

ТЕХНОЛОГИИ ПРЕЦИЗИОННОЙ МЕДИЦИНЫ

©Коллектив авторов

КРИБАНК КАК АТРИБУТ ОМИКСНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ

А.А. Сазанов^{1}, Х.Х. Ерганов², Э. Пфайфер³*

¹Санкт-Петербургский государственный технологический институт,
Санкт-Петербург; эл. почта: alexei.sazanov@technolog.edu.ru

²ООО “Криотек”, Москва

³“ASKION” GmbH, Gewerbepark, Gera, Германия

Биобанки представляют собой систематизированные и аннотированные коллекции биологических образцов, имеющие систему СОП – стандартных операционных процедур – и соответствующие рекомендациям ISBER – Международного общества биологических и экологических репозиторий. Определяющее значение в деятельности биобанка имеет стандартизация условий получения, обработки, хранения и предоставления образцов конечному пользователю. Атрибутами биобанка являются общие принципы маркирования и аннотирования биологических образцов с использованием специализированного ПО, автоматизированные системы контроля условий их хранения и учёта. Криобанки представляют собой биобанки с наличием условий хранения от -196°C до -150°C, что позволяет обеспечить лучшую жизнеспособность клеток и наибольшую сохранность биологических молекул. Криобанкирование является наиболее существенной частью инфраструктуры персонализированной и популяционной медицины, фармацевтики и биофармакологии, сохранения редких и исчезающих видов, биотехнологий в целом. Биобанкирование следующего поколения – Next Generation Biobanking – концепция, специально разработанная для омиксных технологий, включает в себя аннотирование биологических образцов по большому числу биомаркеров на основе технологий секвенирования нового поколения – Next Generation Sequencing, а также наличие нескольких временных точек сбора биологического материала у одного и того же пациента (например, на разных стадиях заболевания, до и после операции, в разные периоды терапии) с подробной аннотацией физиологических, биохимических и клинических данных. Большое значение в биобанкировании следующего поколения имеют эпигенетические исследования (метилирование ДНК, микроРНК и т.д.), а также анализ биоинформационных данных. Такие биобанки должны функционировать на основе новых этических принципов постгеномной эры.

Ключевые слова: биобанки, криобанки, аннотирование, контроль условий хранения, жизнеспособность клеток, сохранность биологических молекул

DOI: 10.18097/PBMC20176305428

ВВЕДЕНИЕ

Геномная медицина основана на диагностических и прогностических биомаркерах и терапевтических мишенях, которые можно идентифицировать с помощью анализа последовательности ДНК и профилирования экспрессии генов в клетках поражённых тканей. Для этого необходимо наличие высококачественных биологических образцов, которые по своим характеристикам максимально приближены к биологическим жидкостям, клеткам и тканям организма непосредственно перед их забором или удалением [1]. Биомедицинские исследования, в том числе с использованием технологий омикс, предполагают наличие выравненных по возрасту и полу экспериментальных и контрольных выборок, объём которых определяется исходя из биологической вариабельности изучаемых признаков и требуемых показателей статистической значимости. Например, при проведении генотипирования и анализа статистической связи отдельных аллелей с фенотипами (наследственные заболевания, предрасположенности к заболеваниям, ответ на терапию) с использованием параметрических критериев число индивидуумов минимального генотипического класса (гомозиготы по аллелю гена, имеющего минимальную частоту встречаемости

в популяции) должно быть не меньше 30. То есть, при частоте аллеля 0,1 общий объём выборки должен быть не меньше 3000 индивидуумов. В условиях одного научно-исследовательского или клинического учреждения организовать сбор и обработку такого числа биологических образцов практически невозможно. Для решения этой задачи предназначены медицинские биобанки исследовательского назначения, которые являются частью инфраструктуры персонализированной и популяционной медицины, фармацевтики и биофармакологии, медицинских биотехнологий в целом [1]. Биобанкирование подразумевает сбор и хранение образцов и связанной с ними информации для нужд текущих или предполагаемых исследований в надлежащих условиях. Медицинские биобанки можно подразделить на следующие категории: медицинские архивы, биобанки клинического назначения (банки крови, костного мозга, пуповинной крови, стволовых клеток, органов), банки генеративных клеток, биобанки судебно-медицинского назначения, исследовательские (биомедицинские) биобанки [1, 2]. Криобанки представляют собой биобанки с наличием условий хранения от -196°C до -150°C, что позволяет обеспечить лучшую жизнеспособность клеток и наибольшую сохранность биологических молекул [1].

Развитие исследовательских биобанков в мире позволило провести идентификацию функции ассоциированных с фенотипами (например, с заболеваниями) генов, установление связей патогенных аллелей с заболеваниями, идентификацию терапевтических мишеней, идентификацию и валидацию биомаркеров различных заболеваний [2-4].

Биобанками считают систематизированные и аннотированные коллекции биологических образцов, соответствующие рекомендациям ISBER – International Society for Biological and Environmental Repositories (Международного общества биологических и экологических репозиторий) и имеющие систему СОП – стандартных операционных процедур [5]. Репозиторием является структура, которая занимается сбором, обработкой, хранением, распределением биологических образцов с целью обеспечения аннотированным биологическим материалом [2, 5, 9]. Исследователи должны иметь возможность обращаться к биобанкам, чтобы узнать, какие из биологических образцов, подходящих для планируемого исследования, находятся в коллекции. Как правило, список имеющихся в биобанке образцов находится в публичном доступе, либо может быть получен по запросу (например, база данных BioSample Национального Центра Биотехнологической Информации – National Center for Biotechnology Information [6]). Образцы для биобанкирования могут быть получены репозиторием при наличии специальных соглашений с клиническими учреждениями или частными лицами, которые проводят полевые исследования (в случае биологических образцов, полученных от других биологических видов) [1, 5]. Коллекции биологических образцов должны обеспечивать наличие условий хранения биологических образцов, качества аннотаций, защиты анонимности доноров. Конфиденциальность использования образцов и информации должна соблюдаться в строгом соответствии с информированным согласием и условиями получения этих образцов [7]. Биологические образцы тканей человека и связанные с ними данные должны распространяться без информации, позволяющей идентифицировать донора, за исключением тех случаев, когда это абсолютно необходимо и на это есть разрешение этического комитета [5, 7]. Решающую роль в деятельности биобанка играет стандартизация условий получения, обработки, хранения и предоставления образцов конечному пользователю. Этой цели служит система менеджмента качества на основе СОП [7]. Типовые системы СОП исследовательского медицинского биобанка включают следующие группы: забор и маркировка биообразцов, транспортировка биообразцов, получение и регистрация биообразцов, обработка и хранение биообразцов, подготовка к отправке и отправка биообразцов, утилизация отходов, контроль эксплуатации оборудования и регламентные работы, контроль реагентов и расходных материалов, техника безопасности, взаимодействие с поставщиками биообразцов, нештатные ситуации, защита данных, обучение персонала, отклонения от СОП [1].

Принципиальное значение имеет возможность аудита биобанка с целью контроля всех событий поступления, процессирования, хранения и отправки биологических образцов [5]. Категорически необходимы для деятельности биобанка общие принципы маркирования и аннотирования биологических образцов, которые, как правило, проводятся с использованием специализированного программного обеспечения (ПО) автоматизированных систем контроля условий их хранения и учёта [5, 8, 9].

В каждом хранилище должна быть система безопасности, обеспечивающая сохранность находящихся в нём биообразцов [1, 5]. Такие системы должны проводить мониторинг ежедневно и круглосуточно. Ответственный за безопасность хранилищ персонал должен быть способен получить сигнал от систем безопасности в случае нарушений условий хранения образцов и в течение 1-2 часов принять необходимые действия для предотвращения или минимизации ущерба из-за нарушения условий хранения биологических образцов [1].

Биобанкирование нового поколения (Next Generation Biobanking) разработано в постгеномную эру для усиления интеграции биомедицинских исследований (преимущественно с использованием омиксных технологий) и клинической доказательной медицины. Оно предполагает аннотирование биологических образцов по большому числу биомаркеров, что возможно при использовании методов секвенирования нового поколения (Next Generation Sequencing), а также сбор биологического материала от одного пациента в разных временных точках (например, на разных стадиях заболевания, до и после операции, на различных сроках терапии) с подробной аннотацией физиологических, биохимических и клинических данных [10, 11]. В качестве требований к таким биобанкам рассматриваются: возможность глобального обмена данными и метаданными; интеграция рабочего процесса с клиническими учреждениями на всех этапах получения, процессирования и хранения биообразцов; удобство интеграции генотипических и фенотипических данных; интеграция с международными эпидемиологическими реестрами; интеграция синтаксических и семантических стандартов, преимущественное внимание к проектам в области трансляционной медицины [11, 12]. Большое значение в деятельности биобанков нового поколения имеют эпигенетические исследования (метилирования ДНК, микроРНК и т.д.), а также развитый биоинформатический анализ данных. Такие биобанки функционируют на основе новых этических принципов постгеномной эры [13-15].

Биобанки нового поколения должны иметь техническое оснащение, позволяющее обеспечить высокую степень сохранности биологического материала и интегральность биологических молекул [5]. В наибольшей степени этим требованиям удовлетворяет режим хранения в газовой фазе жидкого азота при температуре ниже -150°C [16]. Так, например, проведённые исследования влияния условий долговременного хранения

образцов на жизнеспособность микроваскулярных эндотелиальных клеток человека убедительно свидетельствуют о целесообразности применения технологии обработки, замораживания и хранения образцов в контролируемой влажностной и температурной среде с применением герметичных криохранилищ и криогенных рабочих модулей с программной заморозкой [16] (рисунок).

Типовыми протоколами процессирования образцов в исследовательском биобанке медицинского назначения являются следующие: аликвотирование биологических жидкостей; выделение сыворотки и плазмы крови; приготовление мазков аспирата костного мозга и периферической крови; выделение моноклеарных клеток костного мозга, периферической и пуповинной крови; сохранение жизнеспособных клеток и жизнеспособных фрагментов ткани с использованием мгновенной заморозки или криоконсервантов [1, 5]. Особое значение имеет контроль жизнеспособности клеток в биологических образцах [1, 5]. Определение числа жизнеспособных клеток можно провести несколькими методами, например, селективного окрашивания мёртвых клеток и тканей трипановым синим, витальное окрашивание с использованием тетразола или фуксина, или флуоресцентного окрашивания диацетатом флуоресцеина. Очень важно стандартизировать анализы жизнеспособности, поскольку точное измерение числа жизнеспособных клеток в неподвижной популяции может быть затруднено, и, где возможно, верифицировать их с помощью однозначных тестов функциональности и чётких доказательств деления и роста клеток. Часто отмечается временное несоответствие оценки жизнеспособности немедленно после размораживания клеток и их функциональной активности в течение продолжительного времени, так как существует феномен отсроченной гибели клеток [5]. Наиболее адекватна задачам биобанкирования расширенная оценка восстановления функциональной активности клеток после размораживания, которая должна включать несколько методов оценки, например, анализ

“живой/мёртвый”, анализ механизма клеточной смерти (тесты на апоптоз), метаболические анализы (например, МТТ – колориметрический тест с жёлтым тетразолом), и, в зависимости от типа клеток, анализ специфической клеточной активности [5]. Следует отметить, что расширенная оценка жизнеспособности клеток должна быть проведена в нескольких временных точках после размораживания, особенно в случаях временной задержки отсроченной гибели клеток. Следует подчеркнуть, что для большинства жизнеспособных клеток человека необходимо хранение при криогенных температурах, для многих микроорганизмов хранение в таких условиях является желательным.

Таким образом, хотелось бы отметить, что современное биобанкирование имеет комплексный, многосторонний и междисциплинарный характер, включает планирование, разработку системы СОП, создание единой системы маркировки, забора биологического материала, пробоподготовки, закладки на хранение, аннотирования и утилизации биологических образцов, непрерывного контроля условий хранения с использованием специально разработанных для этой цели решений с постоянным техническим, медико-биологическим и программным консультированием [1, 5].

ЛИТЕРАТУРА

1. Сазанов А.А., Пфайфер Э., Ерганов А.Х. (2017) Справочник заведующего КДЛ, 7, 33-41.
2. De Souza Y.G., Greenspan J.S. (2013) AIDS, 27, 303-312.
3. Harris J.R., Burton P., Knoppers B.M., Lindpaintner K., Bledsoe M., Brookes A.J., Budin-Ljøsne I., Chisholm R., Cox D., Deschênes M. et al. (2012) Eur. J. Hum. Genet., 20, 1105-1111.
4. Kinkorová J. (2015) EPMA J., 7, 4.
5. Best Practices for Repositories: Collection, Storage, Retrieval and Distribution of Biological Materials for Research. Third Edition (2012) Biopreservation and Biobanking, 10, 79-161.
6. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/biosample/>

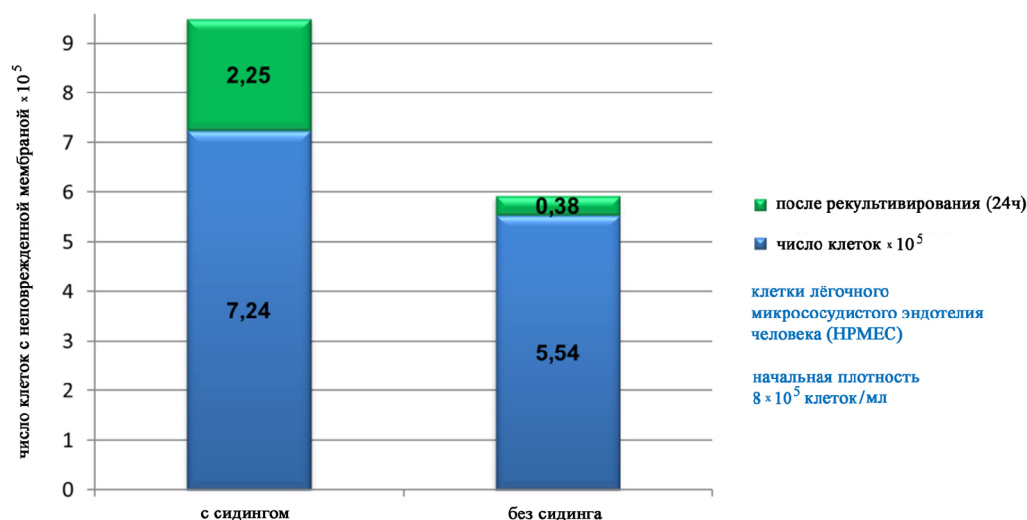


Рисунок. Влияние контролируемого замораживания на жизнеспособность клеток после рекультивирования. Сидинг - 10 К/мин до -30°C и дальше 3 К/мин до -80°C [16].

7. Ravid R. (2008) Cell Tissue Bank., **9**, 151-167.
8. Ragin C., Park J.Y. (2014) Ecancermedalscience, **8**, 454. DOI: 10.3332/ecancer.2014.454
9. Fransson M.N., Rial-Sebbag E., Brochhausen M., Litton J.-E. (2015) Eur. J. Hum. Genet., **23**, 22-28.
10. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02442011>
11. Zhou J.H., Sahin A.A., Myers J.N. (2015) Arch. Pathol. Lab. Med., **139**, 812-818.
12. Brochhausen M., Zheng J., Birtwell D., Williams H., Masci A.M., Ellis H.J., Stoeckert C. (2016) J. Biomed. Semantics, **7**, 23-32.
13. Biobanking in the 21st century (2015) in Series: Advances in experimental medicine and biology (Karimi-Busheri F., ed.), Springer, 864, 186 p.
14. Ethics, law and governance of biobanking: national, European, and international approaches (2015) in Series: International library of ethics, law and technology (Mascalzoni D., ed.), Springer, 14, 277 p.
15. Master Z., Campo-Engelstein L., Caulfield T. (2015) Eur. J. Hum. Genet., **23**, 569-574.
16. Pfeifer E., Werner A. (2016) in: Refrigeration Science and Technology Proceedings. Institut für Luft und Kältetechnik Gemeinnützige Gesellschaft mbH, Dresden, pp. 57-60.

Поступила: 31. 08. 2017.
Принята к печати: 14. 09. 2017.

A CRYOBANK AS AN ATTRIBUTE OF OMICS TECHNOLOGIES

A.A. Sazanov¹, Kh.Kh. Erganokov², E. Pfeifer³

¹Saint-Petersburg State Technological Institute,
Saint-Petersburg, Russia; e-mail: alexei.sazanov@technolog.edu.ru

²“Cryotec” LLC, Moscow, Russia

³“ASKION” GmbH, Gewerbepark Keplerstraße 17-19, 07549, Gera, Germany

Biobanks are systematic and annotated collections of biological samples based on the system of standard operating procedures (SOP) and corresponding to the recommendations of the International Society for Biological and Environmental Repositories (ISBER). Standardization of conditions of obtaining, processing, storage of samples and providing to an end user are crucial in the activities of the biobank. The attributes of biobanks include common principles of labeling and annotation of biological samples using specialized software, an automated monitoring system of storage conditions, and registration of biosamples. Cryobanks are the biobanks maintained at the storage conditions from -196°C to -150°C that provide better cell viability and the highest preservation of biological molecules. Cryobanking is the most essential part of the infrastructure of population and personalized medicine, pharmaceuticals and biopharmacology, conservation of rare and endangered species, as well as biotechnology in general. Next Generation Biobanking, a concept especially designed for omics technologies, involves annotating biological samples on many biomarkers based on Next Generation Sequencing techniques, as well as collecting biological material from the same patient at different time points (for example, at different stages of the disease, before and after the operation, at different periods of therapy) with a detailed annotation of physiological, biochemical and clinical data. Epigenetic studies (DNA methylation, microRNA, etc.), as well as bioinformatic data analysis are of great importance in the activity of Next Generation Biobanking. Such biobanks should function based on the new ethical principles of the post-genomic era.

Key words: biobanks, cryobanks, annotation, monitoring of storage conditions, cell viability, preservation of biological molecules