

БАЛТИЙСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ им. ИММАНУИЛА КАНТА

А. Г. Гончаров, В. В. Шуплецова, Л. С. Литвинова

ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ  
КЛЕТОЧНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ

ЧАСТЬ 1

Учебно-методическое пособие

Издательство  
Балтийского федерального университета им. Иммануила Канта  
2023

УДК 576.36(075.8)

ББК 28.05я73

Г657

*Рецензенты*

*А. С. Симбирцев*, д-р мед. наук, проф.,

чл.-корр. РАН, научный руководитель ФГУП

«Государственный НИИ особо чистых биопрепаратов» ФМБА России;

*И. А. Хлусов*, д-р мед. наук, проф., проф. кафедры морфологии

и общей патологии, руководитель лаборатории клеточных

и микрофлюидных технологий ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России

**Гончаров, А. Г.**

Г657 Теоретические основы клеточных технологий. Часть 1 : учебно-методическое пособие / А. Г. Гончаров, В. В. Шуплецова, Л. С. Литвинова ; под ред. Л. С. Литвиновой. — Калининград : Издательство БФУ им. И. Канта, 2023. — 95 с. ISBN 987-5-9971-0790-1

Освещаются вопросы нормативно-правового регулирования обращения биомедицинских клеточных продуктов в РФ, подробно рассмотрены и систематизированы алгоритмы организации работ с клеточными культурами. Описаны методологические основы проведения культуральных работ. Приведен подробный список нормативно-правовых актов, регламентирующих порядок работ с культурами клеток в РФ.

Разработано в соответствии с учебным планом магистерской программы «Клеточные и молекулярные технологии», учебным планом специалитета «Биоинженерия и биоинформатика» и предназначено для студентов, магистров, аспирантов биологических специальностей, специализирующихся в области клеточных технологий.

УДК 576.36(075.8)

ББК 28.05я73

© Гончаров А. Г., Шуплецова В. В.,  
Литвинова Л. С., 2023

© БФУ им. И. Канта, 2023

ISBN 978-5-9971-0790-1

## ОГЛАВЛЕНИЕ

<b>Введение</b> .....	4
<b>Глава 1.</b> Нормативно-правовое регулирование обращения биомедицинских клеточных продуктов в РФ .....	6
<b>Глава 2.</b> Организация работ с клеточными культурами .....	10
2.1. Основное оборудование и расходные материалы для культуральных работ .....	10
2.2. Санитарно-гигиенические требования к проведению биотехнологических экспериментов .....	27
2.3. GLP (Good Laboratory Practice) — надлежащая лабораторная практика .....	46
2.4. Чистые помещения .....	56
2.5. Асептика и антисептика в культуральных работах .....	60
2.6. Культуральные среды, ростовые факторы .....	71
2.7. Стерилизация материала .....	77
<b>Список рекомендуемой литературы</b> .....	89

## ВВЕДЕНИЕ

Широкое внедрение клеточных культур в качестве экспериментальных моделей для скрининга лекарственных веществ, культивирования вирусов, использование клеточных линий для терапии ряда социально-значимых заболеваний и др. вызвало к жизни интенсивное развитие относительно нового направления медико-биологических исследований — культивирование клеток человека, животных и растений. Выделение и поддержание жизнеспособных чистых линий клеток требует не только применения дорогостоящих реактивов и оборудования, но и глубоких системных знаний от исследователя в области клеточной и молекулярной биологии, химии и иммунологии, а также умения работать на современном лабораторном оборудовании с соблюдением всех норм и правил асептики.

В целом специалиста в области культивирования клеток можно охарактеризовать как ученого, обладающего высокой культурой лабораторной работы. Однако подготовка такого рода высококвалифицированных профессионалов затруднена крайне малым количеством специальной учебно-методической литературы по этому направлению. Настоящее учебное пособие призвано в определенной степени заполнить этот пробел. Авторы предприняли попытку собрать и обобщить накопленный за 15 лет опыт работы в области клеточных технологий, преподавания этой дисциплины в магистратуре БФУ им. И. Канта. В первой (теоретической) части учебного пособия приведены нормативно-правовые акты, регулирующие обращение клеточных продуктов в РФ, освещены вопросы организации работ с клеточными культурами. Вторая (практическая) часть посвящена непосредственно методологическим основам культуральных работ, методам выделения целевых клеток, ведению и оценке качества клеточных культур, тестированию на культурах клеток биоматериалов и лекарственных веществ. Не претендуя на

исчерпывающую полноту освещения вопросов клеточных технологий, авторы будут благодарны читателям за высказанные замечания и пожелания.

Учебно-методическое пособие подготовлено по итогам выполнения научно-исследовательских работ, реализованных в рамках Государственного задания (№FZWM-2020-0010).

## **Глава 1**

### **НОРМАТИВНО-ПРАВОВОЕ РЕГУЛИРОВАНИЕ ОБРАЩЕНИЯ БИМЕДИЦИНСКИХ КЛЕТОЧНЫХ ПРОДУКТОВ В РФ**

Развитие клеточной и молекулярной биологии привело специалистов к мысли о применении клеток (клеточных продуктов) для лечения широкого спектра заболеваний человека. Эмпирические попытки переливания крови в XVII—XIX вв., после открытия К. Ландштейнером в XX в. групп крови, достижения иммунологии и трансплантологии создали серьезную научную основу для такого рода практик. В настоящее время терапия клетками уверенно занимает свое место в сфере высокотехнологичной медицинской помощи. Применение новых сложных и/или уникальных методов лечения с научно доказанной эффективностью ведет к возникновению общественных отношений, требующих регулирования как минимум в двух областях: сфере безопасности, обращения биомедицинских клеточных продуктов (БМКП) и донорства биологического материала, связанного с производством БМКП.

Принятый в 2016 г. Федеральный закон №180 «О биомедицинских клеточных продуктах» (ФЗ-180) призван обеспечить российских ученых и производителей юридическим регулированием, позволяющим в правовом поле разрабатывать и производить лекарственные средства на основе клеточных продуктов. ФЗ-180 достаточно объемный документ, включающий в себя 49 статей, регулирующих все этапы обращения БМКП.

В ст. 1 зафиксирован предмет регулирования ФЗ-180 — закон регулирует отношения, возникающие в связи с разработкой, доклиническими исследованиями, клиническими исследованиями, экспертизой, государственной регистрацией, производством, контролем качества, реализацией, применением, хранением, транспортировкой, ввозом в Российскую Федерацию, вывозом из Российской Федерации, уничтожением биомедицинских клеточных продуктов, предназначенных для

профилактики, диагностики и лечения заболеваний или состояний пациента, сохранения беременности и медицинской реабилитации пациента (далее — обращение биомедицинских клеточных продуктов), а также регулирует отношения, возникающие в связи с донорством биологического материала в целях производства биомедицинских клеточных продуктов. В статье подчеркивается, что его действие не распространяется на отношения, возникающие при разработке и производстве лекарственных средств и медицинских изделий, донорстве органов и тканей человека в целях их трансплантации (пересадки), донорстве крови и ее компонентов, при использовании половых клеток человека в целях применения вспомогательных репродуктивных технологий, а также на отношения, возникающие при обращении клеток и тканей человека в научных и образовательных целях.

Важным разделом закона является ст. 2, в которой отражены основные понятия, касающиеся БМКП, что не всегда встречается в нашем законодательстве. Принятие единой, общепринятой, закреплённой терминологической базы позволяет исследователям, врачам, юристам и производителям говорить на одном языке, служит залогом развития этого направления.

Статьи 3—7 посвящены описанию требований к источнику клеточных линий, приготовлению клеточных линий, разработке и регламенту доклинических испытаний БМКП.

В ст. 10—19 прописаны порядок, организация и требования государственной экспертизы БМКП (в том числе этической — ст. 14), что является необходимым этапом для процедуры государственной регистрации клеточного продукта (ст. 8, 9, 20—27).

Статьи 28—34 посвящены проведению клинических испытаний БМКП, в них отражены формы и организация клинических испытаний, права и порядок страхования жизни и здоровья добровольцев, участвующих в клинических испытаниях; отдельно прописаны порядок получения биологического материала от донора, его права и обязанности. Отдельно в ст. 48 зафиксирован порядок возмещения вреда, причиненного здоровью граждан в результате применения БМКП.

В ст. 35—37 описаны требования к регламенту производства БМКП и реализации клеточного продукта, требования к

маркировке, транспортировке и хранению БМКП, уничтожению невостребованных БМКП и исходных продуктов для его приготовления. Четыре статьи указанного закона описывают особенности применения БМКП при оказании медицинской помощи (ст. 39), четко регламентируют порядок размещения информации о БМКП — в источниках, предназначенных только для профессионального сообщества (ст. 40), описывают мониторинг безопасности применения БМКП (ст. 41) и порядок приостановки применения клеточного продукта (ст. 42).

Статьи 43 и 44 определяют порядок ввоза и вывоза БМКП на территорию Российской Федерации, оговаривают круг юридических лиц, которым разрешено этим заниматься. Заключительные статьи закона «О биомедицинских клеточных продуктах» посвящены порядку вступления в силу закона, описывается система взаимодействия федеральных исполнительных органов власти в области контроля за обращением БМКП; отмечается, что нарушение закона влечет за собой наступление ответственности в соответствии с законодательством РФ.

ФЗ «О биомедицинских клеточных продуктах» является основным документом, регулирующим обращение БМКП. Со вступлением этого документа в действие, к сожалению, не произошло существенного роста разработок клеточных лечебных продуктов. Фактически на данный момент в РФ идут клинические испытания единственного зарегистрированного биомедицинского клеточного продукта, предназначенного для восстановления дефектов хряща коленного сустава. По-видимому, закон нуждается в серьезной доработке и пересмотре ряда его положений с обязательным участием профессионального сообщества.

Принятые после 2017 г. более 40 подзаконных актов (постановлений Правительства РФ и приказов Минздрава и Росздравнадзора РФ: Приказ Минздрава России от 27.03.2018 г. №125н «Об утверждении порядка медицинского обследования донора биологического материала и перечня противопоказаний (абсолютных и относительных) для получения биологического материала», Приказ Росздравнадзора от 02.08.2018 г. №5072 «Об утверждении порядка проведения мониторинга безопасности биомедицинских клеточных продуктов», Приказ Минздрава



России от 08.08.2018 г. №512н «Об утверждении Правил надлежащей практики по работе с биомедицинскими клеточными продуктами», Постановление Правительства РФ от 03.10.2018 г. №1184 «Об утверждении Положения о лицензировании деятельности по производству биомедицинских клеточных продуктов» (ред. от 01.11.2021), Постановление Правительства РФ от 30.06.2021 г. №1062 «О федеральном государственном контроле (надзоре) в сфере обращения биомедицинских клеточных продуктов» и др.) не вызвали прорывного развития технологий и производства клеточных продуктов в этом направлении. Наличие понятного и системного правового поля позволит специалистам разрабатывать и внедрять новые технологии использования клеточных продуктов в лечебных целях, тогда как его отсутствие или, напротив, избыточное регламентирование может привести к регрессу в исследуемой области.

## Глава 2

### ОРГАНИЗАЦИЯ РАБОТ С КЛЕТОЧНЫМИ КУЛЬТУРАМИ

#### 2.1. Основное оборудование и расходные материалы для культуральных работ

В настоящем разделе приведены сведения об основном и вспомогательном оборудовании, применяемом для проведения культуральных работ.

##### *Лабораторный пластик*

Современные производители медицинских пробирок, планшетов, флаконов, чашек Петри и др. при производстве в основном используют два материала — пластик и лабораторное стекло. Пластик считается более предпочтительным материалом для производства пробирок, чем стекло, по следующим причинам: он легче стекла, менее травмоопасен (пробирки из него не бьются), а также его проще утилизировать в условиях научных и лечебно-профилактических учреждений, они обеспечивают полную безопасность при проведении исследований.

**Пластиковая лабораторная посуда** — это посуда, которая изготавливается из промышленных полимерных материалов (полистирол прозрачный, полипропилен, полиэтилен и пр.), наделенных соответствующими свойствами для работы в лабораторных условиях.

Многие химические реагенты (кислоты и щелочи) допускаются к хранению лишь в пластиковой таре. Лабораторная посуда из пластика значительно легче, чем стеклянная. Она бывает как многоразового, так и одноразового использования, что позволяет отказаться от очистки посуды от реагентов после эксперимента. С помощью пластиковых сосудов легче соблюдать стерильные условия в процессе эксперимента, они более гигиеничны и удобны в эксплуатации, чем их стеклянные аналоги.

Материалом для изготовления пластиковой посуды служат полипропилен, полистирол, полиэтилен и полиэтилен.

**Полипропилен** — из него изготовлены в том числе центрифужные и криопробирки. Обладает хорошей прозрачностью, сохраняет свои свойства в диапазоне температур от  $-196$  до  $+145^{\circ}\text{C}$  и выдерживает физические и химические воздействия благодаря пластичности и инертности материала.

**Полистироловые** пробирки в основном используются как одноразовые емкости для краткосрочного хранения материала. Они должны иметь высокую прозрачность, гладкую внутреннюю поверхность, строго определенные размеры и объемы. Полистирол выдерживает температуру от  $-20$  до  $+60^{\circ}\text{C}$ , поэтому не может быть стерилизован термическими и химическими методами.

**Полиэтилен** используется для изготовления бактериальных чашек Петри, пластиковых пипеток, центрифужных пробирок. Он не выдерживает фенол, хлороформ, DMSO, DMFA.

**Полиэтилен** — пробирки можно автоклавировать, но они плохо переносят органические растворители, спокойно — сильные кислоты и щелочи. Пробирки из этого материала рвутся при центрифугировании в настольной микроцентрифуге.

### **Культуральные планшеты**

В условиях клинико-диагностических и научно-исследовательских лабораторий применяются различные приспособления, среди которых важное место занимают лабораторные культуральные планшеты, имеющие широкий спектр применения: проведение иммуноферментного анализа и серологических реакций, кристаллизация белков, культивирование клеточных культур, хранение различных сред, анализов, посевов, прочих биологических материалов.

**Конструкция культуральных планшетов.** Приспособления представляют собой планшеты с заданным количеством лунок, в которых размещается рабочий материал. Параметры планшетов могут варьироваться в зависимости от задач исследования:

— **количество лунок** — наиболее часто используемые модели планшетов имеют 6, 12, 24, 48, 72, 96 лунок;

— **форма дна** — геометрия лунок является важным критерием для 96-луночных культуральных планшетов. Выпускаются планшеты с лунками, имеющими плоское, U-образное или V-образное дно;

— **площадь роста** — определяется как суммарная площадь поверхности лунок;

— **объем лунок** — определяется в зависимости от назначения и специфики применения планшета;

— **габариты планшета** — напрямую зависят от размеров и количества лунок;

— **конструкция крышки** — для поддержания правильного газообмена крышка и основание планшета оснащаются системой вентиляции.

Планшеты изготавливаются производителями с необработанной поверхностью или со стандартной обработкой поверхности, например, коллагеном или фибронектином. Коллаген — высокомолекулярный фибриллярный белок соединительной ткани, основной элемент внеклеточного матрикса, создающий условия эффективного прикрепления клеток к субстрату. Фибронектин, ламинин — белковые лиганды, обеспечивающие взаимодействие внеклеточного матрикса с интегринавыми рецепторами поверхности клетки и увеличивающие адгезивные свойства обработанных субстратов. Кроме того, также доступен пластик с самым разнообразным специальным покрытием, которое позволяет работать с широким спектром клеточных культур в экспериментах по культивированию стволовых клеток человека (индуцированных плюропотентных клеток, клеток мезотелия); первичных культур; клеточных культур, плохо растущих без питающего слоя (Fedeeer-free cultivation); в бессывороточных средах и средах без добавок инородного происхождения (Xeno-free cultivation).

### **Флакон культуральный**

Культуральные флаконы (или матрацы) используются в биологических и медицинских лабораториях для культивирования клеток. Основными отличиями являются типы покрытий рабочей поверхности и ее площадь — от 25 до 300 см<sup>2</sup>. Форма флакона подбирается таким образом, чтобы во внутреннем

пространстве отсутствовали «мертвые зоны» и весь объем флякона был активным и доступным для проведения манипуляций. Флякон оснащается одной или двумя горловинами с герметично закрывающимися крышками с гидрофобным фильтром. Гидрофобная мембрана на крышке обеспечивает защиту содержимого от загрязнений и поддерживает оптимальный уровень стерильного газообмена. В качестве материала для гидрофобного фильтра используется политетрафторэтилен (ПТФЭ). При необходимости конструкция оснащается вентилируемой крышкой, которая может работать в двух режимах — герметичном и вентилируемом. Для перевода в вентилируемое или герметичное положение достаточно легкого поворота крышки. Специальная форма горловины защищает флякон от случайного проливания.

**Многослойные культуральные фляконы для выращивания клеток и тканей** широко применяются для культивирования клеточных культур и выращивания тканей. Конструкция представляет собой прозрачную емкость, внутреннее пространство которой разделено на слои несколькими плоскими акриловыми пластинами. Наличие нескольких слоев позволяет одновременно работать с большим объемом клеточных культур.

### **Культуральные скребки и шпатели**

Стерильные, апиrogenные культуральные скребки и шпатели предназначены для работы с клетками в различной культуральной посуде: культуральных фляконах (матрасах), культуральных пробирках и чашках Петри. Культуральные скребки оснащены вращающимися лезвиями, благодаря чему прилипшие клетки могут эффективно извлекаться из всех углов флякона. Небольшого нажима на ручку и легкого поворота руки достаточно для вращения лезвия в требуемом направлении. Культуральный шпатель с лезвием особой формы с острыми краями обычно используется с культуральными фляконами, отрывающимися сверху, или с большими культуральными чашками Петри. Рельефная поверхность ручек скребков и шпателей позволяет надежно держать их при работе в резиновых перчатках.

### **Культуральные чашки Петри**

Чашка Петри — прозрачный лабораторный сосуд диаметром от 5 до 22 см в форме невысокого плоского цилиндра с невысокими стенками, прикрытый крышкой такой же формы, но большего сечения. Изначально чашка Петри создавалась для проведения микробиологических исследований, позже стала использоваться в общелабораторной оснастке. Широко применяется в культуральных работах с клетками. Культуральные чашки Петри характеризуются большой площадью роста и безопасным обращением. Прозрачность позволяет проводить визуальный контроль клеток в стопке чашек с использованием проходящего света, что идеально подходит для документации результатов методом микрофотографии. Боковые стороны чашки не обработаны для роста культур.

### **Центрифуги**

Центрифуга — устройство, использующее центробежную силу. Применяются для разделения газообразных, жидких или сыпучих тел разной плотности, а также в случаях, требующих имитации повышенной силы тяжести. При вращении в центрифуге частицы с наибольшим удельным весом располагаются на периферии, а частицы с меньшим удельным весом — ближе к оси вращения.

**Центрифуги для лабораторных целей** классифицируются по скорости вращения ротора или по суммарному объему загруженных образцов.

#### **По объему:**

— *микроцентрифуги* — обработка пробирок типа Эппендорф (Eppendorf (ит.)), 0,2—1,5—2,0 мл каждая);

— *общелабораторные центрифуги* — суммарный объем образца около 0,5 л;

— *специализированные центрифуги* повышенного объема (обычно до 6 л).

#### **По скорости:**

— *микроцентрифуги* — обработка пробирок типа Эппендорф, обычно не требует высоких скоростей; скорость до 15 000 об/мин;

— *общелабораторные центрифуги* — обладают значительной универсальностью, могут работать и с пробирками типа Эппендорф, и с другими емкостями; скорость вращения ротора от 200 до 15 000 об/мин;

— *скоростные центрифуги* с высокой производительностью — решают все возможные лабораторные задачи (кроме ультрацентрифугирования); скорость вращения ротора от 1000 до 30 000 об/мин;

— *ультрацентрифуги* — скорость вращения ротора от 2000 до 150 000 об/мин.

***Рефрижераторные лабораторные центрифуги.*** В работающей центрифуге роторы вращаются на большой скорости, что сопровождается повышением их температуры и приводит к нагреву обрабатываемого материала. При подготовке проб для решения многих аналитических задач такой нагрев недопустим. Решить эту проблему помогают системы охлаждения различного типа. Для фракционирования при постоянной комнатной температуре используются лабораторные центрифуги с естественным охлаждением, их также принято называть вентилируемыми центрифугами. В таких приборах рабочий модуль охлаждается воздухом, засасываемым внутрь работающего агрегата через предусмотренные для этих целей отверстия. Воздушные потоки омывают вращающийся ротор и возвращаются обратно в окружающую среду. При центрифугировании термочувствительных нестабильных субстратов естественного охлаждения недостаточно. Для работы с такими суспензиями и эмульсиями необходимы рефрижераторные центрифуги, оснащенные холодильным агрегатом. Центрифуги с охлаждением (центрифуги рефрижераторные) применяются в тех случаях, когда требуется центрифугирование образцов при контролируемой пониженной температуре. Рефрижераторные центрифуги среднего объема позволяют производить одновременно центрифугирование до 400 мл образцов.

***Конструкции роторов лабораторных центрифуг.*** В разных типах центрифуг используются разные роторные устройства: ротор с качающейся загрузочной корзиной (при вращении с ускорением раскачивается в горизонтальной плоскости); ротор с фиксированным углом наклона оси (имеет жестко задан-

ный угол наклона оси в пределах от 14 до 40° от вертикали); ротор-аффинатор (содержит углубления для крепления конусообразной разделительной камеры, которая служит контрбалансом для отделяемой жидкости).

**Эффект самобалансировки** технически реализуется эластичным подвесом барабана центрифуги (часто вместе с приводным электродвигателем) к основному корпусу устройства. Эластичный подвес (как правило, резиновые демпферы) дает возможность барабану центрифуги смещаться в радиальном направлении (в любую сторону) до нескольких сантиметров. Наклон и осевые смещения при этом фиксируются относительно жестко. Самобалансировку, как правило, применяют в центрифугах с вертикальным барабаном. Также в центрифугах иногда применяется автоматическая балансировка (в процессе работы) — смещение предварительно закрепленных противовесов (под управлением электроники) для приведения центра масс барабана на геометрическую ось вращения.

### **Ламинарные боксы (боксы биологической безопасности)**

Боксы биологической безопасности (БББ) — предназначены для изоляции опасных микроорганизмов с целью предотвращения возможности заражения и контаминации персонала, рабочей зоны, а также окружающей среды. Боксы биологической безопасности гарантируют защиту здоровья оператора, работающего с опасными и потенциально опасными агентами.

Согласно европейскому стандарту EN 12469:2000, различают три класса боксов биологической безопасности.

Оборудование **боксы 1-го класса** имеет самый простой принцип работы. Его камера оснащена открытым фронтальным окном. Опасные загрязнения захватываются направленным извне воздушным потоком и пропускаются через фильтровальную систему. Наружу выходит полностью очищенный воздух. Бокс имеет открытую камеру, воздухозабор осуществляется из внешней среды, поэтому исследуемые материалы полностью не защищены от внешних воздействий. Результаты исследований могут быть искажены по причине попадания в рабочую зону посторонних агентов. Основная функция данного бокса заключается в предотвращении попадания загрязнений за пределы



камеры, то есть в помещение лаборатории. Защита оператора находится на невысоком уровне, поэтому биологические боксы 1-го класса считаются устаревшими и используются только в технически обоснованных случаях.

Принцип работы оборудования **2-го класса** схож с боксами 1-го класса — оба устройства имеют открытое фронтальное окно и используются для защиты помещения лаборатории от попадания опасных веществ. Основное отличие шкафов 2-го класса заключается в том, что воздушный поток не поступает сразу в рабочую зону через открытое пространство, а пропускается через специальную воздухозаборную решетку, расположенную возле оператора. Этот поток выполняет функцию воздушной завесы, защищающей оператора от негативного биологического воздействия. Еще один всасывающий элемент с фильтром располагается на верхней панели камеры. Равномерный воздушный поток направляется строго вертикально сверху вниз (нисходящий поток), проходит через НЕРА-фильтр и поступает в рабочую зону. Таким образом, в камеру поступает очищенный воздух из окружающей среды. При этом проникновение микрочастиц в камеру и негативное воздействие на исследуемый материал минимизируется.

Боксы 2-го класса подразделяются на типы А и В. *Тип А:* во время работы за пределы камеры выходит 30% общего воздушного потока, остальные 70% возвращаются в рециркуляционную систему и формируют нисходящий поток. *Тип В:* боксы подключены к наружному вытяжному устройству с вентилятором. Использование принудительной вентиляции позволяет создать более надежный динамический барьер между оператором и биологически опасным материалом, обеспечивая более высокий уровень защиты, поэтому используется при работе с летучими химическими соединениями. В боксах типа В 70% воздуха выводится наружу, а 30% — возвращается в систему.

К боксам биологической безопасности **3-го класса** относится оборудование, обеспечивающее самый высокий уровень биологической безопасности. Шкаф имеет герметичную камеру, а для проведения лабораторных исследований в рабочей зоне используются средства индивидуальной защиты и перчат-

ки. Перчатки присоединяются к камере через специальные герметичные порты. Очистка воздуха осуществляется с помощью фильтровальной системы НЕРА. Очищенный выходящий поток направляется в помещение лаборатории или удаляется за пределы здания через вентиляционные каналы. Дополнительно в камере создается пониженное давление, повышающее уровень безопасности работы с химикатами и биологическими средами. В оборудовании данного типа можно производить исследования с образцами всех категорий опасности, в том числе со смертельно опасными агентами.

### **Термостаты**

Лабораторный термостат — прибор, который используется для поддержания заданной температуры в течение определенного времени, независимо от температуры в помещении. Востребован в лабораториях самого разного профиля. Во многих исследованиях термостат является важнейшим оборудованием, без которого нельзя обойтись.

**Классификация термостатов.** Термостаты бывают разной конструкции, функциональности и объема. Чаще всего их принято классифицировать по типу «теплоносителя»:

- электрические суховоздушные термостаты;
- жидкостные;
- криогенные.

*Термостат электрический суховоздушный* — оборудование, с помощью насоса подающее в камеру теплый воздух, который по камере равномерно распределяют вентиляторы. Аналогичен по конструкции *криогенный термостат*, с той разницей, что насос прогоняет воздух, поступающий в камеру, не через теплонагреватель, а через трубки с циркулирующим хладагентом. Еще такой тип термостатов называют «термостат электрический с охлаждением». Так же как и суховоздушные, криогенные термостаты оснащаются принудительной циркуляцией воздуха для поддержания стабильной температуры в любой точке камеры. *Жидкостные термостаты* выпускаются разной конструкции и для разных целей. От типа используемого теплоносителя зависит температурный диапазон и точность термостатирования.

## **CO<sub>2</sub>-инкубаторы**

Потребность живых клеток в углекислом газе в 3 раза превышает потребность в кислороде. Углекислота необходима для нормального питания, дыхания, метаболизма, усвоения O<sub>2</sub>, биосинтеза, это естественный строительный материал клеток. Количество CO<sub>2</sub>, содержащегося в обычном воздухе, недостаточно для нормального роста биологических образцов, поэтому CO<sub>2</sub>-инкубаторы создают и поддерживают искусственную насыщенную углекислым газом гипоксическую среду. Задача этого устройства — обеспечить для клеток и микроорганизмов сбалансированные условия по содержанию кислорода и углекислого газа в условиях благоприятной температуры и влажности. В среднем при использовании инкубатора показатели биологического развития катализируются в 3—7 раз, сводится к минимуму частота случаев гибели культивируемых организмов.

Основная особенность инкубатора CO<sub>2</sub> — возможность дозирования и регулирования всех физических параметров. Система оснащена датчиками содержания газов (CO<sub>2</sub> и O<sub>2</sub>), температуры, влажности, причем измерения осуществляются со строгой периодичностью. Погрешность регулирования концентрации CO<sub>2</sub> достигает 0,1% — это очень малая величина в общем объеме газовой смеси. Большинство инкубаторов поддерживают диапазон значений концентрации углекислого газа 0—20%, кислорода — 0,2—95%, что позволяет исследователю подобрать оптимальный баланс для конкретного одно- или многоклеточного организма. CO<sub>2</sub>-инкубаторы широко используются в научных исследованиях для выращивания и хранения клеточных культур. Типичные области применения — тканевая инженерия, выращивание эмбрионов после экстракорпорального оплодотворения (ЭКО), нейробиология, исследование рака и другие исследования клеток млекопитающих.

На сегодняшний день на российском рынке представлено множество моделей CO<sub>2</sub>-инкубаторов, призванных создать условия для культивирования клеток и тканей, максимально приближенные к таковым *in vivo*. Принципиально важным является поддержание стабильной температуры, которое может быть достигнуто двумя способами — прямого нагрева-

ния и использования «воздушной рубашки». Контроль равномерного обогрева внутренней поверхности инкубаторов осуществляется микропроцессорами. Инфракрасная система измерения уровня  $\text{CO}_2$ , которой оснащены все инкубаторы, обеспечивает точный контроль концентрации газа внутри камеры. Открывание двери, влекущее за собой нарушение влажности, не влияет на измерение уровня  $\text{CO}_2$  в камере, при этом показания концентрации газа соответствуют его истинному уровню в камере. Для предотвращения пересыхания биологического материала необходимо поддержание определенного уровня влажности. В  $\text{CO}_2$ -инкубаторах это осуществляется путем естественного процесса испарения с поддона, наполненного водой или системой автоматического контроля влажности. Возможность случайного загрязнения клеточной культуры — одна из главных проблем, возникающих в ходе работы с важным биологическим материалом. С целью решения этой проблемы внутренняя поверхность камеры  $\text{CO}_2$ -инкубаторов изготавливается из обогащенного сплава меди и нержавеющей стали, который препятствует росту бактерий и обладает антикоррозийными свойствами. Система ультрафиолетового облучения, встроенная в инкубатор, предотвращает заражение через воздух, поступающий в камеру во время открывания двери, и через воду, заполняющую поддон. В некоторых инкубаторах защиту от контаминации обеспечивает система 100%-ной фильтрации через HEPA-фильтр (размер частиц 0,3 мк со степенью очистки 99,97%), позволяющая через 1 мин после закрывания двери профильтровать весь внутренний объем камеры и через 5 мин достичь степени стерильности класса 100. Для дополнительной защиты от контаминации ряд инкубаторов оснащен системой стерилизации камеры горячим воздухом при температуре 140—180°C. Для культуральных работ с целью выращивания клеток в условиях, максимально приближенных к условиям *in vivo* (с пониженным содержанием кислорода), используются **мультигазовые инкубаторы**, в которые помимо  $\text{CO}_2$  подается азот ( $\text{N}_2$ ). В мультигазовых инкубаторах контролируется содержание газов ( $\text{CO}_2$ ,  $\text{N}_2$  и  $\text{O}_2$ ) для создания гипоксических условий или условий с избыточным количеством кислорода.

### **Виды и классификация холодильников**

В лабораторной практике широко используется холодильное оборудование, в первую очередь бытовые холодильники компрессионного и абсорбционного типа. Чаще всего по способу получения холода применяются компрессионные холодильники.

В общий объем холодильной камеры, определяемый произведением высоты на ширину и глубину камеры, входит также объем низкотемпературного (морозильного) отделения (в однокамерных холодильниках).

Полезный объем холодильной камеры — весь объем, который можно использовать для размещения продуктов.

Общая площадь полок — сумма площадей всех полок, имеющих в камере, включая площади полок низкотемпературного (морозильного) отделения (в однокамерных холодильниках) и панели двери, а также площади поддонов и дна камеры, если они могут быть использованы для укладки продуктов.

**Морозильники лабораторные** — аппараты, создающие стабильную низкую температуру с минимальными колебаниями, что делает их идеальными для длительного хранения биологических образцов, лекарств, вакцин и т. д. В промышленности морозильники используются для тестирования электронных компонентов, резиновых уплотнителей, устройств.

Медицинские морозильники подразделяются на группы по глубине охлаждения:

— *морозильники до  $-150^{\circ}\text{C}$*  — лабораторные модели для ультранизкого охлаждения. При длительном хранении ряда чувствительных образцов (сперма КРС, материалы для экспериментов по сверхпроводимости) важно получить при заморозке аморфные кристаллы жидкости, содержащейся в образце. Эти кристаллы в диаметре меньше, чем самые малые компоненты клетки, — от 4000 до 7000 А. И в дальнейшем важно избегать перекристаллизации до более крупных гексагональных кристаллов (разрушающих образец). Температура перекристаллизации для разных жидкостей составляет в среднем от  $-115$  до  $-130^{\circ}\text{C}$ . Таким образом, содержание образцов при  $-152^{\circ}\text{C}$  гораздо ниже температуры их рекристаллизации, с использова-

нием специальных криопротекторов позволяет хранить многие материалы практически неограниченное время без потери их свойств. Это является хорошей альтернативой криохранению в жидком азоте (в парах жидкого азота), так как не требует расходных материалов;

— *медицинские морозильники до  $-86^{\circ}\text{C}$*  — преимущественно используют для долгосрочного хранения образцов нуклеиновых кислот, тканей, клеток;

— *низкотемпературные морозильники до  $-30...-40^{\circ}\text{C}$*  — для хранения плазмы крови, вакцин;

— *морозильники до  $-20^{\circ}\text{C}$*  — для ежедневного использования в лабораториях для хранения часто используемых образцов, реагентов, нетребовательных к глубине охлаждения.

### **Виды и классификация микроскопов**

Микроскоп — это оптический прибор, позволяющий получить увеличенное изображение исследуемого объекта, невидимого невооруженным глазом. Основные элементы оптической системы микроскопа — окуляр и объектив, расположенные в подвижном тубусе, который находится на металлическом основании на предметном столике. Лабораторные микроскопы, в зависимости от их назначения, подразделяют на несколько видов: бинокулярные; стереомикроскопы; металлографические; поляризационные; люминесцентные; измерительные.

С помощью **бинокулярного прибора** можно получить два изображения объекта, которые рассматриваются под маленьким углом, в результате получается объемная картинка. **Стереомикроскопы** позволяют разглядывать объект не только в проходящем свете, но и в отраженном. Их преимущество заключается в изучении крупных объектов, так как у них большое фокусное расстояние и изображение они получают не в перевернутом виде, поэтому их применяют, например, при препарировании микроскопических тел. В основе **поляризационных микроскопов** лежит следующая идея: исследуемый объект облучается поляризованными лучами, которые получают из обычного света при помощи поляризатора — специального прибора. **Люминесцентные микроскопы** отличаются тем, что исследуют непрозрачные и прозрачные объекты под флюоресцентным излучением, которое отражается по-разно-

му от поверхностей материалов. Поэтому они нашли широкое применение в проведении иммунологических, иммунохимических, иммуногенетических и иммуноморфологических исследований. Что касается *измерительных* приборов, то они предназначены для точного измерения линейных и угловых размеров объектов и применяются не только в лабораториях, но и в машиностроении.

Лабораторные микроскопы классифицируются по различным параметрам: по методу освещения, по назначению, по строению оптической системы, от параметров разрешения микрочастиц и т. д.

*Инвертированные микроскопы* — это оптические микроскопы, отличающиеся тем, что объектив в них располагается под наблюдаемым предметом, а конденсор — сверху. Направление хода лучей, прошедших сверху вниз через объектив, изменяется системой зеркал, и в глаз наблюдателя они попадают, как обычно, снизу вверх. Микроскопы этого типа предназначены для исследования громоздких объектов. В биологии и медицине с помощью таких микроскопов изучают находящиеся в питательной среде культуры тканей. Инвертированные микроскопы идеальны для самого широкого ряда исследований при работе с тканями, клеточными культурами, в ЭКО (ICSI). Толщина объекта для прямых микроскопов плоского поля имеет определенные ограничения, что связано с рабочим расстоянием объективов. Для инвертированных (перевернутых) микроскопов толщина объекта не играет большой роли. На них можно исследовать габаритные объекты или объекты, расположенные в специальной посуде (чашках Петри, флаконах). Кроме того, на инвертированных микроскопах можно производить работы с объектом при помощи специальных устройств — манипуляторов. Для документирования изображений, инвертированные микроскопы оснащают фото- или видеовыходом.

*Конфокальный микроскоп* — оптический микроскоп, обладающий значительным контрастом по сравнению с обычным микроскопом, что достигается использованием апертуры, размещенной в плоскости изображения и ограничивающей поток фонового рассеянного света. Конфокальный микроскоп отличается от «классического» оптического микроскопа тем, что в каждый момент времени регистрируется изображение одной

точки объекта, а полноценное изображение строится путем сканирования (движения образца или перестройки оптической системы). Конфокальный микроскоп создает четкое изображение образца, которое при использовании обычного микроскопа представляется размытым. Это достигается путем отрезания апертурой фонового света, идущего из глубины образца, то есть того света, который не попадает на фокальную плоскость объектива микроскопа. В результате изображение получается с контрастом лучшим, чем в обычном оптическом микроскопе. Изображение представляет собой двумерную (2D) картину. Конфокальный микроскоп, имеющий высокий контраст, позволяет исследовать ткани на клеточном уровне в состоянии физиологической жизнедеятельности, а также оценивать результаты исследования (то есть клеточной активности) в четырех измерениях — высота, ширина, глубина и время.

### **Гомогенизаторы**

Культуры клеток, полученные непосредственно из тканей, называются первичными. Для их выделения предварительно в стерильных условиях ткань измельчается до кусочков объемом до 1—3 мм, которые отмываются от эритроцитов раствором Хенкса с антибиотиками. Для дезагрегации ткани используют трипсин (0,25%-ный неочищенный или 0,01—0,05%-ный очищенный), или коллагеназу (200—2000 ед/мл, неочищенная), или другие протеолитические ферменты. Для повышения эффективности в последние годы широко используются гомогенизаторы различных конструкций: механические, роторные, ультразвуковые. Оптимальным вариантом являются автоматические станции гомогенизации тканей, позволяющие получать суспензии клеток с высокой жизнеспособностью. В таких приборах осуществляется комбинация механического и ферментативного разрушения тканей. Для получения воспроизводимых результатов применяются стандартные программы гомогенизации для отдельных видов тканей.

### **Счетчики клеток, анализаторы жизнеспособности**

*Счетчики клеток, анализаторы жизнеспособности* — это оборудование, которое дает представление о количественном составе клеточной суспензии и выявлении жизнеспособных



клеток популяции. Под жизнеспособностью понимают способность клеток поддерживать состояние, необходимое для выполнения специфических функций, а также возможность реализации митотического потенциала. Существующие методы для оценки жизнеспособности клеток условно можно разделить на следующие группы:

- 1) оценка целостности морфологической структуры клеток;
- 2) оценка активности внутриклеточных ферментов: определение митохондриальной активности клеток (МТТ-тест), основанное на реакции восстановления (4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-2Нтетразолиум бромид (МТТ-тест) клеточными оксиредуктазами; определение активности лактат-дегидрогеназы (LDH-тест);
- 3) специфические тесты, например пересев клеток после инкубирования с токсикантом для определения приживаемости и т. д.

Выбор того или иного метода напрямую зависит от задач исследования.

Стандартным методом определения жизнеспособности клеток является оценка их целостности. Данный метод заключается в визуализации и распознавании клеток после их окраски специальными красителями, которые при повреждении клеточной стенки проникают внутрь клетки. При этом окрашенные клетки признаются нежизнеспособными. В качестве красителя чаще используют *трипановый синий*. Также можно применять флуоресцентные красители (пропидиум йодид, DAPI, акридиновый оранжевый). При ручном анализе результаты окрашивания ведутся с помощью микроскопии в камере Горяева — оценивается доля мертвых клеток по отношению к общему их числу. *Анализаторы жизнеспособности* клеток позволяют автоматизировать данный процесс. Они работают по принципу окраски клеток красителем с последующим анализом и подсчетом общего количества клеток и оценкой жизнеспособных клеток. *Счетчик клеток* работает по принципу Култера, основанному на изменении электрических импульсов, возникающих при прохождении клеток через электрочувствительную зону апертуры счетного элемента прибора. Счетчики клеток могут быть портативными для оперативного измерения количества клеток и ана-

лиза популяций в суспензии по размеру и клеточному объему, а также с более расширенным функционалом, когда необходимо провести более детальный анализ популяций клеток.

### ***Магнитная сепарация клеток***

Использование магнитной сепарации позволяет осуществлять выделение интересующей популяции клеток из цельной крови, образцов костного мозга или моноклеарной суспензии, что обеспечивает быстрый и прямой доступ к максимальному числу целевых клеток. Частицы добавляются непосредственно к образцу биологической жидкости. После 10—20-минутной инкубации пробирка с образцом помещается в магнитный сепаратор, где клетки интересующей популяции, связанные с магнитными частицами, улавливаются, а в супернатанте остаются не связавшиеся с микробусами клетки. При этом поддерживаются оптимальные условия жизнеспособности и функционирования клеток. Выделенные целевые клетки ресуспендируют в солевом буферном растворе и анализируют согласно протоколу исследования. При необходимости магнитные частицы впоследствии отделяются от исследуемых клеток.

### ***Клеточные сортеры***

При необходимости отделить нужную популяцию от остальных клеток используют проточные цитометры. Они подразделяются на анализаторы (только логическое выделение) и сортеры (логическое и физическое выделение нужных клеток). Клеточные сортеры способны провести анализ, выбрать нужную популяцию и выделить ее в отдельную пробирку, лунку планшета или перенести на предметное стекло. Для разделения клеток большинство сортеров использует электростатическую сепарацию. После прохождения через луч лазера (то есть после анализа) клетка изолируется в капле жидкости. В зависимости от результатов анализа капля с клеткой получает определенный электрический заряд, благодаря которому она отклоняется в электромагнитном поле и в итоге оказывается в пробирке с такими же клетками. Капли, не получившие заряд, попадают в слив и удаляются. В некоторых сортерах сортировка производится при помощи чипов на основе микрофлюидики.

### **Системы прижизненного клеточного анализа**

Оборудование предназначено для проведения продолжительной прижизненной съемки и анализа динамических процессов, происходящих в культуральных объектах в ходе роста и развития. В состав входят инвертированные микроскопы, оснащенные климатической камерой, моторизованным предметным столиком и компьютерным обеспечением для наблюдения за поведением клеток в режиме реального времени. Специализированные приборы, такие как, например, прибор Cell-IQ (ChipMan Technologies, Tampere, Финляндия) или система прижизненного клеточного анализа IncuCyte S3 (Essen BioScience Inc, США), специально предназначены для культивирования и анализа клеточной популяции в динамике. Основное их преимущество — возможность производить съемку непосредственно внутри CO<sub>2</sub>-инкубатора.

### **Термошейкеры**

*Термошейкер* применяется для перемешивания различных планшетов посредством использования режима термостатирования.

### **2.2. Санитарно-гигиенические требования к проведению биотехнологических экспериментов**

Культуральная (клеточная) лаборатория является зоной повышенных рисков. Все сотрудники лаборатории должны знать и неукоснительно соблюдать санитарно-гигиенические требования, предъявляемые к работе с биоматериалом. Необходимо регулярное проведение повторных циклов обучения по технике безопасности.

Во всех лабораториях запрещено есть, пить, курить, хранить какую-либо еду, личные вещи и посуду, применять косметические средства, вставлять и удалять контактные линзы. Ношение контактных линз разрешается только в тех случаях, когда неприменимы другие формы коррекции зрения. Ношение ювелирных украшений в лаборатории не рекомендуется. Пипетирование ртом любых веществ в лаборатории запрещено. Длинные волосы должны быть завязаны сзади или покрыты таким образом,

чтобы они не соприкасались с руками, образцами, контейнерами или оборудованием. Доступ в лабораторию и вспомогательные зоны ограничен персоналом, имеющим на это разрешение. Двери в лабораторию не должны оставаться открытыми. Это требование не относится к открытой зоне в пределах лаборатории. Открытые раны, порезы, царапины и потертости должны быть закрыты повязками из водостойкого материала. Весь персонал, включая посетителей, стажеров и других лиц, входящих в лабораторию и работающих в ней, должен быть одет в тщательно застегнутую защитную лабораторную одежду. Во всех зонах лаборатории следует находиться в соответствующей обуви, закрывающей носки и пятки. Там, где существует известный или потенциальный риск разбрызгивания веществ или воздействия летающих предметов при выполнении рядовых операций или при необычных обстоятельствах (например, при аварии), необходимо использовать средства защиты глаз и лица. Следует внимательно относиться к процедурам, требующим защиты глаз и лица, и выбору подходящих средств в соответствии с риском. Перчатки (латексные, виниловые, из сополимерных материалов) надевают при выполнении всех процедур, которые могут сопровождаться непосредственным контактом кожи рук с биологически опасным материалом или зараженными животными. Перчатки следует снимать перед выходом из лаборатории и обеззараживать вместе с другими отходами перед их удалением. Под обычные перчатки можно надевать перчатки из металлической сетки.

Защитную лабораторную одежду запрещено носить вне зон лаборатории. Нельзя хранить ее в соприкосновении с личной одеждой. Если имеет место выявленный или предполагаемый контакт с биологически опасным материалом, загрязненная одежда должна быть обеззаражена до ее стирки (за исключением случаев, когда прачечная имеется в защищенной зоне и подтверждена ее эффективность по обеззараживанию).

Использование игл, шприцев и других острых предметов следует строго ограничить. Иглы и шприцы необходимо применять только для парентерального введения жидкостей лабораторным животным и взятия у них биологических материалов, а также для отбора препаратов из флаконов с мембранами. При

работе с иглами и шприцами надо проявлять осторожность во избежание случайного введения материала себе и образования аэрозоля во время использования и утилизации. При необходимости такие манипуляции должны проводиться в БББ. Иглы нельзя сгибать, отрезать, повторно закрывать колпачками и отсоединять от шприца. Перед выбрасыванием их следует помещать в контейнер для острых предметов, устойчивый к проколам. Руки моют после снятия перчаток, перед уходом из лаборатории и каждый раз после работы с материалом, заразным или подозрительным на зараженность. Рабочие поверхности очищают и обеззараживают соответствующим дезинфектантом в конце дня, а также после каждого разбрызгивания потенциально биологически опасного агента.

Рабочие поверхности, которые стали проницаемыми для биологических материалов (треснувшие, вспученные, со сколами), подлежат замене или ремонту. Загрязненные материалы и оборудование, вывозимое из лаборатории для обслуживания или на выброс, должны быть надлежащим образом дезинфицированы и помечены или промаркированы соответствующим образом. Мониторинг эффективности работы автоклавов, используемых для обеззараживания с применением биологических индикаторов, следует проводить регулярно (например, еженедельно, в зависимости от частоты использования автоклава). Результаты тестирования и записи циклов автоклавирования (время, температура, давление) должны подшиваться и храниться в архиве.

Все твердые и жидкие загрязненные материалы должны быть обеззаражены перед утилизацией или повторным применением. Эти материалы упаковывают таким образом, чтобы предотвратить попадание в окружающую среду загрязненного содержимого при их удалении. Средства для дезинфекции, активные в отношении используемых возбудителей, должны всегда быть в достаточном количестве в зонах, где осуществляется работа или хранение заразного материала. Необходимо пользоваться герметичными контейнерами для транспортировки заразных материалов в пределах объекта, например между лабораториями одного объекта. О фактах проливания жидкой культуры, аварий, контакта с заразным материалом, нарушения целостности изоляции следует немедленно уведомлять руко-

водителя лаборатории. Необходимо вести и хранить записи о таких нештатных ситуациях, а результаты их расследования использовать для дальнейшего обучения. В лаборатории должна осуществляться эффективная программа контроля за грызунами и насекомыми.

Для хранения легковоспламеняющихся препаратов, кислот, веществ, которые приводят к образованию испарений, и других реактивов должны быть выделены отдельные, подходящие для этого рабочие площади. Все складские помещения должны быть оборудованы в соответствии с требованиями пожарной безопасности. Реактивы не следует переносить из одного структурного подразделения или отдела в другой. Повторная упаковка реактивов не допускается. В целях обеспечения безопасности и снижения уровня загрязнения среды внутри лаборатории реактивы не следует хранить в служебных помещениях, за исключением тех ситуаций, когда в этом есть настоятельная необходимость. Реактивы, используемые в повседневной практике, должны храниться в лаборатории. Вода относится к одной из разновидностей реактивов, и она должна соответствовать техническим условиям фармакопеи или другим техническим требованиям, предъявляемым к лаборатории.

Культуры клеток (клеточные линии) широко используются в диагностических и микробиологических лабораториях, а также в промышленности (для производства фармацевтических препаратов). Описаны случаи лабораторного заражения патогенными микроорганизмами как результат манипуляций с первичными культурами клеток. Хотя клеточные линии изначально не создают опасности для лиц, работающих с ними в лаборатории, они способны содержать инфекционные агенты (либо исходно, либо в результате случайного загрязнения, трансформации или рекомбинации).

### **Оценка риска**

Для каждой новой клеточной линии, с которой планируется работа в лаборатории, должна быть проведена подробная оценка риска для определения мер предосторожности, которые надо

принимать при манипуляциях с клетками. Детальная оценка риска должна включать следующие пункты (но не исчерпывается ими):

- источник культуры клеток — чем ближе она в филогенетическом отношении к человеку, тем выше потенциальный риск (последовательность линий от наибольшего риска к наименьшему включает аутологичные клетки человека, гетерологичные, клетки приматов, других млекопитающих, птиц, беспозвоночных);

- источник ткани — определяют возможные патогенные микроорганизмы или латентные (онкогенные) вирусы, инфицировавшие культуру клеток;

- тип клеточной линии (последовательность от наиболее высокого риска к самому низкому включает первичные культуры клеток, перевиваемые и хорошо изученные);

- количество клеток в культуре;

- источник популяции клеток, из которого взят образец для культивирования;

- свойства клеточной линии хозяина (в случае гибридом должны приниматься во внимание свойства каждой из клеток, участвующих в слиянии);

- вектор, используемый для трансформации (может повысить требуемый уровень защиты);

- передача вирусных последовательностей (может повысить требуемый уровень защиты);

- передача факторов вирулентности (может повысить требуемый уровень защиты);

- активация эндогенных вирусов (может повысить требуемый уровень защиты);

- продукт рекомбинантного гена (может повысить требуемый уровень защиты);

- присутствие вируса-помощника (может повысить требуемый уровень защиты).

Как только получена вся необходимая информация, касающаяся данной клеточной линии, включая любые вредности, связанные со средой, используемой для работы с культурой клеток, она анализируется для определения степени риска манипуляций с этой культурой клеток.

**Загрязнение биоматериала инфекционными агентами, биобезопасность.** Клеточные линии, загрязненные бактериями и грибами, легко выявляются при культивировании в средах без антибиотиков, потому что бактерии и грибы быстро опережают клетки в росте. В отличие от бактерий и грибов, заражение культур клеток вирусами обнаружить непросто, поэтому вирусы могут представлять серьезную опасность для персонала лабораторий, работающего с первичными клеточными линиями. Из-за различий в степени риска, связанного с клеточными линиями, Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) предложила их классификацию, основанную на вероятности каждой культуры клеток нести вирусы, патогенные для человека. *Низкая вероятность:* клеточные линии из тканей птиц и беспозвоночных. *Средняя вероятность:* клетки млекопитающих, не относящиеся к клеткам крови (фибробласты и эпителиальные клетки). *Высокая вероятность:* клетки крови и клетки костного мозга, полученные от человекообразных и нечелоовекообразных приматов, клетки слизистых оболочек человека, козы и овечьи клетки, в особенности нервные; гибридные клетки, когда по крайней мере одна из клеток, участвовавших в слиянии, получена от человекообразных или нечелоовекообразных приматов. С клеточными линиями, которые загрязнены вирусами или подозрительны на их содержание, работают в условиях уровня защиты, соответствующего степени опасности возбудителя, определяющего наибольший риск.

Манипуляции с трансформированными человеческими клетками, полученными от самого экспериментатора (человеческие аутологичные клетки) **запрещены**. Такие работы могут представлять опасность для данного индивидуума, поскольку при этом обходятся естественные механизмы иммунологического распознавания чужеродных клеток. В каждой культуральной (клеточной) лаборатории должно быть разработано «Руководство по биобезопасности» с описанием важнейших требований, предъявляемых к биобезопасности в целях охраны здоровья персонала и защиты окружающей среды.

Задачи, выполняемые таким руководством, заключаются в следующем:



— проведение анализа присутствующих агентов или факторов риска, включая опасности, связанные с химическими веществами и радиационным облучением (в соответствующих случаях);

— учет в практике работы лаборатории требований биобезопасности с упором на характер действующих агентов. С этой целью следует рассмотреть вопрос об использовании необходимых средств индивидуальной защиты, а также установок, оборудования и мероприятий, которые могут оказаться неотъемлемыми для охраны здоровья персонала и населения и защиты окружающей среды;

— определение порядка действий в аварийных ситуациях на случай возникновения каждого фактора риска и обеспечение необходимым оборудованием для реализации таких мер в лаборатории;

— обучение персонала правильному выполнению предписанных приемов и методов, надлежащему использованию средств индивидуальной защиты, а также тому, как действовать при возникновении чрезвычайных ситуаций, в том числе таких, как пожар или стихийные бедствия;

— проверка наличия «Руководства по биобезопасности» на каждом рабочем участке лаборатории, в котором приводится информация о факторах риска, мерах предосторожности при обработке проб и порядке действий в аварийных ситуациях;

— обсуждение конкретных вопросов, касающихся гигиены труда.

Все сотрудники должны знать о существовании такого «Руководства» и обязаны выполнять его предписания. Руководитель лаборатории несет ответственность за реализацию положений данного руководства и соблюдение требований, вытекающих из его содержания.

**Оборудование и инженерные системы безопасности.** Системы приточно-вытяжной вентиляции, расположенные вне изолированной зоны, должны быть доступны для ремонта, технического обслуживания, очистки и осмотра. Вешалки для лабораторной одежды должны быть расположены у выхода из лаборатории. Места для личной и лабораторной одежды разделены.

Рядом с выходом из лаборатории или в санпропускнике должны быть установлены раковины для мытья рук. При правильном техническом обслуживании и использовании, в сочетании с корректными лабораторными методиками, боксы биологической безопасности обеспечивают эффективную первичную физическую защиту при работе с патогенами человека. В лабораториях УЗ-2 БББ используют при манипуляциях, создающих опасность образования инфекционных аэрозолей, и для работы с высокими концентрациями и большими объемами заразного материала. Все сотрудники, работающие в БББ, должны пройти подготовку по их правильному использованию, хорошо разбираться в различных типах. Существует три класса БББ: I, II и III. Выбор бокса подходящего класса требует тщательной оценки планируемых работ.

Перед началом работы в боксе биологической безопасности следует провести следующие подготовительные операции:

- выключить ультрафиолетовый (УФ) свет (если он был включен) и убедиться, что выдвижная перегородка передней панели находится в надлежащей позиции;

- включить лампу дневного света и внутренний вентилятор (если он был отключен);

- проверить отверстия для поступления воздуха и вытяжные решетки на наличие возможных препятствий;

- если бокс оборудован аварийной сигнализацией, проверить ее и включить;

- убедиться в поступлении воздуха внутрь, поместив салфетку по центру передней панели (она должна втягиваться внутрь);

- обработать внутренние поверхности подходящим некоррозионным дезинфектантом;

- собрать вместе все материалы, необходимые для работы, и загрузить их в БББ. Не закрывать воздушные решетки. Рабочую поверхность можно выложить адсорбирующей бумагой с пластиковой подложкой и отделить «чистые» предметы от «загрязненных»;

- подождать 5 мин для удаления частиц, загрязняющих воздух рабочей зоны.

**Методы обеззараживания.** Контаминированные лабораторные отходы (чашки Петри, пипетки, пробирки, другую лабораторную посуду и т.д.) можно эффективно обеззараживать в автоклавах с двумя различными системами удаления воздуха: с вытеснением воздуха паром или с предварительным вакуумированием. Предвакуулируемые автоклавы удаляют воздух из камеры с помощью разрежения в начале цикла, до поступления насыщенного пара (за исключением жидкостных циклов). При этом решается проблема воздушных ловушек, характерная для автоклавов с системой гравитационного вытеснения воздуха. Эффективность обеззараживания в паровых автоклавах зависит от различных конфигураций загрузки, которые влияют на температуру обрабатываемого материала, и времени экспозиции. Особое внимание следует уделять укладке материалов для автоклавирования, в том числе размеру контейнеров и их распределению в автоклаве. Контейнеры должны позволять проникновение пара внутрь и распределяться внутри камеры таким образом, чтобы обеспечивать свободную циркуляцию пара. Плотная укладка контейнеров препятствует проникновению пара к стерилизуемым материалам. Установка контейнеров друг на друга и перегрузка автоклава могут привести к отрицательному результату обеззараживания.

Химические дезинфектанты используются для обеззараживания поверхностей и оборудования, которое нельзя автоклавировать, например, контейнеров для образцов и других материалов, которые выносятся из изолированной зоны, а также для обработки пролитых заразных материалов, помещений, мест содержания животных и других предметов и материалов, тепловая обработка которых затруднена или невозможна. Первоначальный выбор дезинфектанта проводится, исходя из чувствительности к нему используемого возбудителя. Наиболее чувствительными являются вегетативные формы бактерий и грибов и вирусы, покрытые оболочкой. Микобактерии и безоболочечные вирусы менее чувствительны, а бактериальные споры и цисты простейших проявляют самую высокую устойчивость к дезинфицирующим средствам. Важное значение надо прида-

вать удобству использования дезинфектантов, их стабильности, совместимости с обрабатываемыми материалами и степени опасности для здоровья.

Обычно существуют значительные различия между активностью дезинфектантов при обычных условиях применения в лаборатории и при их строго контролируемом анализе в оптимальных стандартных условиях, когда проводится изучение эффективности с целью регистрации продукта. На эффективность дезинфицирующих средств могут влиять многие факторы: присутствие органических материалов (крови, сыворотки, мокроты), которые ослабляют действие гипохлоритов, температура, относительная влажность.

Гамма-облучение, например  $^{60}\text{Co}$ , можно использовать для обеззараживания термочувствительных материалов. Оно также является эффективным способом обеззараживания химических веществ и растворителей, удаляемых из изолированной зоны. Эффективность этой технологии обеззараживания зависит от проникновения гамма-лучей в обрабатываемый материал, то есть как от его плотности, так и от мощности излучения.

Микроволновое излучение в изолированных лабораториях в целях обеззараживания широко не применяется. Как и при стерилизации паром, критическим фактором инактивации патогенных микроорганизмов здесь является температура. Другие параметры, влияющие на этот процесс, — частота излучения и длина волны, продолжительность экспозиции и процент влажности материала.

На ультрафиолетовое облучение нельзя полагаться как на единственный метод обеззараживания материалов, которые выносятся из изолированных помещений. Оно имеет ограниченную проникающую способность и воздействует главным образом на незащищенные микроорганизмы, находящиеся на облучаемых поверхностях и в воздухе. УФ-облучение может быть эффективным методом снижения уровня загрязнения поверхностей и воздуха при условии надлежащей очистки, технического обслуживания и проверки ламп на интенсивность излучения.

Сжигание (кремация) традиционно было методом выбора при обработке анатомических биомедицинских отходов и трупов животных. В большинстве случаев отходы для сжигания долж-

ны быть упакованы и вывезены за пределы данного населенного пункта. Материалы, вывозимые для сжигания, должны пройти обеззараживание на границе изолированной зоны лаборатории, предпочтительно методом автоклавирования. Эффективное сжигание зависит от правильности конструкции оборудования в части обеспечения времени, температуры, турбулентности и подачи воздуха, необходимого для полного сгорания.

***Требования к молекулярно-биологическим исследованиям.***

Помещения лаборатории должны способствовать надлежащему проведению диагностики. В зависимости от видов проводимых экспертиз разные этапы диагностики могут быть совмещены в одной рабочей зоне, если принимаются необходимые меры предосторожности для исключения перекрестного заражения, причиной которого могут быть образцы, референтный материал и оборудование.

Доступ в помещения лаборатории должен быть разрешен только сотрудникам, работающим в данной лаборатории и осведомленным о назначении и использовании каждой зоны и ограничениях, наложенных на работу в таких зонах.

Все помещения лаборатории должны иметь системы водоснабжения, канализации, энергоснабжения, отопления, вентиляции.

Напряжение общей электрической сети 220 В. Необходимо предусмотреть для некоторых приборов напряжение 380 В. Лаборатория должна быть обеспечена резервным энергоснабжением.

Во всех помещениях должна поддерживаться влажность 30—65% и постоянная температура воздуха  $22 \pm 2^\circ\text{C}$ .

На подающих и вытяжных воздуховодах должны быть установлены специальные фильтры. Отверстия для принудительной и естественной вентиляции и оконные проемы всех помещений приема образцов и лаборатории энтомологии должны быть оборудованы кордонами из мелкоячеистой сетки.

Лаборатория должна состоять из помещений для проведения исследований и вспомогательных помещений (входов, коридоров, кладовых, туалетов, архивов и т.д.). Рекомендуется иметь отдельные помещения или специальные рабочие зоны для следующего:

- приема образцов;
- визуального осмотра и подготовки образцов к проведению различных видов экспертиз;
- проведения необходимых видов экспертиз;
- хранения образцов;
- изоляции зараженного материала;
- утилизации материала, прошедшего экспертизу;
- содержания референтного (сравнительного) материала;
- для работы с живыми карантинными организмами;
- подготовки сред;
- подготовки реагентов;
- подготовки лабораторной посуды и инструментов;
- автоклавирования.

Следует принимать меры для обеспечения должного ведения административно-хозяйственной деятельности в лаборатории. В лаборатории должно быть достаточно места для того, чтобы содержать рабочие зоны в чистоте и порядке. Сотрудники должны носить одежду и обувь, соответствующие проводимому исследованию, особенно при работе в микробиологической и молекулярно-биологической лаборатории.

Рабочая зона должна соответствующим образом очищаться в периодах между работой с различными образцами и/или проведением различных мероприятий.

Лаборатория регулярно должна проводить мониторинг чистоты воздуха и различных поверхностей в значимых зонах. Мониторинг можно проводить, используя посевные чашки (например, на простом агаре) или другие соответствующие неизбирательные чашки, ловушки для насекомых. Также необходимо проверять буферы. В лабораториях, работающих с нематодами, необходимо соблюдение правил, исключающих перезаражение образцов.

***Особые требования для молекулярно-биологических лабораторий:***

1. Рабочие зоны, предназначенные для проведения полимеразной цепной реакции (ПЦР), должны быть организованы по принципу «прямого потока» для следующих этапов:

- а) выделения ДНК и РНК;
- б) приготовления мастер-микса;

- в) добавления образца в мастер-микс;
- г) анализа продуктов амплификации.

Для организации ПЦР-анализа необходимо иметь по меньшей мере три отдельные комнаты. При этом допустимо совмещение в одной комнате а) и в) этапов; или же с особыми мерами предосторожности — этапов б) и в), но они должны быть пространственно разделены или проводиться в ПЦР-боксе.

2. *В каждой рабочей зоне должно использоваться оборудование*, специально предназначенное для этой зоны (включая пипетки). Предпочтительно, чтобы в каждой рабочей зоне использовались отдельные халаты и обувь для проведения лабораторных работ, по меньшей мере специальный халат для приготовления мастер-микса. Работа должна проводиться в отдельных для каждой зоны одноразовых перчатках.

3. *Пробирки, содержащие продукты реакции амплификации*, не должны открываться в пределах рабочих зон, где проводится выделение ДНК/РНК, приготовление мастер-микса или реакционной смеси.

***Особые указания по мониторингу загрязнения бактериями и грибами.*** В проверяемых рабочих зонах выставляются по три посевные чашки на 30 мин. Затем они инкубируются от 3 (при 30 °С) до 5 дней (при комнатной температуре). Контактные чашки должны соприкасаться с проверяемой поверхностью в течение 15 с, затем их закрывают и подвергают инкубации, как указано выше.

Частота мониторингов определяется каждой лабораторией самостоятельно в зависимости от интенсивности работы в помещениях.

Все работы по мониторингу документируются. В случае необходимости должна проводиться более интенсивная уборка, после проведения корректирующих действий должна быть проведена дополнительная проверка чистоты помещения.

***Требования к персоналу, нормативная документация, требования к оборудованию, расходные материалы.*** Лаборатория должна быть укомплектована специалистами в соответствии с видами и объемами проводимых экспертиз. Сотрудники, выполняющие экспертизы, должны иметь соответствующее профильное образование.

Руководитель лаборатории должен определять и гарантировать компетентность тех, кто выполняет экспертизу. Он должен обеспечить необходимый уровень квалификации специалистов путем обучения на различных курсах и специальных стажировках. Информация о специалистах должна документироваться, в том числе все виды повышения квалификации. Каждому специалисту лаборатории, выполняющему экспертизу, необходимо иметь все нормативные документы, которые должны постоянно обновляться.

В лаборатории должна проводиться регистрация имеющегося оборудования, в которой отмечается производитель, даты выпуска и введения в эксплуатацию, инвентаризационные номера, маркировка, основные характеристики с приложением инструкции производителя.

Должна быть разработана и документально оформлена программа по обслуживанию, поверке и калибровке оборудования в соответствии с Законом РФ «Об обеспечении единства измерений», ПР 50.2.006-94 «Порядок проведения поверки средств измерений», ПР 50.2.016-94 «Требования к выполнению калибровочных работ». Руководитель лаборатории обеспечивает выполнение этой программы.

В лаборатории должны храниться свидетельства, аттестаты и копии отчетов о поверке и калибровке средств измерений и пригодности оборудования.

Если оборудование было подвергнуто перегрузке или неправильному использованию либо дает подозрительные результаты, то должно быть прекращено его использование до тех пор, пока не будет проведен ремонт или пока не будет установлено, что оборудование работает должным образом.

Инструкции по использованию и техническому обслуживанию оборудования, включая инструкции, предоставляемые производителем оборудования, должны всегда быть доступны для использования персоналом лаборатории. Техническое обслуживание основного оборудования должно проводиться в определенные периоды времени в соответствии с разработанной программой. Техническое обслуживание должно документироваться.



Периодичность проведения технического обслуживания, калибровок и поверок должна основываться на типе оборудования и показателях качества его работы. Практические рекомендации даны в таблице 1.

Таблица 1

**Рекомендации по техническому обслуживанию, проведению калибровки и поверки лабораторного оборудования**

Тип оборудования	Рекомендации	Примерная частота проведения
Термометры, термошкафы, термостаты	Единичная точка на шкале (при рабочей температуре)	Ежегодно
Калибровочные гири	Калибровка	Ежегодно
Весы электронные лабораторные	Поверка	Ежегодно
Микроскопы	а) прослеживаемая калибровка микрометра предметного столика; б) чистить и дезинфицировать поверхности; в) чистить и проводить полное техническое обслуживание; г) проверять окуляры	а) изначально; б) ежедневно/при каждом использовании; в) ежегодно; г) раз в шесть месяцев
Автоматические пипетки	Калибровка	Ежегодно
Автоклавы (моновакуумметры)	Калибровка	Ежегодно
Оборудование с температурным контролем (термостаты, холодильники, морозильные камеры и т. д.)	а) установить постоянную и единую температуру; б) следить за температурой	а) изначально, а также после ремонта, модификации; б) ежедневно/при каждом использовании

Продолжение табл. 1

Тип оборудования	Рекомендации	Примерная частота проведения
Термоциклеры	а) верификация эффективности; б) бытовое обслуживание	а) ежегодно; б) ежеквартально
Рабочие термометры и термoeлементы	Сверять с эталонным термометром при температуре таяния льда и/или в рабочем температурном диапазоне	Ежегодно
Сухожаровые шкафы	а) установить постоянную и единую температуру; б) следить за температурой	а) изначально, а также после ремонта, модификации; б) ежедневно/при каждом использовании
Автоклавы	а) установить параметры для стандартной загрузки/циклов; б) следить за температурой/временем; в) проводить визуальные проверки прокладок, чистить/сушить камеру; г) полное обслуживание; д) проверка безопасности камеры давления (сосуда высокого давления, силового корпуса)	а) изначально, а также после ремонта, модификации; б) ежедневно/при каждом использовании; в) регулярно как рекомендуется производителем; г) ежегодно; д) ежегодно
Бокс безопасности	а) установить рабочие характеристики; б) микробиологический мониторинг (проверка); в) мониторинг (проверка) воздуха	а) изначально, а также после ремонта/модификации; б) при каждом использовании; в) каждый год (с контрактом на обслуживание)

*Продолжение табл. 1*

Тип оборудования	Рекомендации	Примерная частота проведения
Ламинарный шкаф	а) установить рабочие параметры; б) проверить при помощи чашек стерильности или путем смыва; в) обслуживание и проверка технического состояния	а) изначально, а также после ремонта, модификации; б) еженедельно; в) в соответствии с рекомендациями производителя
Климатические камеры	а) следить за температурой, влажностью и освещенностью; б) вести наблюдение за вредными организмами при помощи клеевых ловушек; в) чистить	а) при каждом использовании; б) еженедельно; в) после каждого использования
pH-метры	а) настроить прибор на проверку, используя не менее двух буферов; б) чистит электрод	а) ежедневно/при каждом использовании; б) при каждом использовании
Весы	а) проверять ноль (положение нуля) и показание весов при измерении контрольного веса; б) чистить; в) обслуживать	а) ежедневно/при каждом использовании; б) при каждом использовании; в) ежегодно
Весы аналитические	Проверить в сравнении с калибровочным весом или сразу проверить на равновесие	Ежегодно

Продолжение табл. 1

Тип оборудования	Рекомендации	Примерная частота проведения
Дистилляторы, деионизаторы	а) проверять удельную проводимость; б) проверять на наличие микробного загрязнения	а) ежедневно; б) ежемесячно, если очищенная вода или конечный продукт, содержащий очищенную воду, не стерилизуется в автоклаве либо не фильтруется перед использованием
Пипетторы (многоканальные пипетки)	Проверять точность и правильность объема	Регулярно (принимая во внимание частоту и характер использования и в зависимости от наблюдаемого отклонения)
Термостаты (для микробиологических целей)	Чистить и дезинфицировать внутренние поверхности	Ежемесячно
Термостаты (для других целей, кроме микробиологических)	Чистить и дезинфицировать внутренние поверхности	Раз в три месяца
Холодильные установки, морозильные камеры, печи	Чистить и дезинфицировать внутренние поверхности	Ежегодно/ежеквартально
Центрифуги	а) проводить обслуживание; б) чистить и дезинфицировать	а) ежегодно; б) при каждом использовании
Боксы безопасности	Полное обслуживание и проверка технического состояния	Ежегодно

Окончание табл. 1

Тип оборудования	Рекомендации	Примерная частота проведения
Дозаторы	а) чистить; б) обслуживать	а) при каждом использовании; б) ежегодно
Дистилляторы	Чистить и снимать накипь	Как требуется (например, раз в три месяца)
Деионизаторы	Заменять картридж/мембрану	Как рекомендовано производителем
Гомогенизаторы	Чистить	При каждом использовании
Лаборатория	а) чистить и дезинфицировать рабочие поверхности; б) чистить и дезинфицировать полы и раковины и др. оборудование в микробиологических лабораториях; в) чистить и дезинфицировать другие поверхности; г) проводить влажную уборку	а) ежедневно и во время каждого использования; б) еженедельно; в) раз в три месяца; г) ежедневно

При поступлении образцов в лабораторию должно проводиться и фиксироваться их состояние. Если в образце недостаточно материала или он находится в плохом состоянии по причине физического повреждения, ненадлежащей температуры хранения, разорванной упаковки или не отвечающей требованиям маркировки, если образец не соответствует предоставленному описанию, он на экспертизу не принимается.

Образцы, не прошедшие экспертизу, должны храниться в надлежащих условиях, чтобы свести до минимума изменения их состояния.

Для проведения экспертизы лаборатория должна иметь референтные (сравнительные) материалы, которые используются

при идентификации вредных организмов, подтверждении достоверности результатов экспертизы, мониторинга работы лаборатории и т. д.

В качестве сравнительного материала может быть использована также информация из научной литературы, рисунки, фотографии, которые можно применить в качестве вспомогательных средств при проведении диагностики.

### **2.3. GLP (Good Laboratory Practice) – надлежащая лабораторная практика**

#### ***Международные правила надлежащих практик***

**GxP** — это общее сокращение от Good Practices («хороших практик») качеств руководящих принципов и правил. «X» обозначает различные области, включая фармацевтику и пищевую промышленность, например надлежащую сельскохозяйственную практику или GAP. Целью руководящих принципов качества GxP является обеспечение безопасности продукта и его соответствия предполагаемому использованию. GxP направляет создание и производство в регулируемых отраслях промышленности, включая продукты питания, лекарства, медицинские приборы и косметику. Иногда перед инициализмом GxP добавляется буква «с» или «С», которая означает «текущий». Например, cGMP — это аббревиатура от «современной надлежащей производственной практики». Термин GxP часто используется для общего обозначения набора руководящих принципов качества.

Для клеточных технологий ведущее значение имеют правила и принципы, закрепленные в документах:

1. **Надлежащая клиническая лабораторная практика Good Clinical Laboratory Practice (GCLP)** — это система норм, правил и указаний, направленных на обеспечение согласованности и достоверности результатов лабораторных исследований.

2. **Надлежащая лабораторная практика Good Laboratory Practice (GLP)** — это система контроля качества управления для исследовательских лабораторий и организаций, работающих в области экспериментальных (неклинических) исследований, для обеспечения единообразия, согласованности, надеж-

ности, воспроизводимости, качества и целостности продуктов, разрабатываемых для здоровья человека или животных (включая фармацевтические препараты), посредством доклинических испытаний на безопасность — от физико-химических свойств до испытаний на острую или хроническую токсичность.

3. **Надлежащая производственная практика Good Manufacturing Practice (GMP)** — правила, которые устанавливают требования к организации производства и контроля качества лекарственных средств для медицинского и ветеринарного применения.

4. **Good Tissue Practice (GTP)** — это система норм, правил и указаний для работы учреждений с культурами клеток и тканей. В мировой практике такие стандарты разрабатываются профессиональным сообществом, и в дальнейшем их придерживаются лидеры отрасли для обеспечения безопасности и качества работы, производимых услуг и продуктов.

Зафиксированные в этих документах положения нацелены на обеспечение качества и безопасности в первую очередь лекарственных препаратов (в том числе БМКП — биомедицинских клеточных препаратов) и изделий медицинского назначения (в нашем случае имплантатов). Продукция, полученная в условиях такой системы обеспечения качества гарантированно должна отвечать требованиям и стандартам, предъявляемым к медикаментам.

#### *Надлежащая клиническая лабораторная практика Good Clinical Laboratory Practice*

Первое руководство по надлежащей клинической лабораторной практике (GCLP) было разработано в Великобритании в 2003 г., впоследствии на этой основе были разработаны рекомендации Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), и в 2007 г. вышел в свет американский вариант рекомендуемых стандартов. Важно подчеркнуть, что данные руководства не являются обязательными к исполнению, однако, если клиническая лаборатория желает соответствовать международным стандартам и иметь возможность принимать участие в международных проектах, выполнение требований, изложенных в этих документах, является необходимым условием.

В руководстве GCLP описаны организационная структура и персонал (обязанности руководства и персонала, помещения лаборатории), стандартные операционные процедуры (СОП), организация работы, субподрядчики, исследуемые материалы/ образцы (получение, сохранение, логистика), проведение работы (общее, компьютерные системы, валидация методов, обработка исследуемых материалов), формирование отчетов, контроль качества, аудит качества, хранение документации и меры по обеспечению конфиденциальности. Фактически в них отражены все стороны работы клинической лаборатории.

Особое внимание следует обратить на наличие и оформление СОПов по всем основным процессам. В СОПах документально оформлены формализованные пошаговые алгоритмы выполнения действий персонала лабораторий при исполнении рабочих процедур или действий. В них прописаны подразделения, ответственное за выполнение той или иной манипуляции, участники выполнения, необходимые материалы и время, необходимое для выполнения процедуры (анализа). Следовательно, в СОПах фиксируется наилучший способ выполнения работы, его стандартизация, что позволяет существенно повысить качество выполняемого анализа. Таким образом, регламенты, изложенные в GCLP, обеспечивают клинические лаборатории руководством по проведению основных лабораторных исследований, а экспертов в этой области — четкими критериями на соответствие лабораторного подразделения международным стандартам.

### *Надлежащая лабораторная практика Good Laboratory Practice*

Более универсальный документ по сравнению с GCLP — руководство по надлежащей лабораторной практике (Good Laboratory Practice — GLP). Этот документ является административной концепцией, оговаривающей организационные процессы и условия планирования, проведения, мониторинга, документации и отчетности о доклинических лабораторных исследованиях лекарственных веществ и препаратов. Впервые эта система нормативов была разработана в США в начале XXI в. Аналогичные документы были разработаны и в других странах,



в том числе в странах Европейского союза. В РФ в 2013 г. был внедрен ГОСТ 31879-2012 «Принципы надлежащей лабораторной практики (GLP). Руководство по процедурам мониторинга соответствия Принципам GLP». Разработанные на его основе «Правила надлежащей лабораторной практики Евразийского экономического союза в сфере обращения лекарственных средств» были приняты странами — участниками Евразийского экономического союза в 2017 г.

Правила надлежащей лабораторной практики применяются в доклинических (неклинических) исследованиях по безопасности испытуемых веществ, содержащихся в лекарственных средствах, и/или лекарственных средств. Целью исследования этих веществ является получение данных об их свойствах и/или безопасности для здоровья человека и окружающей среды.

В этом пакете документов подробно прописаны следующие разделы:

**Основные понятия и терминология.** В разделе с целью однозначного понимания и юридического закрепления приведены определения и термины, использованные в документе.

**Система обеспечения качества.** Организация, проводящая доклинические (неклинические) исследования (далее — лаборатория), должна иметь документально оформленную систему обеспечения качества для гарантии того, что исследования проводятся согласно правилам надлежащей лабораторной практики.

**Персонал лаборатории.** *Руководство лаборатории* должно обеспечить соответствие правилам надлежащей лабораторной практики. *Руководитель исследования* является централизованным контролирующим лицом в исследовании и несет ответственность за его общее проведение и подготовку заключительного отчета. *Ведущий исследователь* должен обеспечить проведение исследования согласно соответствующим правилам надлежащей лабораторной практики. *Персонал*, задействованный в проведении исследования, должен соблюдать правила надлежащей лабораторной практики, иметь доступ к протоколу/программе исследования и соответствующим стандартным операционным процедурам, которые имеют отношение к его

работе в исследовании. Любые отклонения от протокола/программы исследования должны быть документально оформлены и переданы напрямую руководителю исследования и/или при необходимости ведущему(им) исследователю(ям). Персонал исследования несет ответственность за своевременную и точную регистрацию исходных данных и их соответствие правилам надлежащей лабораторной практики, а также за качество этих данных. Персонал должен предпринимать оздоровительные профилактические меры для минимизации риска для здоровья и обеспечивать достоверность исследования, а также сообщать соответствующему лицу о санитарных или медицинских условиях с целью их устранения и недопущения влияния на исследование.

***Помещения для исследований.*** Помещения, предназначенные для проведения доклинических (неклинических) исследований, проектируются, располагаются и эксплуатируются в целях обеспечения качественного исполнения проводимых работ. Структура лаборатории должна обеспечивать адекватную степень разделения разных видов деятельности для надлежащего проведения каждого исследования. Лаборатория должна иметь достаточное количество помещений и зон для изоляции тест-систем, в которых задействованы вещества или микроорганизмы с известной или подозреваемой биологической опасностью; для диагностики, исследования и контроля заболеваний, чтобы не допустить неприемлемого уровня повреждения тест-систем; для хранения сырья и оборудования, используемого в исследовании, с целью обеспечения соответствующей защиты от заражения, загрязнения или повреждения. Для предотвращения загрязнения или смешивания должны быть отдельные помещения и зоны для получения и хранения исследуемых веществ и образцов сравнения/контрольных образцов. Помещения или зоны хранения испытуемых веществ должны быть отделены от комнат или зон, в которых размещаются испытательные системы, и обеспечивать сохранение состава, концентрации, чистоты и стабильности, а также безопасное хранение опасных веществ.

Обработку и утилизацию/уничтожение отходов необходимо осуществлять таким образом, чтобы не подвергать риску досто-

верность исследований. Лаборатория для этих целей должна иметь соответствующие помещения для сбора, хранения, обработки и утилизации/уничтожения, а также утвержденные процедуры дезинфекции и транспортировки отходов.

**Оборудование, материалы и реактивы.** Оборудование, включая компьютеризированные системы, используемые для сбора и хранения данных и для контроля факторов окружающей среды, которые имеют отношение к исследованию, должно быть размещено или установлено с учетом особенностей, целей и назначения, соответствующих видам проводимых исследований. Оборудование, используемое в исследовании, необходимо периодически подвергать техническому обслуживанию, калибровке, очистке в соответствии с утвержденными стандартными операционными процедурами, задокументированными в установленном порядке. На начало исследования испытательные системы должны пройти соответствующий карантин, допуск к использованию и соответствовать виду и целям исследования.

**Испытуемые вещества и образцы сравнения.** В лаборатории должна быть информация о свойствах исследуемых веществ и образцов сравнения/контрольных образцов, дате получения, сроке годности и полученном и использованном количестве в исследованиях; указаны процедуры обработки, отбора проб и хранения с целью обеспечения надлежащего уровня гомогенности и стабильности, исключающего загрязнение или смешивание; на контейнере(ах) для хранения указана соответствующая идентифицирующая информация, срок годности и особенности хранения. Каждое исследуемое вещество и образец сравнения/контрольный образец должны быть соответствующим образом идентифицированы.

**Стандартные операционные процедуры.** Лаборатория должна иметь письменно оформленные стандартные операционные процедуры, утвержденные руководством лаборатории, которые предназначены для обеспечения качества и достоверности данных, полученных лабораторией в ходе проведения исследований. Внесение изменений в стандартные операционные процедуры должно быть одобрено руководством лаборатории.

**Проведение исследования. Протокол/программа исследования.** В каждом исследовании должен быть протокол/программа в письменной форме, согласованные руководством лаборатории и спонсором/разработчиком. Протокол/программа исследования должны быть утверждены датированной подписью руководителя исследования; поправки к протоколу/программе — обоснованы, одобрены датированной подписью руководителя исследования. Отклонения от протокола/программы исследования должны быть описаны, объяснены, одобрены, своевременно датированы руководителем исследования или ведущим(ми) исследователем(ями) и сохранены с исходными данными исследования. При краткосрочных исследованиях можно использовать общий протокол/программу исследования с соответствующими приложениями.

**Методы исследований.** Приводится подробное описание методов исследований, наименований тест-систем, используемых в исследовании, с обоснованием их выбора, способов и путей введения исследуемого вещества (лекарственного средства), методов статистической обработки и иные документы по проведению исследований.

**Проведение исследования.** Каждому исследованию должен быть присвоен уникальный номер. Все используемые в исследовании образцы, оборудование и материалы должны быть документально отражены в материалах исследования с целью их прослеживаемости. Исследование должно проводиться согласно протоколу/программе исследования. Данные, собираемые по мере прямого ввода в компьютер, должны быть идентифицированы на момент их ввода лицом(ами), ответственным(ыми) за прямой ввод данных. Компьютеризированная система должна обеспечивать сохранение всех контрольных журналов со всеми изменениями данных, не скрывая исходные данные. Ведение записей только в электронном виде допускается при наличии валидированных компьютеризированных систем.

**Оформление результатов исследования.** Для каждого исследования готовится заключительный отчет. При проведении краткосрочных исследований можно подготовить стандартизированный заключительный отчет с приложением об особен-

ностях исследования. При проведении долгосрочных исследований может быть подготовлен промежуточный отчет/отчеты. Отчеты ведущих исследователей и специалистов, задействованных в исследовании, должны быть ими собственноручно подписаны и датированы. Заключительный отчет должен быть подписан и датирован руководителем исследования, свидетельствуя о принятии ответственности за достоверность данных, с указанием степени соответствия правилам надлежащей лабораторной практики. Заключительный отчет должен быть скреплен печатью организации, если это требуется национальным законодательством.

**Контроль качества.** Контроль качества клинических лабораторных исследований — система мер, направленная на выполнение качественных лабораторных исследований на всех этапах их осуществления — от подготовки пациента к процедуре взятия биологического материала до использования полученных результатов в процессе оказания медицинской помощи. Система контроля качества клинических лабораторных исследований включает внутрिलाбораторный (внутренний) контроль на уровне отдельной лаборатории и междолабораторный (внешний) контроль на областном, республиканском и международном уровнях. Основной формой контроля качества всех видов исследований, проводимых в клиничко-диагностических лабораториях (КДЛ), является внутренний (внутрилабораторный) контроль, цель которого обеспечить точность и правильность выполняемых исследований, предупредить, выявить и устранить грубые, случайные и систематические ошибки количественного анализа биологического материала. Контроль качества осуществляется с помощью специальных контрольных материалов, а также ряда способов, не требующих контрольных материалов.

#### *Надлежащая производственная практика Good Manufacturing Practice*

Если стандарты GLP предназначены в первую очередь для исследовательских лабораторий и организаций, работающих в области экспериментальных (неклинических) исследований, то стандарты надлежащей производственной практики GMP (Good

Manufacturing Practice) прописывались для производств, занимающихся выпуском лекарственных средств для медицинского и ветеринарного назначения. Стандарт GMP предусматривает множество показателей, которым должны соответствовать производители продукции. Причем для фармацевтов детально регламентированы требования к каждому этапу изготовления — от концентрации бактерий, содержащихся в одном кубометре воздуха, до маркировки продукции. В качестве примера можно привести требование к предприятию, изготавливающему лекарства в таблетках. В таких случаях GMP (международный стандарт) требует от организации «особо чистых цехов», в которых повышенная стерильность процесса достигается входными шлюзами для персонала, специальным режимом воздушной фильтрации и т.п. Первые такие стандарты появились в США в 1968 г., и с 1969 г. Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) рекомендовала всем странам применять международный стандарт GMP. Эти правила неоднократно дополнялись и корректировались. В РФ внедрение международных стандартов изначально было затруднено, поскольку их внедрение предполагает существенное переоснащение существующих фармакологических производств, пересмотр технической документации (в том числе нормативно-правовой и методических баз), изменения требований к источникам сырья и технологиям получения лекарственных средств, подготовку квалифицированных кадров. Тем не менее в 2004 г. были разработаны сначала ГОСТ Р 52249-2004 «Правила производства и контроля качества лекарственных средств», затем в 2009 г. обновленный вариант ГОСТ Р 52249-2009 «Правила производства и контроля качества лекарственных средств».

В настоящее время действующим документом являются разработанные на основе европейских нормативных документов Правила надлежащей производственной практики (GMP) Евразийского экономического союза, утвержденные Решением Совета Евразийской экономической комиссии от 03.11.2016 г. №77. В первой части этого документа приведены основные требования к фармацевтической системе качества, персоналу, помещениям, оборудованию, документации, производству и контролю качества. Во второй части детально описаны основ-

ные требования к качеству и производству исходного сырья — активных фармацевтических субстанций. Третья часть посвящена документальному сопровождению производственной площадки (досье производственной площадки), принципам управления рисками при производстве лекарственных препаратов, фармацевтическим системам качества, международным гармонизированным требованиям к содержанию сертификата лекарственного средства. Кроме того, Правила содержат ряд приложений, касающихся производства отдельных видов лекарственных препаратов, а также глоссарий терминов и определений. Положения Правил, касающиеся требований к производству ветеринарных лекарственных средств, вступили в силу с 1 января 2021 г.

*Надлежащая тканевая практика  
Good Tissue Practice GTP*

Для лабораторий и организаций, специализирующихся на работе с культурами клеток и тканей, важное значение имеют принципы, изложенные в Good Tissue Practice (GTP). В мировой практике такие стандарты разрабатываются профессиональным сообществом, и в дальнейшем их придерживаются лидеры отрасли для обеспечения безопасности и качества работы, производимых услуг и продуктов. Развитие клеточных технологий и прогресс клеточной терапии невозможен без правовой и нормативной регуляции этих процессов, нацеленных в первую очередь на получение стандартных и, главное, безопасных биомедицинских клеточных продуктов (БМКП). В январе 2009 г. FDA выпустило проект руководства по cGTP для промышленности, озаглавленный «Текущая надлежащая тканевая практика (CGTP) и дополнительные требования для производителей человеческих клеток, тканей и клеточных и тканевых продуктов (HCT/Ps)». В РФ (помимо Ф3-180н «О биомедицинских клеточных продуктах») аналогом этого документа является Приказ МЗ РФ от 08.08.2018 г. №512н «Об утверждении Правил надлежащей практики по работе с биомедицинскими клеточными продуктами». В этом приказе относительно подробно прописаны положения по организации системы качества и деятельности персонала, дана характеристика помещений и основного

оборудования для производства БМКП. Отдельные разделы посвящены требованиям к «чистым помещениям», их организации и содержанию. В приказе также содержатся организации контроля качества БМКП и материалов для его изготовления. Значительное место посвящено документальному сопровождению производственного цикла, требованиям по сертификации, контролю качества БМКП.

## 2.4. Чистые помещения

**Чистое помещение** — это герметичное пространство, в котором поддерживаются определенные нормами параметры микроклимата и качества среды (число и размер таких частиц, как пыль, микроорганизмы, химические пары и пр., скорость воздушного потока, температура, влажность, перепад давления). Чистые помещения являются необходимым условием производства в электронной и фармацевтической промышленности, поскольку загрязняющие факторы среды (биологические организмы, аэрозольные частицы, химические вещества) могут существенно сказываться на качестве продукции, делая ее небезопасной для человека. В последние десятилетия для лечения пациентов с сердечно-сосудистыми, опухолевыми, неврологическими и др. заболеваниями достаточно широко начали применяться созданные на основе клеточных линий лекарственные средства — биомедицинские клеточные продукты (БМКП). Соответственно, к ним, как и ко всем лекарственным препаратам, предъявляются жесткие требования по качеству и безопасности, которые обеспечиваются технологиями (в том числе технологическими средами) и организацией производства БМКП. Одним из основных инструментов, обеспечивающих качество и безопасность клеточных продуктов и продуктов, получаемых на их основе, являются чистые помещения. В настоящее время создание таких помещений обрело четкую научно-методологическую основу, которая включает в себя методы обеспечения чистоты, методы фильтрации воздуха, системы подготовки воздуха для чистых помещений, изолирующие технологии, материалы для строительства и др.

Особенностью чистых помещений, задействованных в производстве БМКП, является производственный процесс, не



предусматривающий финишную стерилизацию, так как эти препараты чувствительны к стерилизации общепринятыми методами: температурой, ионизирующей радиацией и др. Соответственно, для получения таких продуктов создается так называемое *асептическое производство*, подразумевающее проведение всех работ по культивированию клеток в асептических условиях защиты продукта от окружающей среды. Помимо чистых помещений, ведущая роль в обеспечении чистоты производственного процесса принадлежит оборудованию, его герметичности, устойчивости к методам стерилизации.

Основным принципом обеспечения чистоты является создание в помещении избыточного давления по отношению к смежным с ним зонам. Это достигается регулированием в нем дисбаланса воздуха, то есть разности между количеством приточного и вытяжного воздуха. Количество приточного воздуха должно превышать вытяжку минимум на 20% при условии, что рассматриваемое помещение находится в центре здания, и не менее 30% при наличии в помещении остекления, допускающего инфильтрацию. Это обеспечивает движение воздуха из помещений с высокими требованиями по чистоте в смежные помещения с более низкой степенью чистоты по мере убывания технологических требований.

В России стандарты проектирования, строительства и эксплуатации чистых производственных помещений (ЧПП) регламентирует ГОСТ Р ИСО 14644. В настоящее время существует пять частей данного стандарта, каждая из которых определяет требования к выполнению той или иной стадии проектирования строительства или эксплуатации ЧПП: Часть 1 (ГОСТ Р ИСО 14644-1-2000) — Классификация чистоты воздуха; Часть 2 (ГОСТ Р ИСО 14644-2-2001) — Требования к контролю и мониторингу для подтверждения постоянного соответствия классам чистоты; Часть 3 (ГОСТ Р ИСО 14644-3-2007) — Методы испытаний; Часть 4 (ГОСТ Р ИСО 14644-4-2002) — Проектирование, строительство и ввод в эксплуатацию; Часть 5 (ГОСТ Р ИСО 14644-5-2005) — Эксплуатация.

Проектирование чистых помещений является самым важным этапом, на котором учитываются все основные элементы будущего производства. Проектирование и строительство чи-

стых помещений выполняется исходя из специфики технологического процесса производства, исследований или изысканий, с соблюдением требований строительных норм и правил, санитарно-гигиенических, противопожарных и других нормативных документов РФ. Требования к проектированию, строительству, материалам, аттестации и эксплуатации, а также деление чистых помещений на классы чистоты регламентирует серия стандартов ISO 14644 «Международной организации по стандартизации (ISO)» (ГОСТ ИСО 14644-1). Всего стандарт определяет **9 классов чистоты** — от ISO9 до ISO1, где ISO1 — наивысшей класс, а ISO9 сопоставим с чистым наружным воздухом (табл. 2). В фармацевтической промышленности используют **классификацию GMP** и определяют класс помещения от А до D.

Таблица 2

**Классы чистоты по взвешенным в воздухе частицам  
для чистых помещений и чистых зон**

Класс ИСО	Максимально допустимые концентрации частиц, частиц/м <sup>3</sup> , с размерами, равными или большими следующих значений, мкм					
	0,1	0,2	0,3	0,5	1,0	5,0
Класс 1	10	2	—	—	—	—
Класс 2	100	24	10	4	—	—
Класс 3	1000	237	102	35	8	—
Класс 4	10000	2370	1020	352	83	—
Класс 5	100000	23700	10200	3520	832	29
Класс 6	1000000	237000	102000	35200	8320	293
Класс 7	—	—	—	352000	83200	2930
Класс 8	—	—	—	3520000	832000	29300
Класс 9	—	—	—	35200000	8320000	293000

**Классификация чистых помещений по GMP**

Согласно GMP, в зависимости от допустимого содержания аэрозольных частиц чистые зоны делятся по классам на А, В, С и D (табл. 3).

Таблица 3

**Классификация чистых помещений и чистых зон  
(по ГОСТ Р 52249-2009)**

Тип чистой зоны	Максимально допустимое число частиц в 1 м <sup>3</sup> воздуха при размере частиц, равном или большем			
	В оснащённом состоянии		В эксплуатируемом состоянии	
	0,5 мкм	5,0 мкм	0,5 мкм	5,0 мкм
A	3520	20	3520	20
B	3520	29	352000	2900
C	352000	2900	3520000	29000
D	3520000	29000	—	—

*Чистые зоны класса А* — предназначены для операций с высокой степенью риска и требующих асептических условий, которые обеспечиваются зоной с однонаправленным (ламинарным) потоком воздуха.

*Чистые зоны класса В* — пространство, окружающее зону класса А. Предназначены для производства продукции в асептических условиях. По количеству аэрозольных частиц в одном кубометре воздуха в эксплуатируемом помещении соответствует классу 7 ИСО, в оснащённом — классу 5 ИСО.

*Чистые зоны класса С* — аналогичны классам чистоты 7 и 8 ИСО. Эти помещения применяются для осуществления производственных процессов, при реализации которых риск загрязнения воздушного пространства менее опасен для конечного продукта. Например, приготовление растворов, проходящих последующую фильтрацию.

*Чистые зоны класса D* — характеризуются самыми мягкими требованиями в отношении чистоты воздуха. Этот класс помещений может использоваться для проведения работ с составляющими после мойки. В оснащённом состоянии отвечают требованиям класса 8 ИСО в соответствии с ГОСТ, в функционирующем — отсутствуют четкие требования относительно числа взвешенных частиц в воздушном пространстве. Задание лимита осуществляется соответственно характеру выполняемых операций. Чистые зоны С и D предназначены для менее ответственных производственных операций (табл. 4).

**Примеры операций в чистых зонах  
для асептического фармацевтического производства**

Тип зоны	Выполняемые операции
А	Асептическое приготовление и наполнение; приготовление растворов, не проходящих дальнейшую стерилизующую фильтрацию; операции по переработке и наполнению приготовленных в асептических условиях продуктов; транспортирование частично закрытых первичных упаковок, например, при лиофильной сушке до завершения укупорки; приготовление и наполнение стерильных мазей, кремов, суспензий и эмульсий, когда продукт находится в открытом виде и не подлежит последующей фильтрации
В	Зоны, окружающие зону А
С	Приготовление растворов для фильтрации; автоматические упаковочные линии по технологии «выдувание — наполнение — герметизация»
Д	Операции с материалами после мойки; зоны вокруг изолятора

Чистые помещения являются сложным инженерным сооружением, к материалам, оборудованию, воздушной среде, которая впоследствии будет подвергнута очистке, предъявляются достаточно жесткие требования и др. При сдаче такого рода помещений в эксплуатацию проводится серия валидационных испытаний (в оснащем и не оснащем состоянии), проводится регулярный мониторинг соответствия среды заявленным степеням чистоты.

### **2.5. Асептика и антисептика в культуральных работах**

Микробная контаминация — непреднамеренное или случайное попадание инфекционных агентов (бактерии, грибки, простейшие) или их токсинов и субпродуктов в культуру клеток — является одной из самых сложных проблем в культуральных работах. Источниками попадания микроорганизмов

в культуру клеток могут быть нестерильные поверхности, посуда, инструментарий, культуральные среды и добавки. Кроме того, изначально первичный материал для получения клеточной культуры может быть инфицирован исследователем. Заражение микроорганизмами, особенно микоплазменными бактериями, может привести не только к гибели клеточной культуры, но и к контаминации всех клеточных культур, выращиваемых в лаборатории. Поэтому соблюдение правил асептики и антисептики к культурам клеток необходимое условие любой лаборатории. Асептика в культуральной лаборатории — это комплекс мероприятий, направленных на предотвращение попадания микробов в культуру клеток.

Основными методами, применяемыми для соблюдения асептических условий, являются физические и химические способы обработки инструментария, оборудования и рабочих поверхностей. К физическим методам относятся термическая стерилизация (паровая и воздушная), стерилизация кипячением ультрафиолетовым излучением. Химическая стерилизация подразумевает обеззараживание с помощью химических средств (дезсредств). Асептическими свойствами обладают кислоты и щелочи, спирты, окислители, галоиды, альдегиды и другие группы веществ. Подробно эти вопросы освещены в разделе 2.7 «Стерилизация материала».

В культуральной лаборатории антисептика подразумевает мероприятия, направленные на профилактику или борьбу с инфекциями, поражающими культуры клеток. Основным методом «лечения» клеточных культур является применение биологических активных веществ — антибиотиков и антимикотиков (противогрибковых средств), которые в известных количествах добавляются в культуральные среды. Подробнее об этих культуральных добавках изложено в разделе 2.6 «Культуральные среды, ростовые факторы».

Таким образом, асептика и антисептика в клеточных технологиях — это два неразделимых принципа, соблюдение которых помогает предотвратить попадание и распространение инфекции в культурах тканей. Однако, как отмечалось выше, источником инфекции для культур клеток могут быть и сами исследователи. С целью предупреждения этого явления, а также для

обеспечения безопасности персонала при работе с биологическим материалом в культуральных лабораториях предусмотрен ряд мер инфраструктурного и организационного характера, которые включают в себя: требования к организации лаборатории клеточных культур, очистке воздуха в лаборатории, сотрудникам лаборатории; правила работы в лаборатории и в ламинарном шкафу; организацию рабочего места исследователя. Эти положения изложены в следующих нормативных актах:

— Приказ Минздрава РФ № 512н от 08.08.2018 г. «Об утверждении правил надлежащей практики по работе с биомедицинскими клеточными продуктами»;

— СП-1.3.2322-08 — САНПиН «Безопасность работы с микроорганизмами 3—4 группы патогенности и возбудителями паразитарных болезней»;

— ГОСТ Р ИСО 13408-1-2000 «Асептическое производство медицинской продукции». Часть 1. Общие требования, Часть 2. Фильтрация;

— ГОСТ ИСО 14689-1-2005 «Чистые помещения и связанные с ними контролируемые среды. Контроль биозагрязнений» (2 части);

— ГОСТ Р ИСО 14644-7-2007. Часть 7. «Изолирующие устройства (укрытия с чистым воздухом, боксы перчаточные, изоляторы и мини-окружения)»;

Основные положения, закрепленные в этих документах, изложены ниже.

### ***Помещения для работы с культурами клеток***

Стерилизация питательных сред, как и все другие манипуляции при работе с клеточными культурами, проводится в боксовых помещениях или в ламинар-боксах. Боксовое помещение представляет собой изолированную комнату с не сорбирующими пыль моющимися покрытиями, имеющую предбоксник и обеспеченную необходимым общим и специальным освещением, системами приточной и вытяжной вентиляции, холодным и горячим водоснабжением, а также подводами газов и сжатого воздуха. Альтернативой боксовым помещениям, требующей меньших затрат на оборудование, являются ламинар-боксы, или стерильные рабочие места. В этом случае в любом помещении

может быть оборудован локальный стерильный объем, необходимый для работы и создающий биологическую защиту пользователей. Технически задача решается путем постоянного обдува места проведения работ ламинарным потоком. При работе с заведомо непатогенными материалами поток обеспыленного воздуха из рабочей зоны выходит непосредственно в окружающее пространство. В случае работы с потенциально патогенным материалом воздух перед выходом из рабочей зоны дополнительно фильтруется, возможность обдува оператора при этом исключена. В зависимости от устройства ламинар-бокса поток обеспыленного воздуха в рабочей зоне может быть горизонтальным, вертикальным или наклонным. Ламинар-бокс с горизонтальным потоком обеспыленного воздуха типа УОБГ (установка обеспыливания биологическая с горизонтальным потоком) обеспечивает очистку воздуха, подаваемого в рабочую зону, путем фильтрации на фильтрах грубой и тонкой очистки, встроенных в прибор (по мере загрязнения грубый фильтр промывается, тонкий сменяется). Прибор имеет встроенные источники освещения, УФ-облучения (для стерилизации рабочей зоны в перерывах между использованием бокса) и регулятор скорости воздушного потока. В помещениях должна быть разводка электротоканапряжением 380/220 и 220 В, подведена холодная и горячая вода, иметься источник дистиллированной воды, канализация для стока воды. Основным оборудованием блока являются ламинарные шкафы, инкубаторы, термостаты, качалки, центрифуги отечественного и импортного производства, позволяющие обеспечивать получение и культивирование в лабораторных условиях различных клеточных культур с соблюдением правил асептики по технологиям и в условиях, необходимых для каждой клеточной линии (монослойное или суспензионное культивирование). Низкотемпературные холодильники обеспечивают длительное хранение клеточных культур при  $-70...-80^{\circ}\text{C}$ . В блоке должно быть оборудование для приготовления и холодной стерилизации питательных сред, их компонентов и растворов, необходимых для обеспечения роста различных клеточных линий, а также оборудование для обработки культуральной суспензии, осаждения клеток, выделения целевых продуктов. Вспомогательное оборудование включает

дистиллятор, компрессор воздуха для обеспечения работы сосудов под давлением, холодильники для хранения питательных сред и их компонентов и др.

### *Содержание помещений*

В лаборатории должно быть выделено лицо, ответственное за правильное содержание помещений, а также определены чистые и загрязненные рабочие зоны, которые следует постоянно содержать аккуратными и незагроможденными. Должно быть запрещено хранение на рабочих местах больших объемов отходов, которые могут создавать препятствия и опасности для прохода. Оборудование и рабочие поверхности, используемые при работе с зараженными материалами, с помощью соответствующих средств по завершении каждого рабочего цикла и всякий раз, когда произошла протечка или иное загрязнение, должны быть очищены и дезинфицированы. Все протечки проб, химических веществ, радионуклидов или культур микроорганизмов удалены, а рабочая зона обеззаражена после оценки риска в соответствии с протоколом Руководства по безопасности. Кроме того, должны быть утверждены специальные протоколы по обеззараживанию, очистке и дезинфекции каждого предмета оборудования в случае протечки или иного происшествия, которое могло повлечь за собой биологическое, химическое или радиоактивное заражение, а также перед обслуживанием или ремонтом оборудования.

### *Вентиляция лабораторий*

Проектирование вентиляции помещений — важнейший этап, которому специалисты уделяют повышенное внимание. Нюансом при установке вентиляции в лаборатории является значительный перечень нормативных требований, которым должна соответствовать встраиваемая система. В зависимости от типа лаборатории выбирается оборудование, способное в полной мере обеспечить необходимые параметры влажности, температуры и скорости воздушного потока. Важнейшим показателем при проектировании лабораторий считается минимально допустимая кратность воздухообмена. Для лабораторий различного типа этот показатель может колебаться в пределах от 12 до 20. На практике кратность воздухообмена представ-



ляет собой необходимое для эффективной очистки воздуха от испарений и летучих веществ количество полных обновлений воздуха в помещении каждый час. Такая интенсивная вентиляция лабораторий является очень энергозатратной, и на данный момент перед проектировщиками систем вентилирования и кондиционирования стоит задача уменьшить допустимую кратность воздухообмена без ущерба для безопасности работы в лаборатории. А значит, есть необходимость в усилении эффективности систем вентиляции лабораторий.

Вентиляция лабораторий не является самодостаточной системой. Согласно требованиям безопасности, лаборатория должна быть оборудована системой вытяжки, устройством для очистки воздуха, его обеззараживания (последний пункт актуален для бактериологических лабораторий). Важно, чтобы в помещениях лабораторий были окна, которые открываются. Монтаж вентиляции в лабораториях требует соблюдения правил, которые в зависимости от типа проводимых исследований могут отличаться между собой. Так, для лабораторий, расположенных в жарком климате (четвертом типе климатической зоны), кроме системы вентиляции, обязательна установка кондиционера.

Принцип рециркуляции воздуха в системе вентиляции лабораторий допускается лишь в том случае, когда в помещении не проводятся исследования, связанные с выделением опасных, взрывоопасных или вредных веществ.

### ***Требования к персоналу и правила работы в культуральной лаборатории***

Весь персонал должен иметь задокументированное подтверждение проведенного обучения, связанного с потенциальным риском, сочетающимся с работой с любым медицинским (клиническим) лабораторным устройством.

Также персонал должен быть информирован о необходимости известить личного врача о своей работе в медицинской лаборатории. Кроме того, нужно побудить весь персонал провести иммунизацию для предупреждения инфекций, вызываемых организмами, с которыми он имеет постоянный контакт. Например, всем сотрудникам, работающим или обращающимся с человеческой кровью, сывороткой, биологическими жидкостями

или тканями, должна быть предложена вакцинация против гепатита В. Отчеты об иммунизации следует хранить в соответствии с требованиями ГОСТ Р ИСО 15189.

Обслуживающий персонал, не входящий в штат лаборатории, лица, работающие по контракту, должны быть предупреждены о всех опасностях, которые они должны учитывать. Заведующему лабораторией необходимо обеспечить выполнение программы обучения правилам безопасности персонала, связанного с лабораторией, включая транспортных рабочих и уборщиц, особое внимание уделив обучению практике безопасной работы. Программа всестороннего обучения должна быть документально оформлена и включать в себя вводное обучение новых сотрудников и периодическое повторное обучение уже имеющих опыт работников. От сотрудника требуется прочесть инструкцию по безопасности перед началом работы в технической зоне, а также получить письменное подтверждение с указанием даты, что он прошел соответствующее обучение и что инструкция по безопасности изучена и понята. Программа обучения безопасности должна касаться по меньшей мере предупреждения инфицирования, возгорания, химической, радиационной и биологической опасностей и готовности к возникновению нештатной ситуации. Письменный план обучения должен быть разработан применительно должностной инструкции сотрудника с учетом таких условий, как беременность, иммунодефицит или физическая неполноценность. Должна существовать система оценки понимания каждым сотрудником информации, содержащейся в этом плане.

#### *Ответственность персонала*

Пища, напитки и подобные вещества должны содержаться только в зонах, отведенных для их приготовления и потребления. Потребляемые пища и напитки необходимо хранить только в специально отведенных для этого холодильниках, размещенных вне лабораторных зон. Пищевые продукты не должны находиться вместе с реагентами, кровью и другими потенциально инфицированными материалами. Холодильники должны иметь специальную маркировку, указывающую, для хранения чего они предназначены.

Курение должно быть запрещено в рабочей технической зоне. Не допускается курение за 1,5—2 часа перед началом работы сотрудника в чистых помещениях. В технических рабочих зонах необходимо запретить применение косметики, обработку контактных линз, длинные волосы заколоть назад. Важно держать волосы вдали от движущегося оборудования. Мужчины с бородами должны соблюдать такие же меры предосторожности. Кольца, серьги, наручные часы, браслеты, ожерелья и другие украшения не следует носить в лабораторных технических зонах, если существует опасность попадания их в оборудование или загрязнения инфекционными веществами или химическими реагентами. Допускается применять крем для рук и одноразовые покрытия для волос и бород.

#### *Личные вещи*

Личные вещи, одежда и косметика не должны находиться в местах, где возможно их заражение, необходимо создать условия для безопасного и надежного их хранения. Праздничные украшения и другие декорации, которые могут представлять опасность загрязнения или возгорания, не должны применяться в технической рабочей зоне. Украшения не следует крепить к источникам света, подставкам для светильников или техническим инструментам.

***Одежда и средства индивидуальной защиты, включая перчатки, средства защиты глаз, лица, ног и органов дыхания.*** В лаборатории должно быть достаточное количество чистой защитной одежды (например, комбинезонов и халатов), соответствующее уровню риска, для обеспечения персонала и посетителей лаборатории. Неиспользуемая защитная одежда должна находиться в предназначенном для этого месте, вдали от радиаторов, труб парового отопления, нагревателей и открытого пламени. Загрязненная защитная одежда должна быть тщательно обеззаражена после химического и биологического загрязнения и помещена в специально маркированные непроницаемые мешки для транспортировки. Защитную одежду нужно менять через соответствующие интервалы времени с целью соблюдения чистоты, в случае загрязнения опасными материалами ее необходимо поменять немедленно. Защитную одежду следует снимать, покидая лабораторную зону. Если существует высокая веро-

ятность разбрызгивания опасных веществ на сотрудников или посетителей, необходимо применять одноразовые пластиковые фартуки или непромокаемые халаты, а также другие защитные средства: перчатки, маски, очки, шапки, защитные экраны для лица. Процедуры, сопровождающиеся образованием аэрозолей при работе с пробами, содержащими микроорганизмы, следует проводить в боксах биологической безопасности. Надежные защитные очки, экраны для защиты лица и другие средства защиты глаз и лица необходимо применять при обработке опасных материалов. Контактные линзы не защищают от брызг, поэтому при их использовании следует прибегнуть к дополнительным защитным приспособлениям. Защитные очки и экраны должны быть предусмотрены и для защиты от лазерного, ультрафиолетового и инфракрасного излучения.

При всех лабораторных операциях для обеспечения защиты от химических реагентов, биологических опасностей, радиоактивного загрязнения, холода или жара, загрязнения продуктов, предметов с острыми краями и абразивов должны быть предоставлены перчатки, удовлетворяющие требования комфортности, соответствия размерам руки, гибкости, способности захватывать, устойчивости против стирания, прокалывания и разрезания при проводимых манипуляциях и полноценно защищающие от присутствующих опасностей. Сотрудникам, страдающим аллергией или другими реакциями, например на натуральный латекс, тальк, крахмал или винил, должны предоставляться перчатки, не посыпанные порошком и/или другими альтернативными материалами. Персонал лаборатории необходимо обучить выбору, надеванию и снятию перчаток до и после соответствующего использования.

Обувь должна быть удобной, с нескользящей подошвой. Открытые сандалии не приемлемы в качестве лабораторной обуви. Рекомендуются кожаная или синтетическая непромокаемая обувь. Если при работе неизбежно расплескивание жидкостей, следует использовать одноразовые непромокаемые бахилы. Для повседневной работы в лаборатории рекомендуется носить удобные эргономичные туфли без каблуков.

При необходимости применения во время технической деятельности индивидуальных средств защиты органов дыхания (масок, индивидуальных респираторов) в описание методик

безопасной работы должны быть включены инструкции по их использованию и содержанию в порядке. Респираторы следует применять только в соответствии с инструкциями и умениями, приобретенными в результате обучения. Необходимо принять меры по наблюдению за рабочими местами, медицинской оценке и надзору за сотрудниками, использующими респираторы, с целью обеспечения их правильного применения. Может потребоваться тестирование индивидуальной подгонки респираторов. Следует иметь в виду, что персонал, имеющий бороды, не может быть полностью защищен респиратором.

Сотрудники лаборатории должны мыть руки немедленно после состоявшегося или возможного контакта с кровью, биологическими жидкостями или другими загрязненными материалами, даже если при этом были надеты перчатки. Руки должны быть вымыты после снятия перчаток, до и после туалета, перед уходом из лаборатории, перед едой или курением, перед контактом с пациентом и после него. Весь персонал, работающий в лаборатории или посещающий ее, должен мыть руки независимо от того, были ли они загрязнены, а также всякий раз покидая техническую зону. Сотрудникам, страдающим аллергией или другими реакциями на специфические компоненты, содержащиеся в определенных антисептических средствах, должны предоставлять альтернативные материалы для дезинфекции рук. Раковины для мытья рук не должны быть использованы для слива крови или биологических жидкостей. В местах, где доступ к таким раковинам ограничен, в качестве альтернативы возможно использование содержащих спирт «безводных» средств для очистки рук.

Лаборатория должна обеспечить обучение персонала приемам первой помощи. Следует иметь материалы для уменьшения неблагоприятных эффектов и несчастных случаев, происходящих с людьми в лаборатории, при работе с химическими, токсическими или потенциально инфицированными материалами. Необходимо располагать правилами лечения и, если требуется, немедленного оказания экстренной медицинской помощи, соответствующей опасностям, которые вероятны в лаборатории. Весь персонал должен быть ознакомлен с процедурами, которым необходимо следовать в случае ранений иглами.

### *Организация рабочего места*

Перед тем как приступить к обработке проб и выделению культур клеток, необходимо организовать работу в лаборатории так, чтобы все процедуры выполнялись в логической последовательности и не представляли опасности для персонала. Все манипуляции должны быть стандартизованы, а материалы находиться на своих постоянных местах, чтобы обеспечить максимальную безопасность работы. Для лаборанта-левши, возможно, удобнее расположить оборудование и реактивы в противоположном (зеркальном) порядке.

Ламинарные шкафы или боксы предназначены для создания защищенного закрытого пространства с определенными параметрами микроатмосферы. Концентрация частиц пыли, микроорганизмов, химических паров и аэрозолей в рабочем объеме должна соответствовать заданным условиям. Многие конструкции ламинарных шкафов обладают и терморегулирующими свойствами, что позволяет создавать микроклимат с температурой, отличающейся от температуры окружающей среды. Предмет исследования, защищенный ламинарным шкафом, находится за прозрачным стеклом, сквозь которое исследователь может наблюдать за процессами, происходящими внутри.

*Обратите внимание на следующие вопросы:*

1. Можете ли вы поместить колени под рабочую поверхность ламинарного шкафа, удобно ли вы при этом сидите? Достаточно ли близко к рабочему пространству? Располагаются ли руки, по крайней мере наполовину, внутри ламинарного шкафа?

2. На правильном ли месте располагается подножка?

3. Можете ли вы видеть, что вы делаете, не напрягая шею?

4. Перфорирована ли рабочая поверхность, и если да, создаст ли это затруднения при пипетировании и диспенсировании жидкостей (предпочтительна сплошная рабочая поверхность с отверстиями для вентиляции в передней и задней частях)?

5. Легко ли удаляется рабочая поверхность при уборке?

6. Если рабочая поверхность поднимается, острые или закругленные у нее края? Нет ли опасности порезаться при уборке?

7. Нет ли трещин на рабочей поверхности, которые могут накапливать споры и другие загрязнения? Некоторые шкафы

имеют разделенную на секции рабочую поверхность, что облегчает уборку, но создает капиллярные щели при нормальном рабочем расположении секций.

8. Достаточно и правильно ли расположено освещение?

9. Разместится ли этот шкаф в лаборатории?

10. Размещенный на постоянном месте, будет ли шкаф удобен для работы и обслуживания? (Уточните это у обслуживающего персонала, а не у продавца!) Между боковыми стенками шкафов должно быть как минимум 500 мм.

11. Будет ли достаточно места над шкафом для вентиляции в комнате или установления воздуховода с выводом воздуха наружу?

12. Не будут ли воздушные потоки из других шкафов, комнатной вентиляции, независимой системы кондиционирования воздуха перемешиваться с воздушными массами рабочего места данного ламинарного шкафа? Не будет ли выхода воздуха или аэрозолирования воздуха за счет турбулентных потоков? Во избежание этого, расположите передние поверхности противоположно стоящих шкафов как минимум на расстоянии 2000 мм или, что предпочтительнее, 3000 мм и проведите испытания с участием инженера с опытом работы с микробиологическими ламинарными шкафами.

Таким образом, соблюдение правил асептики и антисептики, требований к организации, оснащению и персоналу культуральных лабораторий позволит обеспечить получение качественных культур клеток и безопасность исследователей.

## **2.6. Культуральные среды, ростовые факторы**

Основные условия, необходимые для оптимального роста клеток: контролируемый температурный режим, субстрат для прикрепления клеток (для адгезивных культур клеток), подходящая культуральная среда, CO<sub>2</sub>-инкубатор для контроля уровня pH, поддержание осмотического давления. Наиболее важным моментом для обеспечения оптимального роста/пролиферации клеток является выбор подходящей культуральной среды, которая представляет собой жидкость или гель, разработанная для поддержания роста/пролиферации клеток различного происхождения. Для обеспечения жизнеспособности клеток в

условиях *in vitro* культуральные среды должны обеспечивать условия, максимально приближенные к условиям *in vivo*: осмолярность, pH, содержать питательные вещества, микроэлементы и факторы роста. Поэтому среды для культивирования клеток имеют достаточно сложный состав и состоят из определенного соотношения аминокислот, витаминов, солей, глюкозы, гормонов, факторов прикрепления, факторов роста, солей, поддерживающих буферную систему и осмотическое давление.

### **Классификация культуральных сред**

Выбор культуральной среды определяется типом клеток и целью исследования. Все культуральные среды подразделяются на естественные и синтетические. В качестве естественных (природных) сред используются различные биологические жидкости (плазма, сыворотка, лимфа, анниотическая жидкость). Реже для культивирований клеток применяют костный мозг, экстракты печени, селезенки или эмбрионов животных. Такие среды являются эффективными для культивирования большинства клеток, однако, ввиду невозможности стандартизации их состава из-за существенного разброса содержащихся в них компонентов, воспроизводимость результатов культивирования значительно варьирует. Кроме того, их использование связано с большой опасностью микробной и вирусной контаминации клеточных культур. В отличие от них, в производстве синтетических сред возможно четко стандартизировать все компоненты состава среды. Соответственно, возможна разработка искусственных сред с заданными свойствами. Среди таких сред выделяют сывороточные (содержащие сыворотку человека или животных), бессывороточные и безбелковые. В зависимости от задач исследования их состав можно модифицировать путем добавления тех или иных компонентов.

### **Основные компоненты культуральной среды**

*Компоненты, обеспечивающие буферную систему культуральной среды.* Культивируемые клетки сильно реагируют на изменение pH-среды. Оптимальное значение pH для большинства клеток лежит в пределах 7,2—7,4. Бикарбонат натрия поддерживает «естественную» буферную систему культуральной сре-



ды ( $\text{CO}_3^{2-}/\text{HCO}_3^-$ ); требуя содержания 5—10%  $\text{CO}_2$  в атмосфере, что легко выполнимо при культивировании клеток в  $\text{CO}_2$ -инкубаторе. ХЕПЕС представляет собой фосфатную соль с буферной емкостью в пределах 7,2—7,4 рН. Не требует контролируемой газовой среды, но в больших концентрациях может быть токсичен для некоторых типов клеток. Феноловый красный используется как индикатор рН: красный при рН 7,4, меняет свой цвет до оранжевого или желтого при уменьшении значения рН. Для культивирования клеток, чувствительных к эстрогену, рекомендуется использовать среду без фенола красного.

*Соли.* Неорганические соли поддерживают осмотическое давление в среде и помогают в регуляции мембранного потенциала, обеспечивая среду ионами натрия, калия и кальция. Осмоляльность среды так же важна, как уровень рН при культивировании клеток. Оптимальное значение осмоляльности лежит в пределах 260—340 мосмоль/кг в зависимости от типа культивируемых клеток.

*Аминокислоты.* Аминокислоты являются строительным материалом для белков; незаменимые аминокислоты всегда входят в состав культуральной среды. Особенно важен L-глутамин; обеспечивает азотом НАД, НАДФН и нуклеотиды, являясь вторичным источником энергии для метаболизма клетки. Заменяемые аминокислоты также иногда добавляются в культуральную среду.

*Углеводороды.* Большинство сред включают в себя глюкозу и галактозу как источник энергии для клеток.

*Белки и пептиды.* Наиболее часто используемыми белками и пептидами являются альбумин, трансферрин и фибронектин; они особенно важны при бессывороточном культивировании. Альбумин связывает воду, соли, гормоны и витамины и транспортирует их между клетками и тканями. Фибронектин играет ключевую роль в адгезии клеток. Трансферрин — белок-переносчик железа, обеспечивающий железом клеточную мембрану.

*Жиры и жирные кислоты.* Особенно важны при бессывороточном культивировании, так как сыворотка обычно содержит их.

*Витамины.* Многие витамины необходимы для клеточного роста и пролиферации. В культуральную среду обычно добавляют рибофлавин, тиамин и биотин.

*Добавки.* Наиболее важный компонент культуральной среды — сыворотка; она добавляется перед применением, примерно 5—10%. Сыворотка представляет собой смесь альбуминов, факторов роста и ингибиторов роста; является источником витаминов, аминокислот, белков, углеводов, жиров, микроэлементов, факторов роста. Наиболее часто используют бычью и телячью эмбриональную сыворотку.

Факторы роста, цитокины, гормоны добавляются в культуральную среду для пролиферации и активации клеток. Большинство ростовых факторов присутствуют в сыворотке в концентрации нескольких нанограммов на миллилитр и ниже. Некоторые из этих факторов специфичны для клеток на определенной стадии дифференцировки, действие других не ограничено каким-либо одним типом клеток. Один и тот же тип клеток может быть стимулирован различными ростовыми факторами. Например, фибробласты размножаются в ответ на фактор роста фибробластов, фактор роста эпидермиса, фактор роста, синтезируемый тромбоцитами и соматомединами. Все эти вещества — митогены (стимулируют митоз). Еще одним важным фактором роста практически для всех типов клеток является гормон инсулин. Из других гормонов наиболее часто применяются глюкокортикоиды (гидрокортизон, дексаметазон), стероиды (эстрадиол, тестостерон, прогестерон) и гормоны щитовидной железы (трийодтиронин). Гормоны стимулируют или подавляют рост в зависимости от типа клеток и их плотности. Например, глюкокортикоиды влияют на пролиферацию клеток, изменяя их чувствительность к факторам роста.

Антибиотики и антимикотики добавляются для предотвращения контаминации культуральной среды бактериями и грибами; однако антибиотики не предотвращают заражение культуральной среды микоплазмой. Для бактериологической стерильности в солевые растворы и питательные среды вводят антибиотики: пенициллин (натриевая соль), стрептомицин (хлоркальциевый комплекс) и микостатин (нистатин). Пенициллин и стрептомицин добавляют в солевые растворы и питательные среды при их изготовлении из расчета 100—200 ЕД каждого на 1 мл среды. Учитывая, что при длительном хранении солевых растворов и питательных сред эти антибиотики инактивируются, их

добавляют в той же концентрации в среды непосредственно перед применением. Микостатин вносят в среды при их приготовлении из расчета 20—25 ЕД на 1 мл. Микостатин в количестве 1 млн ЕД растворяют при комнатной температуре в 25 мл 80°-ного этилового спирта путем энергичного встряхивания. Раствор фильтруют через малый фильтр Зейтца и добавляют по 0,5 мл на 1 л среды, что соответствует 20 ЕД активности в 1 мл. Спиртовой раствор антибиотика годен в течение суток при хранении в холодильнике (2—4°С). Можно применять микостатин в виде раствора в 0,1 N NaOH, содержащего в 1 мл 25 000 ЕД. Раствор антибиотика стерилизуют фильтрованием через фильтр Зейтца и добавляют по 1 мл на 1 л среды. В указанных концентрациях антибиотика не влияют на жизнеспособность клеток и репродукцию большинства вирусов, в больших концентрациях они могут оказаться токсичными для клеток.

**Основные культуральные среды,  
используемые в клеточных технологиях**

*Среда MEM* (Minimum Essential Medium), или среда Игла, была разработана Г. Иглом и является наиболее распространенной для культивирования клеток наряду со средой DMEM. Среда MEM содержит 13 аминокислот, 6 водорастворимых витаминов, холин и инозит, выполняющие роль углеводородного субстрата. Есть модификации среды MEM с солями Эрла и Хэнкса, а также  $\alpha$ -модификация среды MEM с содержанием всех 21 аминокислот и солей Эрла.

*Среда DMEM* (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) является модификацией среды BME (Basal Medium Eagle) и содержит в 4 раза больше аминокислот и витаминов, а также различные добавки, улучшающие рост клеток. Изначально среда DMEM была с содержанием глюкозы (1 г/л) и применялась для культивирования эмбриональных клеток мыши. Затем появились модификации среды DMEM (с высоким и пониженным содержанием глюкозы, пирувата натрия, различных добавок) для культивирования клеток различных типов, в том числе не-трансформированных клеток и гибридом. Среда DMEM наиболее распространена для культивирования клеток наряду со средой MEM.

*Среда DMEM/F-12* в соотношении 1:1 применяется для выращивания широкого спектра клеточных культур. Изначально она была разработана для бессывороточного культивирования СНО-клеток, клеток легких и мышинных L-клеток. В связи с богатым содержанием питательных веществ в среду DMEM/F-12 можно добавлять относительно небольшое количество эмбриональной бычьей сыворотки (FBS — fetal bovine serum) либо использовать без сыворотки, но тогда необходимо добавлять инсулин, трансферин, эпидермиальный фактор роста и др.

*Среда RPMI-1640* была разработана в Roswell Park Memorial Institute (Комплексном онкологическом центре Розуэлл-Парк; откуда и берет свое название) в 1966 г. Муром и его коллегами для культивирования лейкоцитов. В настоящее время используется для широкого спектра клеточных культур.

*Среда IMDM* (Iscove's Modified Dulbecco's Medium) — это модификация среды DMEM, содержащая селенит натрия, добавочные аминокислоты и витамины, пируват натрия, ХЕПЕС и нитрат калия вместо нитрата железа. Среда IMDM используется для поддержания культуры клеток В-лимфоцитов, В-клеток, стимулированных полисахаридами, Т-лимфоцитов и гибридом.

*Среда 199* первоначально была разработана для поддержания культуры первичных эксплантов. В настоящее время среда 199 применяется для продукции вакцин, культивирования первичных эксплантов и тканей хрусталика. Изначально она готовилась с солями Эрла, но есть модификация и с солями Хэнкса.

*Среды F-12 и F-10* изначально были разработаны Хэмом (Ham's nutrient mixture) для культивирования клеток СНО, HeLa и мышинных L-клеток. Обе среды были разработаны для бессывороточного культивирования. Среда F-12 применяется для культивирования широкого спектра клеток млекопитающих и гибридом.

*Среда Грейса* (Grace's Insect Media) используется для поддержания клеточных линий, полученных от бабочек и некоторых двукрылых.

*Среда Шнейдера* (Schneider's Insect Media) изначально разрабатывалась для дрозофилы, но может применяться и для поддержания клеточной культуры других двукрылых.

*Соли Хэнкса* (Hanks' Balanced Salt) изначально были разработаны для поддержания культуры клеток в атмосфере без  $\text{CO}_2$ . Для диссоциации клеток используются соли Хэнкса без ионов кальция и магния.

*Соли Эрла* (Earle's Balanced Salts) применяются для суспензионных культур, а также при проблеме слипания клеток.

*Буфер фосфатный Дульбекко* применяется для промывки клеток. Кальций и магний способствуют слипанию клеток; фосфатный буфер без кальция и магния используют для суспензионных культур.

Получение высококлеточной и жизнеспособной культуры клеток с высоким пролиферативным потенциалом в значительной степени определяется подбором культуральной среды. Имеющийся в настоящее время широкий выбор культуральных сред при грамотном подборе добавочных компонентов (факторов роста, сывороток, антибиотиков и др.) позволяет получать и длительно поддерживать рост большинства клеточных линий.

## **2.7. Стерилизация материала**

### **Оборудование для очистки воды**

Качество воды, используемой для приготовления питательных сред либо для мытья культуральной посуды, имеет важное значение. До недавнего времени такая вода приготавливалась путем простой и двукратной дистилляции питьевой воды. В настоящее время наряду с традиционными широкое применение получили методы очистки воды путем использования физико-химических процессов обратного осмоса, ионного обмена и мембранной фильтрации. Водопроводная вода, используемая в качестве исходной и прошедшая в этих установках через очистку обратным осмосом, поступает на фильтры из активированного угля, с них — колонки с ионообменными смолами и затем — на мембранные фильтры с диаметром пор 0,22 мкм. При необходимости вода дополнительно подвергается воздействию мощного потока УФ-облучения. Для очистки воды подобным способом наиболее часто применяются установки типа ОВ-1, состоящие из двух конструктивно самостоятельных частей, допускающих независимое использование, — ОВ-2 и ОВ-3. Установка ОВ-2 осуществляет приготовление общелабораторной

воды, превосходящей по качеству очистки дистиллированную воду. Установка ОВ-3 предназначена для получения пригодной для приготовления питательных сред сверхчистой из общелабораторной или дистиллированной воды.

### **Водоподготовка в лаборатории, стандарты чистоты используемой в лабораториях воды**

Потребность в чистой воде присуща человеку не только в быту. Вода, используемая производственными предприятиями, в частности медицинскими, химическими и биохимическими лабораториями, также нуждается в тщательной очистке. В лабораториях самого различного профиля подготовленная вода используется для мытья лабораторной посуды, а для проведения высокоточных методов анализа (например, высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ), атомно-абсорбционной спектроскопии, электрофореза) требуется особо чистая вода, практически полностью лишенная возможных примесей. К таким примесям в первую очередь относят органические вещества, неорганические соли, растворенные газы и микроорганизмы. Водоподготовка, то есть очистка воды от растворенных или взвешенных в ней веществ, является обязательным и ответственным этапом при проведении подавляющего большинства работ в современной лаборатории.

Согласно действующим отечественным и международным стандартам, различают *три степени чистоты лабораторной воды*, определяемой в соответствии с ее электрической проводимостью и оптической плотностью.

*Тун I* (сверхчистая вода, вода реагентного качества) применяется при приготовлении элюентов для ВЭЖХ, растворов для ПЦР-анализа, питательных сред для клеточных культур эукариот, буферов, растворов для двумерного электрофореза, холостых проб и стандартов для гель-хроматографии, масс-спектрометрических методов.

*Тун II* (чистая вода, вода аналитического качества) подходит для большинства аналитических задач; приготовления буферов, химических и биохимических реагентов; питания автоклавов, клинических анализаторов и другого лабораторного оборудования; мытья посуды.

*Тип III* (вода общелабораторного применения) используется для приготовления некритических растворов, микробиологических сред; питания автоклавов, парогенераторов, моечных машин; ополаскивания посуды; питания систем, производящих воду типа I.

### ***Приборы и аппараты для мытья и стерилизации посуды***

Приборы и аппараты для мытья и стерилизации посуды обеспечивают выполнение всех этапов технологического процесса:

— предварительную стерилизацию посуды, поступающей из опыта, насыщенным водяным паром в паровых стерилизаторах (автоклавах);

— предварительное замачивание в водных растворах химических реагентов (5%-ном растворе гипохлорита натрия, 3%-ном растворе перекиси водорода и т. д.);

— полоскание после замачивания холодной или слегка нагретой водой;

— мытье горячим раствором детергента с низким пенообразованием;

— вторичное полоскание горячей водой;

— финишное полоскание дистиллированной или общелабораторной водой;

— сушку в сушильных шкафах с принудительной продувкой горячим воздухом;

— упаковку и финишную стерилизацию в паровых или воздушных стерилизаторах.

Оптимальным вариантом для мытья посуды является использование автоматических моечных машин «Forma Scientific», «Miele», «Hotpack-Heinicke» либо отечественных машин типа РЗ-АММ.

### ***Подготовка материала к стерилизации***

Дезинфекция — обеззараживание объектов окружающей среды путем уничтожения патогенных для человека и животных микроорганизмов и вирусов физическими способами и с помощью химических веществ: растворами хлорной извести (0,1—10%-ным), формалина, хлорамина (0,5—5%-ным), фенола (3—5%-ным), лизола (3—5%-ным), едкой щелочи

(2—3%-ным) и др. Выбор дезинфицирующего вещества и его концентрации зависит от материала, подлежащего дезинфекции. В лабораториях для дезинфекции боксов чаще всего применяют пары формалина (30—35 мл 40%-ного раствора формальдегида на 1 м<sup>3</sup> помещения), β-пропиолактон (1,1 л на 100 м<sup>3</sup> помещения) или испаряют карболовую кислоту (не реже одного раза в неделю) и ежедневно делают влажную уборку с применением растворов хлорамина, гидроксида натрия и др.

### **Стерилизация лабораторного оборудования**

Стерилизация (от латин. *sterilis* — бесплодный) — обеспложивание, освобождение от всего живого. В микробиологической практике стерилизации подвергают инструменты, посуду, питательные среды и другие материалы, применяемые в работе. Стерильность может быть достигнута при помощи физических и химических методов. Стерилизация, в отличие от дезинфекции, предусматривает уничтожение в стерилизуемом объекте всех вегетативных и споровых, патогенных и непатогенных микроорганизмов. Стерилизацию производят различными способами: паром, сухим горячим воздухом, кипячением, фильтрацией и т.д. Выбор того или иного способа стерилизации определяется качеством и свойствами микрофлоры стерилизуемого объекта.

*Подготовка и стерилизация лабораторного оборудования.* Перед стерилизацией лабораторную посуду моют и сушат. Пробирки, флаконы, бутылки, матрацы и колбы закрывают ватно-марлевыми пробками. Поверх пробок на каждый сосуд (кроме пробирок) надевают бумажные колпачки. Резиновые, корковые и стеклянные пробки стерилизуют в отдельном пакете, привязанном к горлышку посуды. Чашки Петри стерилизуют завернутыми в бумагу по 1—10 штук. Пастеровские пипетки по 3—15 штук заворачивают в оберточную бумагу. В верхнюю часть каждой пипетки вкладывают кусочек ваты, предупреждающий попадание материала в окружающую среду. При завертывании пипеток нужно соблюдать большую осторожность, чтобы не обломать запаянные концы капилляров. Во время работы пипетки из пакета вынимают за верхний конец. В верхнюю часть градуированных пипеток, как и в пастеровские пипетки, вставляют предохранительную вату и затем заворачивают



в плотную бумагу, нарезанную предварительно полосками шириной 2—2,5 см и длиной 50—70 см. Полоску кладут на стол, левый конец ее загибают и завертывают им кончик пипетки, затем, вращая пипетку, наворачивают на нее ленту бумаги. Для того чтобы бумага не разворачивалась, противоположный конец ее закручивают или приклеивают. На бумаге надписывают объем завернутой пипетки. При наличии пеналов градуированные пипетки стерилизуют в них.

*Лабораторную посуду стерилизуют:*

а) сухим жаром при температуре 180 и 160°C соответственно 1 ч и 150 мин;

б) в автоклаве при давлении 1,5 атм. в течение 60 мин, для уничтожения споровой микрофлоры — 90 мин при 2 атм.

*Стерилизация шприцев.* Шприцы стерилизуют в разобранном виде: отдельно цилиндр и поршень в 2%-ном растворе гидрокарбоната натрия 30 мин. При работе со спороносной микрофлорой стерилизацию производят в автоклаве при  $132\pm 2^\circ\text{C}$  (2 атм.) в течение 20 мин, при  $126\pm 2^\circ\text{C}$  (1,5 атм.) — 30 мин. Простерилизованный шприц собирают после того, как он остынет, в цилиндр вставляют поршень, надевают иглу, предварительно вынув из нее мандрен. Иглу, цилиндр и поршень берут пинцетом, который стерилизуют вместе со шприцем.

*Стерилизация металлических инструментов.* Металлические инструменты (ножницы, скальпели, пинцеты и пр.) стерилизуют в 2%-ном растворе гидрокарбоната натрия, который предупреждает появление ржавчины и потерю остроты. Лезвия скальпелей и ножниц перед погружением в раствор рекомендуется обертывать ватой.

*Стерилизация бактериальных петель.* Бактериальные петли, сделанные из платиновой или никромовой проволоки, стерилизуют в пламени спиртовой или газовой горелки. Такой способ получил название прокаливания или фламбирования. Петлю в горизонтальном положении вносят в нижнюю, наиболее холодную, часть пламени горелки, чтобы не произошло разбрызгивания сжигаемого патогенного материала. После того как он сгорит, петлю переводят в вертикальное положение, накаливают докрасна вначале нижнюю, затем верхнюю часть проволоки и прожигают петледержатель. Прокаливание в целом занимает 5—7 с.

*Стерилизация бумаги, марли и ваты.* Вату, марлю, фильтровальную бумагу стерилизуют в сухожаровой печи при температуре 160°C в течение часа от момента показания термометром данной температуры или в автоклаве при давлении 1 атм. в течение 30 мин. Перед стерилизацией бумагу и марлю нарезают кусочками, а вату сворачивают в виде шариков или тампонов нужной величины. После этого каждый вид материала в отдельности по одной или несколько штук заворачивают в плотную бумагу. При разрыве пакета материал следует стерилизовать повторно, так как стерильность его нарушается.

*Стерилизация перчаток и других резиновых изделий.* Изделия из резины (перчатки, трубки и т.д.), загрязненные вегетативной формой микробов, стерилизуют кипячением в 2%-ном растворе гидрокарбоната натрия или текучим паром в течение 30 мин; при загрязнении спороносной микрофлорой — в автоклаве при давлении 1,5—2 атм. в течение 30 или 20 мин. Резиновые перчатки перед стерилизацией внутри и снаружи пересыпают тальком для предохранения их от склеивания. Между перчатками прокладывают марлю. Каждую пару перчаток заворачивают отдельно в марлю и в таком виде помещают в биксы.

Стерилизацию — обеспложивание, то есть полное уничтожение микроорганизмов и вирусов в различных материалах, проводят физическими (воздействием высокой температуры, путем ультрафиолетового облучения, фильтрацией жидкостей через бактериальные фильтры) и химическими методами.

### **Виды стерилизации**

*Стерилизацию кипячением* производят в стерилизаторе, в который наливают дистиллированную воду, так как водопроводная образует накипь. (Стеклянные предметы погружают в холодную, металлические — в горячую воду с добавлением гидрокарбоната натрия.) Стерилизуемые предметы кипятят на слабом огне 30—60 мин. Началом стерилизации считается момент закипания воды в стерилизаторе. По окончании кипячения инструменты берут стерильным пинцетом, который кипятят вместе с остальными предметами.

*Стерилизация сухим жаром* производится в печи Пастера. Подготовленный к стерилизации материал кладут на полки

так, чтобы он не соприкасался со стенками. Шкаф закрывают и после этого включают обогрев. Продолжительность стерилизации при температуре 150°C — 2 ч, при 165°C — 1 ч, при 180°C — 40 мин, при 200°C — 10—15 мин (при 170°C бумага и вата желтеют, а при более высокой температуре обугливаются). Началом стерилизации считается момент, когда температура в печи достигнет нужной высоты. По окончании срока стерилизации печь выключают, но дверцы шкафа не открывают до полного охлаждения, так как холодный воздух, поступающий внутрь шкафа, может вызвать образование трещин на горячей посуде.

**Стерилизацию паром под давлением** производят в автоклаве, который состоит из двух котлов, вставленных один в другой, кожуха и крышки. Наружный котел называют водопаровой камерой, внутренний — стерилизационной камерой. В водопаровом котле происходит образование пара. Во внутренний котел помещают стерилизуемый материал. В верхней части стерилизационного котла имеются небольшие отверстия, через которые проходит пар из водопаровой камеры. Крышка автоклава герметически привинчивается к кожуху. Кроме перечисленных основных частей, автоклав имеет ряд деталей, регулирующих его работу: манометр, водомерное стекло, предохранительный клапан, выпускной, воздушный и конденсационный краны. Началом стерилизации считается момент, когда стрелка манометра показывает заданное давление. После этого интенсивность подогрева уменьшают, чтобы давление в автоклаве в течение нужного времени оставалось на одном уровне. По окончании времени стерилизации подогревание прекращают.

**Стерилизация текучим паром** производится в текучепаровом аппарате Коха или в автоклаве при незавинченной крышке и открытом выпускном кране. Аппарат Коха представляет собой металлический полый цилиндр с двойным дном. Пространство между верхней и нижней пластинками дна заполняют на  $\frac{2}{3}$  водой (для спуска оставшейся после стерилизации воды есть кран). В центре крышки аппарата имеются отверстие для термометра и несколько небольших отверстий для выхода пара. Стерилизуемый материал загружают в камеру

аппарата неплотно, чтобы обеспечить возможность наибольшего контакта его с паром. Началом стерилизации считается время с момента закипания воды и поступления пара в стерилизационную камеру. В текучепаровом аппарате стерилизуют главным образом питательные среды, свойства которых изменяются при температуре выше 100°C. Стерилизацию текучим паром следует проводить повторно, так как однократное прогревание при температуре 100°C не обеспечивает полного обеззараживания.

**Тиндализация** — дробная стерилизация с применением температуры ниже 100°C, предложенная Тиндалем. Прогревание стерилизуемого материала производят в водяной бане, снабженной терморегулятором, по часу при температуре 60—65°C в течение 5 дней или при 70—80°C в течение 3 дней. В промежутках между прогреваниями обрабатываемый материал выдерживают при температуре 25°C для прорастания спор в вегетативные формы, которые погибают при последующих прогреваниях. Тиндализацией пользуются для обеспложивания питательных сред, содержащих белок.

### **Стерилизация питательных сред**

Одним из главных требований к жидким питательным средам для клеточных культур является их стерильность, достигаемая в ряде случаев так называемой стерилизующей фильтрацией, освобождающей питательные среды от примесных частиц, бактерий и коллоидов. Следует различать микро- и ультрафильтрацию сред. При микрофильтрации из жидкости удаляются частицы примесей и бактерий размерами от 0,25 до 10 мкм. Ультрафильтрация приводит к извлечению из раствора очень мелких частиц и коллоидов, а также молекул растворенных веществ с молекулярными массами от 1 тыс. до 1 млн. Процесс микрофильтрации осуществляется пропусканием жидкости через мембранные или глубинные фильтры. Для стерилизующей фильтрации питательных сред чаще всего используются мембранные фильтры диаметром 0,2—0,22 мкм. Для очистки питательных сред пригодны мембранные фильтры, производимые фирмами «Millipore», «Sartorius», «Shleifer-Shull» и др. В общем случае установка для стерилизующей фильтрации состоит

из системы создания избыточного давления на фильтруемую жидкость, стерильного держателя фильтра, фильтрующей мембраны, трубопроводов и сосудов для размещения фильтруемой жидкости, фильтрата.

**Механическую стерилизацию** с помощью бактериальных ультрафильтров применяют для освобождения жидкости от находящихся в ней бактерий, а также для отделения бактерий от вирусов, фагов и экзотоксинов. Вирусы бактериальными фильтрами не задерживаются, и поэтому ультрафильтрацию нельзя рассматривать как стерилизацию в принятом значении этого слова. Для изготовления ультрафильтров применяют мелкопористые материалы (каолин, асбест, нитроцеллюлозу и др.), способные задерживать бактерии.

**Асбестовые фильтры** (фильтры Зейтца) представляют собой асбестовые пластинки толщиной 3—5 мм и диаметром 35 и 140 мм для фильтрации малых и больших объемов жидкости. В нашей стране асбестовые фильтры изготовляют двух марок: «Ф» (фильтрующие), задерживающие взвешенные частицы, но пропускающие бактерии, и «СФ» (стерилизующие), более плотные, задерживающие бактерии. Асбестовые фильтры используются однократно. Мембранные ультрафильтры изготавливаются из нитроцеллюлозы и представляют собой диски белого цвета диаметром 35 мм и толщиной 0,1 мм.

**Бактериальные фильтры** различаются по величине пор и обозначаются порядковыми номерами. Непосредственно перед употреблением мембранные фильтры стерилизуют кипячением. Фильтры помещают в дистиллированную воду, подогретую до температуры 50—60 °С, чтобы предупредить их скручивание, кипятят на слабом огне в течение 30 мин, меняя 2—3 раза воду. Простерилизованные фильтры во избежание их повреждения вынимают из стерилизатора фламбированным и остуженным пинцетом с гладкими кончиками. Для фильтрации жидкостей бактериальные фильтры монтируют в специальные фильтровальные приборы, в частности в фильтр Зейтца. Он состоит из двух частей: верхней, имеющей форму цилиндра или воронки, и нижней — опорной части аппарата, с так называемым фильтровальным столиком из металлической сетки или чистой керамической пластинки, на которую помещают мембранный

или асбестовый фильтр. Опорная часть аппарата имеет форму воронки, суживающаяся часть которой находится в резиновой пробке горлышка колбы Бунзена. В рабочем состоянии верхнюю часть прибора фиксируют на нижней с помощью винтов.

### **Физические методы стерилизации**

Для стерилизации применяют также физические методы:

а) прокаливание в пламени спиртовки или горелки. Данный способ применяют для стерилизации препаративных игл, петель из аппарата Такачи, пинцетов, горловин культуральных сосудов и т. д.;

б) стерилизация кипячением. Этим методом стерилизуют шприцы, мелкий хирургический инструмент, предметные и покровные стекла и другие предметы. Кипятят не менее 30 мин. Однако данный метод не обеспечивает полной стерилизации, так как некоторые вирусы, например вирус гепатита, и споры бактерий могут остаться жизнеспособными;

в) стерилизация ультрафиолетовыми лучами. Метод основан на бактерицидном действии УФ-лучей с длиной волны 260—300 мкм. Для стерилизации воздуха в боксах используют лампы БУВ-15 и БУВ-30. Обычно облучение проводят 1—2 ч;

г) фильтрование жидкостей через бактериальные фильтры. Этим методом пользуются для освобождения питательных сред, сыворотки крови, витаминов и т. д. от бактерий, но не от вирусов.

### **Химические методы стерилизации**

При этом методе используют различные химические вещества. Эти методы основаны на высокой специфической (избирательной) чувствительности микроорганизмов к различным химическим веществам, что обусловливается физико-химической структурой их клеточной оболочки и протоплазмы. Механизм антимикробного действия многих таких веществ еще недостаточно изучен. Считают, что некоторые вещества вызывают коагуляцию протоплазмы клетки, другие — действуют как окислители, ряд веществ влияет на осмотические свойства клетки, многие химические факторы вызывают гибель микробиологической клетки вследствие разрушения ферментной системы.

Основой любого варианта химической стерилизации является взаимодействие бактерицидного вещества с компонентами микробной клетки или споры.

Химическая стерилизации подразделяется на стерилизацию растворами (веществами) и стерилизацию газами (газовая стерилизация).

*Стерилизацию растворами или веществами* серийно выпускаемой инъекционной продукции в заводских условиях не используют, так как введение в раствор постороннего биологического активного вещества нежелательно из-за возможного химического взаимодействия стерилизующего агента с действующими компонентами, а также из-за возможных побочных действий этого агента на организм человека. Еще одно принципиальное ограничение данного метода связано с тем, что практически любое бактерицидное вещество обладает определенной селективностью и его эффективность проявляется при высоких концентрациях или часто в определенных интервалах рН, недопустимых для живых организмов. Этот вид стерилизации используют для обеззараживания различной аппаратуры, трубопроводов и другого оборудования, применяемого в производстве стерильной продукции.

*Газовая стерилизация.* Своеобразной химической стерилизацией является метод стерилизации газами. Преимущество метода заключается в возможности стерилизации объектов в пластмассовой упаковке, проницаемой для газов. В герметическую камеру вводят стерилизат — смесь этиленоксида и углерода диоксида в соотношении 9:1. Углекислый газ добавляют в связи со взрывоопасностью окиси этилена. При стерилизации стерилизат поступает в аппарат под давлением до 2 кгс/см<sup>2</sup> (196133 Н/м<sup>2</sup>) при температуре 43—45 °С. Продолжительность стерилизации зависит от проницаемости упаковки, толщины слоя материала и продолжается от 4 до 20 ч. Затем этиленоксид удаляют продуванием стерильным воздухом (азотом) или путем вакуумирования. При химической стерилизации газами погибают все вегетативные формы микроорганизмов и плесневые грибы. Для стерилизации донорского материала, растворов кровезаменителей или продуктов, полученных из крови, широко применяют β-пропиолактон.

Главный недостаток химических методов стерилизации — необходимость освобождения простерилизованного объекта от остатков стерилизанта и продуктов возможного взаимодействия. Широкому распространению этого метода препятствуют длительность стерилизации, высокая стоимость, возможность побочного действия химического агента на обслуживающий персонал, однако для ряда лекарственных препаратов это единственно надежный способ стерилизации в современных условиях.

*Использование консервантов* условно можно отнести к методам химической стерилизации. Введение консервантов в растворы проводится в тех случаях, когда нельзя гарантировать сохранение стерильности. При этом возможно снижение температуры стерилизации или сокращение времени ее проведения. Механизмы воздействия консервантов на микроорганизмы очень различны и определяются их химическим строением. Основным результатом при этом является нарушение жизненных функций клетки, в частности инактивация белковой части клеточных ферментов. В зависимости от степени инактивации наступает либо гибель клетки, либо замедление ее жизненных функций.

*При подготовке раздела использованы материалы ООО «Викон-сервис», ООО «Компания Хеликон», ООО «Интерлабсервис», ЗАО «ФИРМА ГАЛЕН», ООО «ДИАЭМ» и др.*



## СПИСОК РЕКОМЕНДУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Азаев М. Ш., Дадаева А. А., Ильичева Т. Н.* Биотехнология : практикум по культивированию клеточных культур. М., 2022.
2. *Блажевич О. В.* Культивирование клеток : курс лекций. Мн., 2004.
3. *Попов Б. В.* Регенеративный потенциал мезенхимных стволовых клеток : монография. СПб., 2015.
4. *Руководство* по надлежащей производственной практике лекарственных средств для человека. М., 2008.
5. *Физико-химические* и механические свойства внеклеточного матрикса как сигналы для управления пролиферацией, дифференцировкой, подвижностью и таксистом клеток : монография / под ред. И. А. Кирилловой. М., 2022.
6. *Фрешни Р. Я.* Культура животных клеток. Практическое руководство. М., 2018.
7. *Чистые помещения* / под ред. А. Е. Федотова. М., 2003.
8. *Шахов В. П., Хлусов И. А., Дамбаев Г. Ц. и др.* Введение в методы культуры клеток, биоинженерии органов и тканей. Томск, 2004.

## Нормативные акты<sup>1</sup>

1. ГОСТ 22340-89. Аквадистилляторы медицинские электрические. Общие технические требования и методы испытаний.
2. ГОСТ 22649-83. Стерилизаторы воздушные медицинские. Общие технические условия.
3. ГОСТ 31598-2012. Стерилизаторы паровые большие. Общие технические требования и методы испытаний.
4. ГОСТ EN 14180-2011. Стерилизаторы медицинского назначения. Стерилизаторы низкотемпературные пароформальдегидные. Технические требования и методы испытаний.

<sup>1</sup> Доступ из справ.-правовой системы «КонсультантПлюс».

5. ГОСТ ISO 10993-12-2015. Изделия медицинские. Оценка биологического действия медицинских изделий. Ч. 12. Приготовление проб и контрольные образцы.

6. ГОСТ ISO 10993-5-2011. Изделия медицинские. Оценка биологического действия медицинских изделий. Ч. 5. Исследования на цитотоксичность: методы *in vitro*.

7. ГОСТ ISO 11138-1-3-2012. Стерилизация медицинской продукции. Биологические индикаторы. Ч. 1—3.

8. ГОСТ ISO 11140-1-5-2011. Стерилизация медицинской продукции. Химические индикаторы. Ч. 1—5.

9. ГОСТ ISO 11607-1-2018. Упаковка для медицинских изделий, подлежащих финишной стерилизации. Ч. 1. Требования к материалам, барьерным системам для стерилизации и упаковочным системам.

10. ГОСТ ISO 13485-2017. Изделия медицинские. Системы менеджмента качества. Требования для целей регулирования.

11. ГОСТ ISO 14160-2011. Стерилизация одноразовых медицинских изделий, содержащих материалы животного происхождения. Валидация и текущий контроль стерилизации с помощью жидких стерилизующих средств.

12. ГОСТ ISO 15883-1/2-2011. Машины моюще-дезинфицирующие. Ч. 1—2.

13. ГОСТ ISO 17511-2011. Изделия медицинские для диагностики *in vitro*. Измерение величин в биологических пробах. Метрологическая прослеживаемость значений, приписанных калибратором и контрольным материалам.

14. ГОСТ ISO/TR 10993-33-2018. Изделия медицинские. Оценка биологического действия медицинских изделий. Ч. 33. Руководство по испытаниям на генотоксичность. Дополнение к ISO 10993-3.

15. ГОСТ ISO/TS 10993-20-2011. Изделия медицинские. Оценка биологического действия медицинских изделий. Ч. 20. Принципы и методы исследования иммунотоксичности медицинских изделий.

16. ГОСТ Р 50444-2020. Приборы, аппараты и оборудование медицинские. Общие технические требования.

17. ГОСТ Р 52379-2005. Надлежащая клиническая практика.

18. ГОСТ Р 52938-2008. Кровь донорская и ее компоненты. Контейнеры с консервированной кровью или ее компонентами. Маркировка.
19. ГОСТ Р 53022.1-4-2008. Технологии лабораторные клинические. Требования к качеству клинических лабораторных исследований. Ч. 1—4.
20. ГОСТ Р 53079.1-4-2008. Технологии лабораторные клинические. Обеспечение качества клинических лабораторных исследований. Ч. 1—4.
21. ГОСТ Р 53133.1-4-2008. Технологии лабораторные клинические. Контроль качества клинических лабораторных исследований. Ч. 1—4.
22. ГОСТ Р 53434-2009. Принципы надлежащей лабораторной практики.
23. ГОСТ Р 53470-2009. Кровь донорская и ее компоненты. Руководство по применению компонентов донорской крови.
24. ГОСТ Р 55991.6-2014. Медицинские изделия для диагностики *In Vitro*. Ч. 6. Автоматические анализаторы для гематологических исследований. Технические требования для государственных закупок.
25. ГОСТ Р 56395-2015. Лаборатории медицинские. Снижение ошибок посредством менеджмента риска и постоянного улучшения.
26. ГОСТ Р 56894-2016. Сводный комплект технической документации для демонстрации соответствия общим принципам обеспечения безопасности и основных функциональных характеристик медицинских изделий для диагностики *in vitro*.
27. ГОСТ Р 58024-2017. Изделия медицинские. Оборудование для термического обеззараживания/обезвреживания медицинских отходов. Метод сухого горячего воздуха. Технические требования для государственных закупок.
28. ГОСТ Р ЕН 12296-2009. Биотехнология. Оборудование. Методы контроля эффективности очистки.
29. ГОСТ Р ЕН 12469-2010. Биотехнология. Технические требования к боксам микробиологической безопасности.
30. ГОСТ Р ИСО 10993-1-2009. Изделия медицинские. Оценка биологического действия медицинских изделий. Ч. 1. Оценка и исследования.

31. ГОСТ Р ИСО 10993-5-2009. Изделия медицинские. Оценка биологического действия медицинских изделий. Ч. 5. Исследования на цитотоксичность: методы *in vitro*.

32. ГОСТ Р ИСО 13408-1-5-2000. Асептическое производство медицинской продукции. Ч. 1—5.

33. ГОСТ Р ИСО 13408-6-2009. Асептическое производство медицинской продукции. Ч. 6. Изолирующие системы.

34. ГОСТ Р ИСО 14155-2014. Клинические исследования. Надлежащая клиническая практика.

35. ГОСТ Р ИСО 14644-1-10-2020. Чистые помещения и связанные с ними контролируемые среды Ч. 1—10.

36. ГОСТ Р ИСО 14937-2012. Стерилизация медицинской продукции. Общие требования к определению характеристик стерилизующего агента и к разработке, валидации и текущему контролю процесса стерилизации медицинских изделий.

37. ГОСТ Р ИСО/ТО 22869-2009. Лаборатории медицинские. Руководство по внедрению ИСО 15189:2003.

38. ГОСТ Р ИСО 9001-2015. Национальный стандарт Российской Федерации. Системы менеджмента качества. Требования.

39. ГОСТ 28311-2021. Дозаторы медицинские лабораторные. Общие технические требования и методы испытаний.

40. МУ 1.3.1888-04. Организация работы при исследованиях методом ПЦР материала, инфицированного патогенными биологическими агентами III—IV групп патогенности. Методические указания.

41. МУ 1.3.2569-09. Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I—IV групп патогенности. Методические указания.

42. МУ 287-113. Стерилизация и дезинфекция медицинских изделий. Методические указания.

43. МУ 3.5.5.1034-01. Обеззараживание исследуемого материала, инфицированного бактериями I—IV групп патогенности, при работе методом ПЦР. Методические указания.

44. *О биомедицинских клеточных продуктах* : федер. закон от 23.06.2016 г. №180-ФЗ.

45. *Об основах охраны здоровья граждан в Российской Федерации* : федер. закон от 21.11.2011 г. №323-ФЗ.

46. *Об утверждении СанПиН 2.1.3.2630-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к организациям, осуществляющим медицинскую деятельность»* : постановление Главного государственного санитарного врача РФ от 18.05.2010 г. №58.

47. *Об утверждении Положения о государственном контроле качества и безопасности медицинской деятельности»* : постановление Правительства РФ от 12.11.2012 г. №1152.

48. *Об утверждении правил надлежащей практики по работе с биомедицинскими клеточными продуктами»* : приказ Минздрава РФ от 08.08.2018 г. №512н.

49. *Об утверждении Порядка маркировки первичной и вторичной упаковки аутологичных биомедицинских клеточных продуктов и комбинированных биомедицинских клеточных продуктов с использованием методов радиочастотной идентификации принадлежности такого биомедицинского клеточного продукта конкретному пациенту* : приказ Минздрава РФ от 13.10.2017 г. №800н.

50. *Об утверждении требований к организации и деятельности биобанков и правил хранения биологического материала, клеток для приготовления клеточных линий, клеточных линий, предназначенных для производства биомедицинских клеточных продуктов, биомедицинских клеточных продуктов* : приказ Минздрава РФ от 20.10.2017 г. №842н.

51. *Об утверждении Порядка формирования, использования, хранения, учета и уничтожения коллекции постоянного хранения образцов стандартизованных клеточных линий* : приказ Минздрава РФ от 27.03.2018 г. №123н.

52. *Об утверждении перечня сведений, имеющих значение для обеспечения безопасного донорства биологического материала* : приказ Минздрава РФ от 28.02.2017 г. №81н.

53. *Об утверждении Правил получения биологического материала для производства биомедицинских клеточных продуктов и передачи его производителю биомедицинских клеточных продуктов* : приказ Минздрава РФ от 28.08.2017 г. №569н.

54. *Об утверждении профессионального стандарта «Младший медицинский персонал»* : приказ Минтруда РФ от 12.01.2016 г. №2н.

55. *Об утверждении* правил надлежащей лабораторной практики : приказ Минздрава РФ от 01.05.2016 г. №199н.

56. *Об утверждении* Правил надлежащей клинической практики биомедицинских клеточных продуктов : приказ Минздрава РФ от 22.09.2017 г. №669н.

57. *Об утверждении* порядка проведения мониторинга безопасности биомедицинских клеточных продуктов : приказ Росздравнадзора от 02.08.2018 г. №5072.

58. СанПиН 2.1.7.2790-10. Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами.

59. СП 1.3.2322-08. Безопасность работы с микроорганизмами III—IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней. Санитарно-эпидемиологические правила. Приложение №1 (справочно). Классификация микроорганизмов — возбудителей инфекционных заболеваний человека, простейших, гельминтов и ядов биологического происхождения по группам патогенности.

60. СП 1.3.3118-13. Безопасность работы с микроорганизмами I—II групп патогенности (опасности). Санитарно-эпидемиологические правила. Приложение 3. Классификация биологических агентов, вызывающих болезни человека, по группам патогенности.

61. СП 3.5.1378-03. Санитарно-эпидемиологические требования к организации и осуществлению дезинфекционной деятельности.

## **КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ**

**Гончаров Андрей Геннадьевич**, канд. мед. наук, ст. науч. сотрудник Центра иммунологии и клеточных биотехнологий, доцент кафедры педиатрии и профилактической медицины ОНК «Институт медицины и наук о жизни (МЕДБИО)» БФУ им. И. Канта.

E-mail: [agoncharov59@mail.ru](mailto:agoncharov59@mail.ru)

**Шуплецова Валерия Владимировна**, канд. биол. наук, ст. науч. сотрудник Центра иммунологии и клеточных биотехнологий ОНК «Институт медицины и наук о жизни (МЕДБИО)» БФУ им. И. Канта.

E-mail: [vshupletsova@mail.ru](mailto:vshupletsova@mail.ru)

**Литвинова Лариса Сергеевна**, д-р мед. наук, директор Центра иммунологии и клеточных биотехнологий, проф. кафедры фундаментальной медицины ОНК «Институт медицины и наук о жизни (МЕДБИО)» БФУ им. И. Канта.

E-mail: [larisalitvinova@yandex.ru](mailto:larisalitvinova@yandex.ru)

*Учебное издание*

**Гончаров** Андрей Геннадьевич  
**Шуплецова** Валерия Владимировна  
**Литвинова** Лариса Сергеевна

ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ КЛЕТОЧНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ  
ЧАСТЬ 1

Учебно-методическое пособие

Редактор *В. Е. Москаленко*  
Компьютерная верстка *Е. В. Денисенко*

Подписано в печать 30.10.2023 г.  
Дата выхода в свет 16.11.2023 г.  
Формат 60×90 1/16. Усл. печ. л. 6,0  
Тираж 300 экз. (1-й завод 100 экз.). Заказ 112

Издательство Балтийского федерального университета им. Иммануила Канта  
236041, г. Калининград, ул. Невского, 14