



Федеральное государственное  
бюджетное учреждение науки  
«Кировский научно-исследовательский институт  
гематологии и переливания крови  
Федерального медико-биологического агентства»

ФГБУН КНИИГиПК  
ФМБА России

СТАНДАРТ ОРГАНИЗАЦИИ

Иммунофенотипирование мезенхимальных стромальных клеток

**РАЗРАБОТАЛ:**

Старший научный сотрудник  
лаборатории клеточной и молекулярной иммунологии

дата 09.11.18 подпись Исаева Н.В. Исаева

**СОГЛАСОВАЛИ:**

Заведующий  
лабораторией клеточной и молекулярной иммунологии

дата 09.11.18 подпись Назарова Е.Л. Назарова

Заведующий лабораторией клеточных технологий

дата 09.11.18 подпись Ветошкин К.А. Ветошкин

Заместитель директора по научной работе

дата 09.11.18 подпись Рылов А.В. Рылов

Заместитель директора по лечебной работе

дата 09.11.18 подпись Минаева Н.В. Минаева

Начальник отдела обеспечения качества

дата 09.11.2018 подпись Калинина Е.Н. Калинина

**УТВЕРДИЛ:**

Директор

дата 12.11.2018 подпись И.В. Парамонов И.В. Парамонов

СТО-КДЛ-25-014

Дата введения: 12.11.2018

Дата пересмотра: 12.11.2023

Версия 1

С. 1/15

ОРИГИНАЛ < экземпляр №1

Место для штампа

**ВНИМАНИЕ!**

Этот документ разрешен к использованию до вступления в силу следующей версии.  
Использование отмененных или устаревших документов запрещается.  
Ответственность по проверке действительности данного документа  
перед каждым его использованием возлагается на пользователя.

**ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ**

Настоящий документ разработан и предназначен для пользования работниками  
ФГБУН КНИИГиПК ФМБА России.  
Пользователь документа не имеет права передавать документ лицам,  
не являющимся работниками ФГБУН КНИИГиПК ФМБА России.

ФГБУН КНИИГиПК ФМБА России	СТО-КДЛ-25-014	Версия 1
«Имунофенотипирование мезенхимальных стромальных клеток»		Стр. 2 из 15

## Предисловие

Сведения о стандарте

1. Разработан Федеральным государственным бюджетным учреждением науки «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови Федерального медико-биологического агентства» (ФГБУН КНИИГиПК ФМБА России).

Директор – д.м.н. И.В. Парамонов

Заместитель директора по научной работе – д.м.н. А.В. Рылов

2. Исполнители:

старший научный сотрудник лаборатории клеточной и молекулярной иммунологии – к.б.н. Н.В. Исаева,

лаборант-исследователь лаборатории клеточной и молекулярной иммунологии – Ю.С. Береснева.

ФГБУН КНИИГиПК ФМБА России	СТО-КДЛ-25-014	Версия 1
«Имунофенотипирование мезенхимальных стромальных клеток»		Стр. 3 из 15

## Содержание

1 Область применения.....	4
2 Нормативные ссылки.....	4
3 Термины и определения.....	5
4 Обозначения и сокращения.....	5
5 Основная часть.....	5
5.1 Общие положения.....	5
5.2. Перечень оборудования, расходных материалов, реактивов.....	6
5.3 Подготовка протокола исследования.....	7
5.4 Приемка образца в лаборатории, пробоподготовка, проведение имунологических реакций.....	8
5.5 Анализ результатов реакции.....	9
6 Список литературы .....	10
7 История документа .....	10
Приложение А Протокол иммунофенотипической оценки мезенхимальных стромальных клеток.....	11
Приложение Б Журнал регистрации результатов определения иммунофенотипа мезенхимальных стромальных клеток.....	12
Приложение В Иммунофенотипирование клеточного материала (лист 2 Паспорта мезенхимальных стромальных клеток).....	13
Лист ознакомления.....	14
Лист рассылки.....	15

ФГБУН КНИИГиПК ФМБА России	СТО-КДЛ-25-014	Версия 1
«Имунофенотипирование мезенхимальных стромальных клеток»		Стр. 4 из 15

## 1 ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ

1.1 Настоящий Стандарт организации устанавливает обязательные требования к лабораторным методическим подходам, позволяющим оценить иммунофенотип мезенхимальных стромальных клеток (далее – МСК) и получить данные, необходимые для их паспортизации.

1.2 Настоящий стандарт подготовлен в соответствии с известными иммунофенотипическими характеристиками мезенхимальных стромальных клеток, получаемых методом культивирования.

1.3 Стандарт разработан для качественной и количественной характеристики биомедицинского клеточного продукта, содержащего мезенхимальные стромальные клетки, и может быть использован для расширения методической базы при проведении научных разработок в области онкогематологии и трансплантологии.

1.4 Анализу подлежат ядродержащие клеточные элементы культур, полученные в искусственных условиях.

1.5 Тестируемые клетки исследуются в лаборатории клеточной и молекулярной иммунологии как в нативном виде, так и после хранения в замороженном состоянии и оттаивания.

## 2 НОРМАТИВНЫЕ ССЫЛКИ

2.1 Настоящий документ разработан на основании следующих нормативных актов и документов

- ГОСТ Р ИСО 15189-2009 «Лаборатории медицинские. Частные требования к качеству и компетентности»;

- ГОСТ Р ИСО 15198-2009 «Клиническая лабораторная медицина. Изделия медицинские для диагностики *in vitro*. Подтверждение методик контроля качества, рекомендуемых изготовителями пользователям»;

- ГОСТ Р 50444-92 «Приборы, аппараты и оборудование медицинские. Общие технические условия»;

- ГОСТ Р 52905-2007 «Лаборатории медицинские. Требования безопасности»;

- ГОСТ Р 53022.1-2008 «Технологии лабораторные клинические. Требования к качеству клинических лабораторных исследований. Часть 1. Правила менеджмента качества клинических лабораторных исследований»;

- ГОСТ Р 53022.2-2008 «Технологии лабораторные клинические. Требования к качеству клинических лабораторных исследований. Часть 2. Оценка аналитической надежности методов исследования (точность, чувствительность, специфичность)»;

- ГОСТ Р 53022.3-2008 «Технологии лабораторные клинические. Требования к качеству клинических лабораторных исследований. Часть 3. Правила оценки клинической информативности лабораторных тестов»;

- ГОСТ Р 53079.1-2008 «Технологии лабораторные клинические. Обеспечение качества клинических лабораторных исследований. Часть 1. Правила описания методов исследований»;

- ГОСТ Р 53079.2-2008 «Технологии лабораторные клинические. Обеспечение качества клинических лабораторных исследований. Часть 2. Руководство по управлению качеством в клиничко-диагностической лаборатории. Типовая модель»;

ФГБУН КНИИГиПК ФМБА России	СТО-КДЛ-25-014	Версия 1
«Иммунофенотипирование мезенхимальных стромальных клеток»		Стр. 5 из 15

- ГОСТ Р 53079.4-2008 «Технологии лабораторные клинические. Обеспечение качества клинических лабораторных исследований. Часть 4. Правила ведения преаналитического этапа»;

- ГОСТ 25336-82 «Посуда и оборудование лабораторные стеклянные. Типы, основные параметры и размеры»;

- ГОСТ 28311-89 «Дозаторы медицинские лабораторные. Общие технические требования и методы испытаний»;

- ГОСТ 6709-72 «Вода дистиллированная. Технические условия»;

- Федеральным законом Российской Федерации от 26 июня 2016 года № 180-ФЗ «О биомедицинских клеточных продуктах».

- Федеральным законом Российской Федерации от 26.06.2016 № 180-ФЗ «О биомедицинских клеточных продуктах» (ред. от 03.08.2018).

2.2 При пользовании настоящим Документом целесообразно проверить действие ссылочных документов на территории России по соответствующим информационным указателям, опубликованным в текущем году.

### 3 ТЕРМИНЫ И ОПРЕДЕЛЕНИЯ

3.1 В настоящем Документе применены следующие термины с соответствующими им определениями:

**гейтинг** – логически ограниченная зона клеток с определенными характеристиками на гистограммах распределения клеток по морфологическим или флуоресцентным параметрам;

**проточная цитофлуориметрия** – современная технология быстрого измерения характеристик клеток при помощи моноклональных антител или других зондов, позволяющая судить об их типе и их функциональном состоянии;

**флуоресценция** – испускание света определенной длины волны, возбужденное светом с меньшей длиной волны, за счет окрашивания клетки специальными красителями.

### 4 ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ

4.1 В настоящем Документе применены следующие обозначения и сокращения:

- CD – кластер дифференцировки (cluster of differentiation);

- FITC – флуорохром флуоресцеинизотиоцианат (fluorescein isothiocyanate);

- FL (1-4) – детектор испускаемой флуоресценции с указанием номера канала;

- FSC – прямое (малоугловое) светорассеяние (forward scatter channel);

- MSC – название региона целевых мезенхимальных стромальных клеток при цитометрировании;

- PE – флуорохром фикоэритрин (phycoerythrin);

- PE-Cy7 – флуорохром фикоэритрин-цианин 7 (phycoerythrin-cyanine 7);

- PerCP-Cy5.5 – перидин-хлорофилл протеин 5.5 (peridine-chlorophyll protein 5.5);

- SSC – боковое светорассеяние (side scatter channel);

- БСА – бычий сывороточный альбумин;

- ГОСТ – государственный стандарт;

- МКА – моноклональные антитела;

- МСК – мезенхимальная стромальная клетка;

- ФСБ – фосфатно-солевой буфер.

### 5 ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

#### 5.1 Общие положения

ФГБУН КНИИГиПК ФМБА России	СТО-КДЛ-25-014	Версия 1
«Иммунофенотипирование мезенхимальных стромальных клеток»		Стр. 6 из 15

5.1.2 При тестировании клеточного материала методом лазерной проточной цитофлуориметрии используют изделия медицинского назначения (оборудование, расходные материалы), зарегистрированные в установленном порядке и разрешенные к применению на территории Российской Федерации.

5.1.3 При поступлении партии изделий медицинского назначения проверяют наличие и правильность заполнения сопроводительных документов: товарно-транспортной накладной, копии регистрационного удостоверения, паспорта производителя или аналогичного документа, сертификата соответствия или декларации о соответствии (при необходимости).

5.1.4 Срок эксплуатации оборудования не должен превышать ресурс, установленный производителем. Оборудование должно проходить регулярное техническое обслуживание, а средства измерения должны поверяться.

5.1.5 Санитарная подготовка помещений и оборудования, применяющегося на всех этапах реализации метода, включает текущую уборку, проводимую ежедневно до начала работы и после завершения технологических операций, и генеральную уборку в соответствии с графиком. Для уборки и дезинфекции используют разрешенные к применению дезинфицирующие средства, обеспечивая их регулярное чередование.

5.1.6 При выполнении всех этапов метода все манипуляции осуществляют с использованием средств индивидуальной защиты.

5.1.7 Все исполнители инструктируются о безопасном и правильном пользовании реактивами, расходными материалами, общелабораторным и специализированным оборудованием, обращении с клеточным материалом. В качестве исполнителей всех этапов данного метода не могут привлекаться лица моложе 18 лет.

5.1.8 Лаборатория клеточной и молекулярной иммунологии, задействованная в реализации метода, должна принимать участие в Федеральной системе внешней оценки качества по разделу «Проточная цитометрия».

5.1.9 Учреждение (лаборатория), проводящая исследования, должна обеспечить конфиденциальность результатов исследований в рамках принятых ею обязательств и в соответствии с законодательством Российской Федерации.

## **5.2. Перечень оборудования, расходных материалов, реактивов**

### **5.2.1 Оборудование**

5.2.1.1 Двухлазерный проточный цитофлуориметр «BD FACS Canto II» с принадлежностями, рассчитанный на экстинкцию света с длинами волн 488 нм и 635 нм, позволяющий вести анализ клеток одновременно по 4 параметрам флуоресценции.

5.2.1.2 Программа «BD FACS Diva» версии 6,0 и выше, установленная на цитофлуориметре.

5.2.1.3 Источник бесперебойного питания для подсоединения цитофлуориметра к сети электропитания.

5.2.1.4 Кондиционер воздуха для поддержания температуры в помещении не более 25°C.

5.2.1.5 Общелабораторное оборудование:

- холодильное оборудование медицинское «SANYO» для хранения крови, компонентов крови, лекарственных средств и вакцин;

ФГБУН КНИИГиПК ФМБА России	СТО-КДЛ-25-014	Версия 1
«Иммунофенотипирование мезенхимальных стромальных клеток»		Стр. 7 из 15

- поверенные микропипетки автоматические для дозирования объемов жидкостей 100 мкл, от 0,5 до 50 мкл, от 100 до 1000 мкл;
- штатив для цитометрических пробирок;
- штативы для наконечников от 0,5 до 250 мкл, от 200 до 1000 мкл;
- смеситель медицинский типа «вортекс»;
- таймер лабораторный.

### 5.2.2 Расходные материалы

- наконечники на объем жидкостей на 0,5-200 мкл нестерильные без фильтров для дозаторов пипеточных;
- наконечники на объем жидкостей на 0,5-200 мкл нестерильные без фильтров для дозаторов пипеточных;
- пробирки пластиковые цитометрические.

### 5.2.3 Реактивы

#### 5.2.3.1 Реактивы, необходимые для функционирования цитофлуориметра:

- набор частиц для настройки базовой линии цитофлуориметра и мониторинга состояния прибора;
- компенсационные частицы;
- буферный раствор для разбавления гранул;
- проточная жидкость BD FACS Flow;
- чистящий раствор BD FACSClean;
- раствор для выключения BD FACS shutdown solution;
- едкий раствор для резервуара для отходов;
- вода для инъекций, растворитель для приготовления лекарственных форм для инъекций;
- фосфатно-солевой буфер (ФСБ) таблетированный;
- бычий сывороточный альбумин (БСА) сухой.

#### 5.2.3.2 Реактивы, используемые в иммунологических реакциях:

- конъюгаты моноклональных антител (иммуноглобулинов определенного изотипа) с флуорохромами: FITC, PE, PerCP, APC.
- конъюгаты моноклональных антител к «позитивным» клеточным маркерам МСК с флуорохромами: CD90-FITC, CD44-PE; CD105-PerCP-Cy5.5; CD73-APC;
- конъюгаты моноклональных антител к «негативным» клеточным маркерам МСК с флуорохромами: HLA-DR-FITC, CD34-PE, CD45-PerCP-Cy5.5, CD117-APC.

## 5.3 Подготовка протокола исследования

5.3.1 Пользуясь методами и средствами программного обеспечения лазерного проточного цитофлуориметра, создают шаблон исследования. Задействуют следующие каналы детекции:

- прямого светорассеяния (FSC),
- бокового (малоуглового) светорассеяния (SSC),
- четырех каналов флуоресценции (FL), рассчитанных на эмиссию света с длинами волн 519 нм, 578 нм, 678 нм и 785 нм.

5.3.2 Каналам детекции присваиваются определенные имена, согласно используемым флуорохромам.

#### 5.3.3 Создаются 8 графиков (Приложение А к настоящему Стандарту):

- № 1: FSC – по оси X, SSC – по оси Y;

ФГБУН КНИИГиПК ФМБА России	СТО-КДЛ-25-014	Версия 1
«Имунофенотипирование мезенхимальных стромальных клеток»		Стр. 8 из 15

- № 2: FL1-FITC – по оси X, FL3-PerCP-Cy5.5 – по оси Y;
- № 3: FL1-FITC – по оси X, FL5-APC – по оси Y;
- № 4: FL1-FITC – по оси X, FL2-PE – по оси Y;
- № 5: FL1-FITC – по оси X, число событий (Count) – по оси Y;
- № 6: FL2-PE – по оси X, число событий (Count) – по оси Y;
- № 7: FL3-PerCP-Cy5.5 – по оси X, число событий (Count) – по оси Y;
- № 8: FL4-APC – по оси X, FL2- число событий (Count) – по оси Y.

5.3.4 На графике 1 вычерчивается полигональный регион, объединяющий клетки с малыми размерами и с низким и средним значениями гранулярности, региону присваивают имя «MSC».

5.3.5 На графиках 2, 3, 4 – квадратичный регион.

5.3.6 На графиках 5,6,7,8 наносится линейный регион.

5.3.7 Должен быть выполнен гейтинг оцениваемых клеток с учетом следующей иерархии:

- график № 1 отражает все события образца, прошедшие через проточную ячейку;
- графики №№ 2 – 8 отражают все события, попадающие в регион MSC.

5.3.8 Количество собираемых событий (клеточных элементов) устанавливается на уровне 20000.

5.3.9 Устанавливаются необходимые параметры статистики.

5.3.10 Проточный цитофлуориметр должен быть настроен:

- базовую линию прибора настраивают при поступлении новой партии искусственных флуоресцентных частиц;
- базовую линию прибора проверяют для используемой конфигурации, осуществляют 1 раз в неделю;
- компенсации флуоресцентных сигналов настраивают не реже 1 раза в неделю;
- линейные регионы позитивности устанавливают на основании графиков флуоресценции, получаемых при окрашивании клеток конъюгатами моноклональных антител (иммуноглобулинов определенного изотипа) с флуорохромами.

5.3.11 Формируют папку, включающую данные анализа тестируемых МСК. Папке присваивают имя, позволяющее легко идентифицировать результаты. При иммунофенотипическом контроле МСК в папке должны содержаться данные о результатах, полученных в следующих постановках:

- экспрессия на клетках иммуноглобулинов, совпадающих по изотипу с таковым у используемых моноклональных антител к исследуемым маркерам,
- экспрессия на клетках «позитивных» маркеров CD90, CD44, CD105, CD73,
- экспрессия на клетках «негативных» маркеров HLA-DR, CD34, CD45, CD117.

#### 5.4 Приемка образца в лаборатории, пробоподготовка, проведение иммунологических реакций

5.4.1 Выполняют приемку образца МСК-содержащего продукта, полученного методом культивирования



ФГБУН КНИИГиПК ФМБА России	СТО-КДЛ-25-014	Версия 1
«Иммунофенотипирование мезенхимальных стромальных клеток»		Стр. 9 из 15

- Во избежание адгезии анализируемых клеток к поверхности пластика и искажения результатов анализа, образец должен быть доставлен в лабораторию в закрытой стеклянной пробирке.

- Минимальный объем пробы, поступающей на иммунофенотипический анализ, должен составлять не менее 500 мкл.

- Оптимальная концентрация клеток в образце составляет  $5,0 \times 10^6$ /мл; концентрация клеток в анализируемом образце должна быть не менее  $2,0 \times 10^6$ /мл.

5.4.2 В качестве ресуспендирующего раствора для МСК не допустимо использовать готовые питательные среды, содержащие феноловый красный. Приемлемыми для использования считаются следующие растворы для ресуспендирования МСК:

- 0,9% раствор натрия хлорида, фосфатно-солевой буферный раствор (в том числе с добавлением 1 % БСА или 2% эмбриональной телячьей сыворотки),

- 6% полиглокин,

- раствор Дульбекко.

5.4.3 Иммунологические реакции проводят в пластиковых цитометрических пробирках.

5.4.4 Пробирки этикетируют, указывая фамилию донора и специфичности используемых конъюгатов антител с флуорохромами.

5.4.5 Следят за тем, чтобы работа с конъюгатами антител с флуорохроми и с образцами, обработанными этими реактивами, проходила в условиях неяркого освещения.

5.4.6 В цитометрические пробирки вносят сначала все конъюгаты антител, затем – клеточный образец. Моноклональные антитела вносят в объеме, соответствующем требованиям инструкций. Для постановки каждой иммунологической реакции необходимо использовать 100 мкл образца с оптимальной концентрацией клеток.

5.4.7 Пробирки встряхивают, используя медицинский смеситель, затем окрашенные образцы инкубируют в течение 30 минут при температуре не выше 25 °С.

5.4.8 Следят за тем, чтобы на инкубирование проходило в условиях темноты.

5.4.9 По завершении иммунологического связывания однократно обрабатывают образцы в ресуспендирующем растворе:

- встряхивают образцы с использованием медицинского смесителя,

- добавляют в 500 мкл ресуспендирующего раствора,

- встряхивают образцы с использованием медицинского смесителя.

## 5.5 Анализ результатов реакции

5.5.1 Результаты реакции оцениваются с использованием лазерного проточного цитофлуориметра, оснащенного источником света с длинами волн 488 нм и 635 нм.

5.5.2 Включение прибора, его подготовка к работе, эксплуатация и выключение осуществляется в соответствии с требованиями стандартной операционной процедуры и инструкции по охране труда сотрудников лаборатории.

5.5.3 Должно быть выполнено сохранение полученных данных:

ФГБУН КНИИГиПК ФМБА России	СТО-КДЛ-25-014	Версия 1
«Имунофенотипирование мезенхимальных стромальных клеток»		Стр. 10 из 15

- используя методы и средства программного обеспечения прибора, проводят запись данных в файл;

- на бумажном носителе в «Журнале регистрации результатов определения иммунофенотипа мезенхимальных стромальных клеток» (Приложение Б к настоящему Документу) для каждой пробирки фиксируют процент клеток, экспрессирующих оцениваемые клеточные детерминанты.

5.5.4 Результат иммунофенотипирования формируется на бланке (Приложение В).

## 6 Список литературы

6.1 Bühring HJ, Battula VL, Treml S, Schewe B, Kanz L, Vogel W. Novel markers for the prospective isolation of human MSC. *Ann N Y Acad Sci.* 2007; 1106:262-271. (Biology: Flow cytometry).

6.2 Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, et. al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy.* 2006; 8(4):315-317. (Biology: Flow cytometry).

6.3 Horwitz EM, Le Blanc K, Dominici M, et. al. Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy.* 2005; 7(5):393-395. (Biology).

6.4 Kern S, Eichler H, Stoeve J, Kalter H, Bieback K. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. *Stem Cells.* 2006; 24(5):1294-1301. (Biology: Flow cytometry).

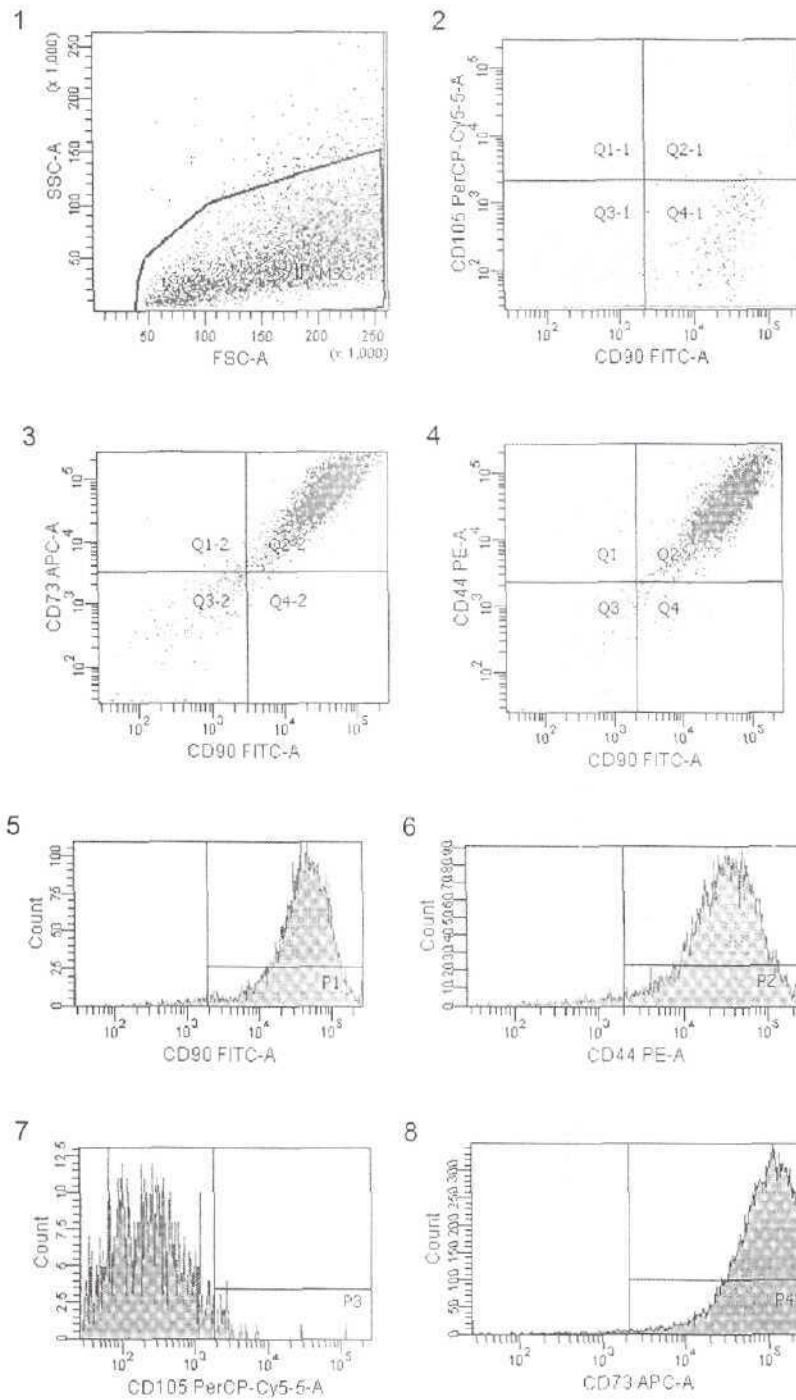
6.5 Sanchez L, Gutierrez-Aranda I, Ligeró G, et al. Enrichment of Human ESC-Derived Multipotent Mesenchymal Stem Cells with Immunosuppressive and Anti-Inflammatory Properties Capable to Protect Against Experimental Inflammatory Bowel Disease. *Stem Cells.* 2010; 29(2):251-262. (Biology: Cell differentiation).

## 7 История документа

Дата введения в действие	Версия	Описание обновления	Фамилия, инициалы разработчика
	1	Введено в действие впервые	Н.В. Исаева

Приложение А

Протокол иммунофенотипической оценки  
мезенхимальных стромальных клеток





ФГБУН КНИИГиПК ФМБА России	СТО-КДЛ-25-014	Версия 1
«Имунофенотипирование мезенхимальных стромальных клеток»		Стр. 13 из 15

### Приложение В

#### Имунофенотипирование клеточного материала (лист 2 Паспорта мезенхимальных стромальных клеток)

Показатель (клеточная детерминанта)	Содержание позитивных клеток (%)	Нормативные значения для трансплантационного материала, содержащего МСК (%)
CD34	0,1 %	≤ 5 %
CD45	0,4 %	≤ 5 %
CD44	99,4 %	≥ 70%
CD73	98,7 %	≥ 95 %
CD90	99,8 %	≥ 95 %
CD105	94,2 %	≥ 95 %
HLA-DR	0,2 %	≤ 5 %
CD117	0,3 %	≤ 5 %