комплектования Федерального информационного фонда стандартов,
117418 Москва, Нахимовский пр-т, д. 31, к. 2.

gost.e-ecolog.ru gost.e-ecolog.ru