

Применение методов цитогенетического анализа при оценке качества клеточных линий в составе биомедицинских клеточных продуктов

* О. А. Рачинская, В. А. Меркулов

Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Научный центр экспертизы средств медицинского применения»
Министерства здравоохранения Российской Федерации,
Российская Федерация, 127051, Москва, Петровский бульвар, д. 8, стр. 2

Биомедицинские клеточные продукты (БМКП) — новая группа препаратов, основанных на применении клеточных линий различного происхождения для лечения широкого спектра заболеваний, в том числе в сфере регенеративной медицины. Контроль качества клеточного компонента таких препаратов является важной задачей на всех стадиях разработки и производства БМКП. Большое внимание должно уделяться подтверждению безопасности препаратов в силу ряда их особенностей и возможности возникновения побочных эффектов при их применении, в том числе риска развития онкологических заболеваний. Возможной причиной канцерогенеза может стать генетическая нестабильность клеточного компонента БМКП. Для выявления генетической нестабильности клеток, входящих в состав БМКП, на хромосомном уровне возможно применение ряда цитогенетических методов. Подтверждение наличия в клетках неизменного кариотипа и идентификацию различных хромосомных аномалий возможно осуществлять с помощью как классических цитогенетических методов анализа, например дифференциальное окрашивание хромосом, так и с помощью молекулярно-цитогенетических методов, основанных на применении флуоресцентной гибридизации *in situ*. При комплексном использовании этих методов возможно получение достоверной оценки генетической стабильности и косвенного доказательства отсутствия малигнизации клеточной линии в составе БМКП.

Ключевые слова: биомедицинский клеточный продукт; клеточная линия; генетическая нестабильность; хромосомные аномалии; кариотипирование

Для цитирования: Рачинская ОА, Меркулов ВА. Применение методов цитогенетического анализа при оценке качества клеточных линий в составе биомедицинских клеточных продуктов. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение* 2018; 18(1): 25–32. DOI: 10.30895/2221-996X-2018-18-1-25-32

* **Контактное лицо:** Рачинская Ольга Анатольевна; Rachinskaya@expmed.ru

Use of Cytogenetic Analysis Methods for Assessing the Quality of Cell Lines in Biomedical Cell Products

* O. A. Rachinskaya, V. A. Merkulov

Federal State Budgetary Institution
«Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products»
of the Ministry of Health of the Russian Federation,
8/2 Petrovsky boulevard, Moscow 127051, Russian Federation

Biomedical cell products (BMCPs) are a new group of biologicals that are based on various cell lines and are used in the treatment of a wide range of diseases as well as in the field of regenerative medicine. The quality control of the cellular component in such preparations is very important at all stages of BMCPs development and production. Much attention should be given to confirmation of BMCPs safety because of their specific properties and potential side effects, including the risk of cancer development. Carcinogenesis may be attributed to genetic instability of the BMCP cellular component. A number of cytogenetic methods can be used at the chromosomal level in order to identify the genetic instability of cells in a BMCP. Confirmation of the normal karyotype of cells and identification of various chromosomal abnormalities can be achieved using both classic cytogenetic analysis methods, such as chromosome banding, and molecular cytogenetic methods based on the use of fluorescent *in situ* hybridization. Combination of these methods may provide a reliable estimation of genetic stability of the cell line in a BMCP, and indirect evidence of absence of malignancy.

Key words: biomedical cell product; cell line, genetic instability; chromosomal abnormality; karyotyping

For citation: Rachinskaya OA, Merkulov VA. Use of Cytogenetic Analysis Methods for Assessing the Quality of Cell Lines in Biomedical Cell Products. *BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment* 2018; 18(1): 25–32. DOI: 10.30895/2221-996X-2018-18-1-25-32

* **Contact person:** Rachinskaya Olga Anatolyevna; Rachinskaya@expmed.ru

Согласно Федеральному закону от 23 июня 2016 г. № 180-ФЗ «О биомедицинских клеточных продуктах» под биомедицинским клеточным продуктом (БМКП) следует понимать комплекс, состоящий из клеточной линии (клеточных линий) и вспомогательных веществ либо из клеточной линии (клеточных линий) и вспомогательных веществ в сочетании с прошедшими государственную регистрацию лекарственными препаратами для медицинского применения и (или) медицинскими изделиями.

БМКП обязательно должен содержать в своем составе клеточную линию (или клеточные линии) — стандартизованную популяцию клеток одного типа с воспроизводимым клеточным составом, полученную путем изъятия из организма человека биологического материала с последующим культивированием клеток вне организма человека [1]. В качестве клеточного компонента могут выступать мезенхимальные стромальные клетки (МСК), лимфоциты, дендритные клетки, хондроциты, фибробласты, гепатоциты и другие типы клеток.

Эффективность препаратов на основе человеческих клеток и тканей напрямую связана с их качеством и сохранением клеточной функции в процессе производства [2]. Требования к качеству БМКП должны охватывать все стадии жизненного цикла БМКП и представлять собой комплексную систему оценки, посредством которой возможно оценить как производственный процесс, так и обеспечить постоянство характеристик клеточного продукта. Выбор показателей качества БМКП и методов их оценки зависит от этапа производства и стадии технологического процесса, включая выделение и культивирование клеток. Оценка качества непосредственно клеточной линии, входящей в состав БМКП, должна содержать разные показатели, например, такие как подлинность, чистота, активность [3]. Одним из самых важных показателей при оценке качества клеточной линии является безопасность, а именно выявление в используемой клеточной линии признаков генетической нестабильности и возможного канцерогенного потенциала, которые могут привести к серьезным побочным эффектам при терапии с применением данного клеточного продукта.

Под генетической нестабильностью принято понимать повышенную частоту мутационных явлений в геноме клеток, что может приводить в дальнейшем к иммортализации клеток и их опухолевой трансформации. Генетическая нестабильность может проявляться на разных уровнях (геном, хромосомном, геномном). На хромосомном уровне генетическая нестабильность заключается в появлении в клетках различных структурных и численных хромосомных аномалий, носящих клональный характер. При увеличении пloidности генома и появлении три-, тетра- и полиплоидных клеток говорят о геномном уровне генетической нестабильности.

Выбор методов для оценки качества готового БМКП должен основываться на балансе значимости для определения критических параметров качества и скорости их проведения. Поэтому важной и актуальной задачей становится выбор адекватных методов для оценки качества клеточных линий в составе БМКП, в том числе неизменного кариотипа для подтверждения безопасности клеточного продукта на их основе.

Оценка стабильности и канцерогенного потенциала клеточных линий в составе препаратов на основе клеток

Введение в организм больного клеточного трансплантата, содержащего клетки с нестабильным геномом, может привести к разного рода осложнениям. Известны многочисленные примеры хромосомных перестроек, которые либо обуславливают предрасположенность к развитию онкологических заболева-

ний, либо могут являться прямой причиной злокачественной трансформации. Поэтому применение клеток для терапевтических целей должно определяться данными по их безопасности для пациента, в том числе онкогенной [4–6].

Риск возникновения кистозных структур, содержащих эпителиоподобные клетки, был показан на начальном изучении препарата прогениторных олигодендроцитов из эмбриональных стволовых клеток (ЭСК) человека для лечения повреждений спинного мозга (Geron Corporation, США), что привело к приостановлению клинических исследований и дополнению тестирования готового продукта [7, 8].

Риск развития онкологических заболеваний указывается и для некоторых других препаратов на основе клеток в разделе «Предупреждения и меры предосторожности» информационных листов, опубликованных на сайте FDA (Food and Drug Administration, Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов): ALLOCORD, HPC Cord Blood производства SSM Cardinal Glennon Children's Medical Center, США [9]; Azficel-T, Laviv производства Fibrocell Technologies, Inc. США [10]; Clevecord, HPC Cord Blood производства Cleveland Cord Blood Centre, США [11]; Hemacord, HEMACORD (HPC Cord Blood) производства New York Blood Center, США [12]; Ducord, HPC Cord Blood производства Duke University School of Medicine, США [13]; HPC Cord Blood производства Clinimmune Labs, University of Colorado Cord Blood Bank, США [14]; Epicel (cultured epidermal autografts) производства Vericel Corporation [15].

Для исключения возможности использования при терапии трансформированных клеток и снижения вероятности пост-трансплантационного развития опухолей некоторыми производителями на стадии доклинических исследований производился кариологический анализ клеточного материала: Dermagraft, Interactive Wound Dressing производства Advanced Tissue Sciences, США [16]; OrCel (Bilayered Cellular Matrix), Interactive Wound and Burn Dressing производства Ortec International, Inc, США [17]. На стадии доклинических исследований препарата Holoclar производства Chiesi Farmaceutici S.p.A. (Италия) для подтверждения отсутствия генетической нестабильности препарата наряду с другими тестами (выявление пролиферативного потенциала в присутствии факторов роста/отсутствии адгезивной поверхности) при оценке токсичности был проведен анализ кариотипа клеток на пассажах, превышающих необходимое число для производства препарата. Анализ кариотипа включал подсчет числа хромосом в клетке, выявление процентного содержания полиплоидных и анеуплоидных клеток, а также структурных аномалий в 50 метафазных клетках из шести партий клеточного продукта [18].

Оценка стабильности и канцерогенного потенциала клеточных линий в регуляторных документах ЕС и США

Особенности состава и механизма (механизмов) действия препаратов на основе клеток, отличающими их от классических фармацевтических лекарственных средств (низкомолекулярных и высокомолекулярных биологических препаратов) и медицинских устройств, часто не позволяют оценивать их безопасность с помощью традиционных стандартизованных подходов к доклинической оценке токсичности. Опираясь на основные токсикологические принципы, лежащие в основе стандартных токсикологических исследований, а также учитывая биологические особенности препаратов на основе клеток и предполагаемые показания к их применению, необходимо использовать гибкий научно обоснованный подход при рассмотрении вопросов безопасности. Такой подход должен рас-

пространяться в том числе и на оценку туморогенности экспериментального препарата [19, 20]. Туморогенность препаратов на основе клеток следует отличать от онкогенности классических фармацевтических лекарственных средств вследствие возможной малигнизации клеток, входящих в состав клеточного препарата, а не только клеток организма пациента. Риск возникновения неопластической трансформации клеточной составляющей препаратов рекомендуется контролировать на пассажах, превышающих лимит культивирования, необходимого для производства препарата [21].

В США отсутствие туморогенного потенциала у препаратов при терапии соматическими клетками является одной из главных составляющих безопасности — критического параметра качества (CQAs, critical quality attributes) [21]. Тестирование клеточных продуктов на туморогенность для гарантии качества и целостности продукта требуется как в процессе производства (*in-process*), так и при оценке качества конечного продукта, в том числе до и после криоконсервации при банкировании клеточной линии. Особенно важно подвергать тестированию на туморогенность плюрипотентные культуры клеток [22].

В Европейском союзе в спецификации на клеточные препараты передовой терапии в соответствии с Директивой Еврокомиссии 2009/120/ЕС [23] кариологическая характеристика, туморогенность, генетическая стабильность определены как необходимые характеристики, указываемые в спецификации готового препарата.

Кроме того, согласно руководству по лекарственным препаратам на основе клеток, на этапе их культивирования *in vitro* необходимо проводить оценку генетической стабильности клеточных линий наравне с определением продолжительности жизни клеточной культуры и максимального числа пассажей, генотипических свойств как первичных клеточных культур, так и устойчивых клеточных линий, в том числе полученных клеточных клонов. Оценка стабильности первичных клеточных культур и устойчивых клеточных линий является обязательным условием претрансплантационного тестирования [20].

При анализе безопасности препарата оценку туморогенного потенциала клеточной культуры, входящей в состав этого препарата, рекомендуется проводить путем анализа пролиферативного потенциала, реакций на стимулы апоптоза и генной экспрессии. При этом обязательно требуется исследование хромосомной целостности [20].

Ситуацию может усложнить применение к клеткам, лежащим в основе БМКП, различных методов обработки (физических, химических или генетических), что также может привести к индуцированному мутагенезу и возникновению генетической нестабильности. В случае генетической модификации клеток Европейским медицинским агентством рекомендуется следовать требованиям, изложенным не только в Руководстве по лекарственным препаратам на основе клеток [20], но и в Примечаниях к руководству по вопросам качества, особенностям проведения доклинических и клинических исследований, основанных на переносе генов [24]. Причем при проведении доклинических исследований препаратов на основе генетически модифицированных соматических клеток необходимо учитывать возможность трансформации не только клеточного материала самого препарата, но и клеток других тканей реципиента в связи с возможностью переноса и интеграции модифицирующей генетической конструкции (вирусных частиц, векторных конструкций) из вводимых клеток. Цитогенетический анализ костного мозга и/или клеток периферической крови может помочь в выявлении такого инсерционного мутагенеза [24].

Оценку генетической стабильности и функциональной целостности, особенно при длительном пассировании клеток *in vitro*, необходимо проводить и при создании банков клеточных культур, которые в дальнейшем будут использоваться для приготовления БМКП [25–28]. Так, согласно рекомендациям ВОЗ, параметр «стабильность» клеточного компонента предлагается оценивать на основе результатов секвенирования отдельных измененных последовательностей, а также цитогенетического метода — флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH, Fluorescence in situ hybridization) [25].

Применяя методы кариотипирования метафазных хромосом и FISH, в Банке стволовых клеток при институте стволовых клеток человека (г. Москва) осуществляли оценку генетической стабильности линий мезенхимальных стволовых клеток, планируемых для дальнейшего использования в клинических целях [29].

Причины генетической нестабильности

Неиммортиализованные клетки человека имеют преимущественно диплоидный кариотип: 46,XX (женский кариотип) или 46,XY (мужской кариотип) — основная характеристика, выявляемая с помощью методов цитогенетического анализа и подтверждающая генетическую стабильность клеток на хромосомном и геномном уровнях [30]. Клеточные линии дифференцированных нормальных диплоидных клеток человека имеют ограниченный срок жизни *in vitro*. В норме при длительном культивировании такие клетки исчерпывают пролиферативный потенциал, проявляют признаки репликативного старения и погибают [31].

Выделяют следующие кариологические признаки стабильного генома клеток:

- 1 — низкая вариабельность клеток по числу хромосом;
- 2 — наличие четко выраженного модального класса числа хромосом;
- 3 — минимальная межклеточная кариотипическая гетерогенность популяции клеток [32].

Условия культивирования, особенно при длительном пассировании культур, оказывают существенное влияние на генетическую стабильность клеток, приводя к отклонениям от нормальной структуры кариотипа, т.е. возникновению различных структурных и численных хромосомных аномалий. При культивировании клеток в отдаленных пассажах в клеточных культурах могут возникать новые клоны с хромосомными перестройками, которые могут характеризоваться более высокими темпами пролиферации и лучшей выживаемостью после криоконсервации, чем исходные клетки с нормальным геномом [5, 33, 34]. При нестабильности генома (главным образом, под влиянием условий культивирования) наряду с клональными перестройками хромосом появляются неклональные, которые создают генетическое разнообразие в популяции, что обеспечивает ее выживание и адаптацию к неблагоприятным условиям [35].

Наличие в клетках хромосомных аномалий может стать причиной злокачественной их трансформации и привести к развитию различных онкологических заболеваний у пациентов, для лечения которых использовались эти клетки [4].

Федеральный закон от 23.06.2016 № 180-ФЗ запрещает применение в медицинской практике БМКП, в состав которых входят эмбриональные стволовые клетки (ЭСК), которые обладают плюрипотентностью и неограниченным пролиферативным потенциалом. Последнее свойство присуще также и опухолевым клеткам. Существует много работ, подтверждающих наличие значительных генетических изменений ЭСК при дли-

тельном культивировании [36–38]. В медицинской практике были зарегистрированы случаи развития опухолей у пациентов при трансплантации ЭСК [39].

Что касается дифференцированных клеток и стволовых клеток постнатального периода, то трансформация их тоже возможна, несмотря на то что отмечается сравнительно редко. Результаты ряда исследований подтверждают генетическую стабильность таких клеток на протяжении времени длительного культивирования [40], вплоть до наступления старения и гибели клеточных линий [41, 42]. Однако опубликованы научные работы, выявившие наличие генетической нестабильности и хромосомные аномалии в стволовых клетках постнатального периода, в том числе и на ранних пассажах культивирования [43, 44], причем в некоторых случаях наряду с трансформацией отмечалась и малигнизация клеточной линии [45, 46].

Считается, что применение клеток, полученных на ранних пассажах культивирования (не позднее 6-го), снижает вероятность возникновения генетических изменений, приводящих к селективной пролиферации (клонообразованию) генетически аномальных клеток. Поэтому при использовании линий клеток в регенеративной медицине во избежание возрастания кариотипической нестабильности длительность культивирования должна быть сокращена до минимума, а также при культивировании следует избегать добавления большого количества ростовых факторов [47, 48].

Есть ряд работ, подтверждающих, что генетическая нестабильность клеток может зависеть не только от условий и продолжительности культивирования, но и от донорского материала. Это связано с возможностью попадания небольшого количества аномальных клеток непосредственно в биопсийный материал донора [44, 49]. Различия в скорости возникновения генетической нестабильности при пассировании клеточной линии, а также различия в особенностях возникающих хромосомных аномалий и их частоте встречаемости в культуре клеток могут наблюдаться даже у одного типа клеток, но выделенных из разных тканей, например у МСК из жировой ткани и у МСК из костного мозга [43].

Существует мнение, что многие геномные изменения могут быть безвредными при дальнейшем использовании таких клеток в клеточной терапии [44, 50]. Однако неясно, какие конкретные мутации являются опасными, а какие нет, т.е. какие мутации приведут к кариотипическим изменениям, сопряженным с онкогенными процессами, а какие окажутся нейтральными [50]. Даже сходство между абберациями в культурах клеток и хромосомными аномалиями, зарегистрированными в опухолевых клетках онкологических больных, не означает обязательного приобретения культивируемыми клетками опухолевых свойств [40]. Влияние конкретных мутаций на иммортализацию клеток — широко обсуждаемый вопрос с большим числом спорных моментов.

Тем не менее был выявлен неслучайный характер вовлечения хромосом и отдельных хромосомных районов в численные и структурные перестройки в условиях кариотипической нестабильности линии. Например, при культивировании клеток *in vitro* обеспечивается сохранение дисомии по всем аутосомам при возможной частичной или полной утрате половых хромосом [51, 52]. В то же время в культивируемых опухолевых клетках могут быть выявлены небольшие потери хромосомного материала (в том числе нуллисомии) [53]. Было замечено, что в опухолевых клетках, культивируемых *in vitro*, сохраняются не только первичные онкогенные хромосомные перестройки, но и весь комплекс реаранжировок генома опухолевых клеток *in vivo* [32, 54].

Для большого числа хромосомных аномалий и полиморфизмов доказано отсутствие фенотипических, в том числе патологических, изменений у людей. К таким аномалиям, например, относят наличие небольшого процента тетраплоидных клеток, морфологический полиморфизм конститутивного гетерохроматина хромосом 1, 9, 16 и Y, морфологический полиморфизм коротких плечей акроцентричных хромосом p13, p14 и p15, транслокации районов ядрышковых организаторов с акроцентричных хромосом на другие с последующим образованием хромосом, несущих интерстициальный сателлитный район, морфологический полиморфизм небольших эухроматиновых и гетерохроматиновых районов целого ряда хромосом, наличие ломких сайтов во многих участках разных хромосом, а также довольно большое число несбалансированных хромосомных структурных перестроек [30, 55].

Другие хромосомные аномалии, наоборот, являются существенными для злокачественной трансформации. Например, микроабберации, затрагивающие отдельные районы хромосомы 12 или 20, где расположены гены-онкосупрессоры и гены, ассоциированные с плюрипотентностью клеток [56].

Однако нередко цитогенетическими методами затруднительно выявить перестройки, затрагивающие небольшие районы хромосом. Сложности зачастую вызывает и точное определение точек разрывов на хромосомах. Кроме того, в некоторых случаях хромосомные перестройки легко перепутать с полиморфизмом и допустить диагностическую ошибку.

Цитогенетические методы оценки генетической стабильности клеточных линий

Для оценки генетической стабильности клеток используются современные цитогенетические и молекулярные методы анализа.

Наиболее часто используемой группой методов, безусловно, являются методы классического цитогенетического анализа, в том числе окрашивание метафазных хромосом красителем Гимза (G-, R-, C-дифференциальные окрашивания и т.д.). Идентификация хромосом осуществляется на основе выявления определенных цитогенетических характеристик отдельных хромосом (размера, центромерного индекса, наличия вторичных перетяжек, рисунка чередования позитивно и негативно окрашенных районов хромосом) [57, 58]. Среднее разрешение таких методов составляет 5–10 Мб. Методы дифференциального окрашивания позволяют выявить численные и относительно крупные структурные хромосомные аномалии. Возможно выявление 10 % мозаицизма при анализе статистически значимого числа клеток [59, 60]. Существенным преимуществом метода G-окрашивания является сохранение окраски в течение длительного времени. Для использования этих методов не требуется дорогостоящее оборудование и реактивы, но методически они обладают рядом сложностей, и осуществление их требует квалифицированного персонала.

Разновидностью дифференциального окрашивания является окрашивание с применением флуоресцентных красителей. Существует целый ряд флуоресцентных красителей, специфически окрашивающих нуклеиновые кислоты. Так, при использовании кинакрин (акрихина) и его производных на хромосомах человека проявляется рисунок дифференциального окрашивания, при котором Q-позитивно окрашиваются районы конститутивного гетерохроматина, а также наблюдается сильное свечение конца длинного плеча Y хромосомы [61]. С помощью производных акридина, а также 4'-6-диамино-2-фенилиндола (DAPI) и Hoechst 33258 возможно получить AT-специфичный бэндинг, во многом схожий

с рисунком G-окрашивания [62]. GC-специфичное окрашивание ДНК дают ряд антибиотиков: хромомицин АЗ (СМА) [63], митрамицин, широко используемый для окрашивания ДНК в проточной флуориметрии [64], оливомицин, а также дауномицин и адриамицин [65], которые позволяют получить на хромосомах рисунок, обратный G-окрашиванию.

Методы дифференциального окрашивания возможно применять при скрининговой оценке генетической стабильности клеточных линий на разных пассажах.

Для более точной идентификации хромосомных перестроек и выявления точной локализации точек разрывов хромосом применяют молекулярно-цитогенетические методы, основанные на флуоресцентной гибридизации *in situ* с использованием специфичных к интересующим геномным последовательностям ДНК-зондов (ДНК-проб). Данная группа методов позволяет обнаруживать дупликации, делеции, инсерции и транслокации участков хромосом размером более 5 кб [58]. Метод удобен при поиске хромосомных аномалий по известным меткам, но для скрининга пула клеток на наличие генетической нестабильности обычно не применяется. Однако в случаях анализа дифференцированных неиммортизированных клеток, когда получение метафазных хромосом затруднено в связи со сниженной пролиферативной активностью клеток, возможно использование FISH на интерфазных ядрах. FISH на интерфазных ядрах позволяет выявлять только численные изменения хромосом или их районов размером от 2 Мб. В случае использования FISH на ДНК фибриллах (fibre FISH) возможно довести разрешение до 500 кб [58]. Методы FISH-анализа позволяют выявлять 2 % мозаицизм.

С помощью молекулярно-цитогенетических методов, основанных на использовании хромосом-специфичных ДНК-зондов ко всем хромосомам генома, меченных разными комбинациями из пяти флуорохромов с различными спектральными характеристиками (24-цветная FISH/M-FISH и SKY-анализ), возможно диагностировать сложные комплексные хромосомные перестройки и идентифицировать хромосомный материал маркерных хромосом, происхождение которого затруднительно установить методами дифференциального окрашивания [66]. Методы многоцветной FISH позволяют выявлять сбалансированные и несбалансированные структурные хромосомные перестройки, размером превышающие 5–10 Мб, а также анеуплоидии. Однако выявление внутрихромосомных структурных перестроек затруднительно.

Определять количественные изменения районов хромосом (делеции, дупликации) наряду с численными хромосомными аномалиями позволяет метод сравнительной геномной гибридизации (CGH, Comparative genomic hybridisation) [67]. Этот метод основывается на совместной гибридизации референтной ДНК (ДНК нормального диплоидного генома) и ДНК испытуемого образца, меченных разными флуорохромами, на хромосомах нормальных диплоидных клеток. Метод не позволяет идентифицировать хромосомные копии размером меньше 10 Мб, аномалии, встречающиеся менее чем в 50 % клеток, а также выявлять сбалансированные хромосомные перестройки. Таким образом, CGH является хорошим дополнением для методов многоцветной FISH при полногеномном исследовании.

Для определения уровня хромосомных aberrаций, что часто делают при оценке устойчивости генома при воздействии различных мутагенов физической и химической природы, практикуется использование и других цитогенетических методов, например монохромное (рутинное) окрашивание красителем Гимзы [68], микроядерный тест [69], тест ДНК комет [70] и др. Но подобные методы позволяют выявлять только круп-

ные хромосомные aberrации, зачастую без установления точной их природы, или даже просто произвести количественную оценку хромосомных aberrаций, возникающих в результате мутагенеза. В настоящее время широкое распространение получают молекулярные методы, например сравнительная геномная гибридизация на чипах (array-CGH) [71] или метод анализа единичного нуклеотидного полиморфизма (SNP, Single nucleotide polymorphism) [72]. Главным преимуществом методов молекулярного анализа является высокое разрешение (100 кб и менее), а также отсутствие необходимости приготовления хромосомных препаратов: получение метафазных пластинок хромосом или интерфазных ядер. Однако методы не позволяют обнаруживать сбалансированные хромосомные транслокации и выявлять клональный мозаицизм с содержанием клеток клона в популяции менее 20 % в случае array-CGH и 7 % в случае SNP. Кроме того, существуют сложности с интерпретацией результатов вариабельности копийности полиморфных участков генома.

Заключение

Таким образом, методы цитогенетического анализа клеточных линий, входящих в состав БМКП, позволяют получить данные об их генетической стабильности и потенциальной возможности злокачественной трансформации, что является важным аспектом в обеспечении безопасности БМКП и оценке его качества. Выбор метода исследования может зависеть от типа клеток и особенностей их культивирования, доступности оборудования, необходимости быстрого получения результатов. Наиболее целесообразным является подход, при котором оценку генетической стабильности проводят цитогенетическими методами в комплексе с молекулярно-биологическими для выявления всех возможных генетических аномалий на разных уровнях организации генома.

Линии клеток с выявленной генетической нестабильностью могут использоваться для фундаментальных исследований, особенно в области канцерогенеза, или в качестве моделей для фармакологических исследований, но применение их в медицинских целях невозможно, так как сопряжено со многими рисками для здоровья пациентов.

Информация об отсутствии конфликта интересов.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

Литература / References

1. Федеральный закон от 23 июня 2016 г. № 180-ФЗ «О биомедицинских клеточных продуктах». [The Federal Law of 23 June, 2016 No. 180-FZ «On Biomedical Cell Products» (In Russ.)]
2. Mason C, Manzotti E. Regen: The Industry Responsible for Cell-Based Therapies. *Regen Med.* 2009; 4(6): 783–5.
3. Мельникова ЕВ, Меркулова ОВ, Рачинская ОА, Чапленко АА, Меркулов ВА, Олефир ЮВ и др. Современные подходы к проведению оценки качества препаратов для клеточной терапии. *Биофармацевтический журнал* 2016; 8(4): 35–46. [Melnikova EV, Merkulova OV, Rachinskaya OA, Chaplenko AA, Merkulov VA, Olefir YuV, et al. Modern Approaches to Quality Control of Cell-Therapy Products. *Russian Journal of Biopharmaceuticals* 2016; 8(4): 35–46 (In Russ.)]
4. Duesberg P, Li R. Multistep Carcinogenesis: a Chain Reaction of Aneuploidizations. *Cell Cycle* 2003; 2(3): 202–10.
5. Rubio D, Garcia-Castro J, Martín MC, de la Fuente R, Cigudosa JC, Lloyd AC, Bernad A. Spontaneous Human Adult Stem Cell Transformation. *Cancer Res.* 2005; 65(8): 3035–9.

6. Бочков НП, Никитина ВА, Рослова ТА, Чаушев ИН, Якушина ИИ. Клеточная терапия наследственных болезней. Вестник РАМН 2008; (10): 20–8. [Bochkov NP, Nikitina VA, Roslova TA, Chaushev IN, Yakushina II. Cellular Therapy of Hereditary Diseases. Annals of the Russian Academy of Medical Sciences 2008; (10): 20–8 (In Russ.)]
7. Goldring CE, Duffy PA, Benvenisty N, Andrews PW, Ben-David U, Eakins R, et al. Assessing the Safety of Stem Cell Therapeutics. Cell Stem Cell 2011; 8(6): 618–28.
8. Geron. About GRNOPC1. Preclinical Safety Studies: Animal Toxicology Testing of GRNOPC1. Available from: <http://ir.geron.com/phoenix.zhtml?c=67323&p=irol-newsArticle&ID=1636251>
9. ALLOCORD (HPC Cord Blood). Package Insert. Available from: <https://www.fda.gov/downloads/BiologicsBloodVaccines/CellularGeneTherapyProducts/ApprovedProducts/UCM354696.pdf>
10. LAVIV (Azficel-T). Package Insert and Patient Information Sheet. Available from: <https://www.fda.gov/downloads/BiologicsBloodVaccines/CellularGeneTherapyProducts/ApprovedProducts/UCM260489.pdf>
11. CLEVECORD (HPC Cord Blood). Package Insert. Available from: <https://www.fda.gov/downloads/BiologicsBloodVaccines/CellularGeneTherapyProducts/ApprovedProducts/UCM519084.pdf>
12. HEMACORD (HPC, cord blood). Package Insert. Available from: <https://www.fda.gov/downloads/BiologicsBloodVaccines/CellularGeneTherapyProducts/ApprovedProducts/UCM279612.pdf>
13. DUCORD (HPC Cord Blood). Package Insert with Infusion Instructions. Available from: <https://www.fda.gov/downloads/BiologicsBloodVaccines/CellularGeneTherapyProducts/ApprovedProducts/UCM322732.pdf>
14. HPC, Cord Blood. Package Insert. Available from: <https://www.fda.gov/downloads/BiologicsBloodVaccines/CellularGeneTherapyProducts/ApprovedProducts/UCM305761.pdf>
15. Epicel (Cultured Epidermal Autografts). Directions for Use. Available from: <https://www.fda.gov/downloads/BiologicsBloodVaccines/BloodBloodProducts/ApprovedProducts/PremarketApprovalsPMAs/UCM538555.pdf>
16. Dermagraft (Interactive Wound Dressing). Summary of Safety and Effectiveness Data. Available from: https://www.accessdata.fda.gov/cdrh_docs/pdf/p000036b.pdf
17. OrCel (Bilayered Cellular Matrix) (Interactive Wound and Burn Dressing). Summary of Safety and Effectiveness Data. Available from: https://www.accessdata.fda.gov/cdrh_docs/pdf/p010016b.pdf
18. Holoclar (ex vivo Expanded Autologous Human Corneal Epithelial Cells Containing Stem Cells). EPAR Summary for the Public. EMEA/H/C/002450. Available from: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Summary_for_the_public/human/002450/WC500183406.pdf
19. Guidance for Industry: Preclinical Assessment of Investigational Cellular and Gene Therapy Products. Food and Drug Administration 2013. Available from: <https://www.fda.gov/downloads/BiologicsBloodVaccines/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/CellularandGeneTherapy/UCM376521.pdf>
20. Guideline on Human Cell-Based Medicinal Products (EMA/CHMP/410869/2006). Available from: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500003894.pdf
21. Guidance for FDA Reviewers and Sponsors. Content and Review of Chemistry, Manufacturing, and Control (CMC). Information for Human Somatic Cell Therapy Investigational New Drug Applications (INDs). Food and Drug Administration 2008. Available from: <https://www.fda.gov/downloads/biologicsbloodvaccines/guidancecomplianceregulatoryinformation/guidances/xenotransplantation/ucm092705.pdf>
22. Carpenter MK, Frey-Vasconcells J, Rao MS. Developing Safe Therapies from Human Pluripotent Stem Cells. Nat Biotechnol. 2009; 27(7): 606–13.
23. Commission Directive 2009/120/EC of 14 September 2009 Amending Directive 2001/83/EC of the European Parliament and of the Council on the Community Code Relating to medicinal products for human use as Regards Advanced Therapy Medicinal Products. Available from: https://ec.europa.eu/health/sites/health/files/files/eudralex/vol-1/dir_2009_120/dir_2009_120_en.pdf
24. Committee for Proprietary Medicinal Products (CPMP). Note for Guidance on the Quality, Preclinical and Clinical Aspects of Gene Transfer Medicinal Products (CPMP/BWP/3088/99). Available from: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/10/WC500003987.pdf
25. Expert Committee on Biological Standardization. Recommendations for the Evaluation of Animal Cell Cultures as Substrates for the Manufacture of Biological Medicinal Products and for the Characterization of Cell Banks. Available from: http://www.who.int/biologicals/Cell_Substrates_clean_version_18_April.pdf
26. ICH Topic Q 5 D. Quality of Biotechnological Products: Derivation and Characterization of Cell Substrates Used for Production of Biotechnological/Biological Products (CPMP/ICH/294/95). Available from: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500003280.pdf
27. Coecke S, Balls M, Bowe G, Davis J, Gstraunthaler G, Hartung T, et al. Guidance on Good Cell Culture Practice. A Report of the Second ECVAM Task Force on Good Cell Culture Practice. Altern Lab Anim. 2005; 33(3): 261–87.
28. Consensus Guidance for Banking and Supply of Human Embryonic Stem Cell Lines for Research Purposes. Stem Cell Rev. 2009; 5(4): 301–14.
29. Астрелина ТА. Банк стволовых клеток: от науки к практике. М.: ЦНТБ ПП; 2015. [Astrelina TA. Bank of Stem Cells: from Science to Practice. Moscow: CSTL FI; 2015 (In Russ.)]
30. McGowan-Jordan J, Simons A, Schmid M, eds. An International System for Human Cytogenomic Nomenclature (ISCN). Basel, Freiburg: Karger; 2016.
31. Hayflick L. The Limited In Vitro Lifetime of Human Diploid Cell Strains. Exp Cell Res. 1965; 37: 614–36.
32. Мамаева СЕ. Закономерности кариотипической эволюции клеток в культуре. Цитология 1996; 38(8): 787–814. [Mamaeva SE. The Patterns of the Karyotypic Evolution of Cells in Culture. Cytology 1996; 38(8): 787–814 (In Russ.)]
33. Tolar J, Nauta AJ, Osborn MJ, Panoskaltsis Mortari A, McElmurry RT, Bell S. Sarcoma Derived from Cultured Mesenchymal Stem Cells. Stem Cells 2007; 25(2): 371–9.
34. Borghesi A, Avanzini MA, Novara F, Mantelli M, Lenta E, Achille V, et al. Genomic Alterations in Human Umbilical Cord-Derived Mesenchymal Stromal Cells Call for Stringent Quality Control Before Any Possible Therapeutic Approach. Cytotherapy 2013; 15(11): 1362–73.
35. Ye CJ, Liu G, Bremer SW, Heng HH. The Dynamics of Cancer Chromosomes and Genomes. Cytogenet Genome Res. 2007; 118(2–4): 237–46.
36. Maitra A, Arking DE, Shivapurkar N, Ikeda M, Stastny V, Kassaei K, et al. Genomic Alterations in Cultured Human Embryonic Stem Cell. Nat Genet. 2005; 37(10): 1099–103.
37. Richards M, Tan S, Fong CY, Biswas A, Chan WK, Bongso A. Comparative Evaluation of Various Human Feeders for Prolonged Undifferentiated Growth of Human Embryonic Stem Cells. Stem Cell 2003; 21(5): 546–56.
38. Skottman H, Hovatta O. Culture Conditions for Human Embryonic Stem Cells. Reproduction 2006; 132(5): 691–8.
39. Anisimov SV, Morizane A, Correia AS. Risks and Mechanisms of Oncological Disease Following Stem Cell Transplantation. Stem Cell Rev. 2010; 6(3): 411–24.

40. Ben-David U, Mayshar Y, Benvenisty N. Large-scale Analysis Reveals Acquisition of Lineage-Specific Chromosomal Aberrations in Human Adult Stem Cells. *Cell Stem Cell* 2011; 9(2): 97–102.
41. Bernardo ME, Zaffaroni N, Novara F, Cometa AM, Avanzini MA, Moretta A. Human Bone Marrow Derived Mesenchymal Stem Cell do not Undergo Transformation after Long-Term in vitro Culture and Do Not Exhibit Telomere Maintenance Mechanisms. *Cancer Res.* 2007; 67(19): 9142–9.
42. Домнина АП, Фридлянская ИИ, Земелько ВИ, Пуговкина НА, Ковалева ЗВ, Зенин ВВ и др. Мезенхимные стволовые клетки эндометрия человека при длительном культивировании не подвергаются спонтанной трансформации. *Цитология* 2013; 55(1): 69–74. [Domnina AP, Fridlianskaia II, Zemelko VI, Pugovkina NA, Kovaleva ZV, Zenin VV, et al. Mesenchymal Stem Cells of Human Endometrium do not Undergo Spontaneous Transformation during Long-Term Cultivation. *Cytology* 2013; 55(1): 69–74 (In Russ.)]
43. Бочков НП, Воронина ЕС, Катосова ЛД, Никитина ВА. Цитогенетическое исследование мультипотентных мезенхимных стромальных клеток человека в процессе культивирования. *Медицинская генетика* 2009; 8(12): 3–6. [Bochkov NP, Voronina ES, Katosova LD, Nikitina VA. Cytogenetic Analysis of Human Multipotent Mesenchymal Stromal Cells during Cultivation. *Medical Genetics* 2009; 8(12): 3–6 (In Russ.)]
44. Tarte K, Gaillard J, Lataillade JJ, Fouillard L, Becker M, Mossafa H, et al. Clinical-Grade Production of Human Mesenchymal Stromal Cells: Occurrence of Aneuploidy without Transformation. *Blood* 2010; 115(8): 1549–53.
45. Попов БВ, Петров НС, Михайлов ВМ, Томилин АН, Алексеенко ЛЛ, Гринчук ТМ, Зайчик АМ. Спонтанная трансформация и иммортализация мезенхимных стволовых клеток в культуре in vitro. *Цитология* 2009; 51(2): 91–102. [Popov BV, Petrov NS, Mikhailov VM, Tomilin AN, Alekseenko LL, Grinchuk TM, Zaichik AM. Spontaneous Transformation and Immortalization of Mesenchymal Stem Cells In Vitro. *Cytology* 2009; 51(2): 91–102 (In Russ.)]
46. Pan Q, Fouraschen SM, de Ruiter PE, Dinjens WN, Kwekkeboom J, Tilanus HW, van der Laan LJ. Detection of Spontaneous Tumorigenic Transformation during Culture Expansion of Human Mesenchymal Stromal Cells. *Exp Biol Med* (Maywood). 2014; 239(1): 105–15.
47. Barkholt L, Flory E, Jekerle V, Lucas-Samuel S, Ahnert P, Bisset L, et al. Risk of Tumorigenicity in Mesenchymal Stromal Cell-Based Therapies — Bridging Scientific Observations and Regulatory Viewpoints. *Cytotherapy*. 2013; 15(7): 753–9.
48. Полянская ГГ. Проблема нестабильности генома культивируемых стволовых клеток человека. *Цитология* 2014; 56(10): 697–707. [Poljanskaya GG. The Problem of Genomic Instability of Cultivated Human Stem Cells. *Cytology* 2014; 56(10): 697–707 (In Russ.)]
49. Wang Y, Huso DL, Harrington J, Kellner J, Jeong DK, Turney J, McNiece IK. Outgrowth of a Transformed Cell Population Derived from Normal Human BM Mesenchymal Stem Cell Culture. *Cytotherapy* 2005; 7(6): 509–19.
50. Peterson SE, Loring JF. Genomic Instability in Pluripotent Stem Cells: Implications for Clinical Applications. *J Biol Chem*. 2014; 289(8): 4578–84.
51. Мамеева СЕ, Литвинчук ЛФ, Пинаев ГП. Закономерности кариотипической изменчивости в перевиваемых клеточных линиях человека. *ДАН СССР* 1983; 270(2): 456–8. [Mameeva SE, Litvinchuk LF, Pinaev GP. Patterns in Karyotypic Variability of Human Continuous Cell Lines. *DAN SSSR* 1983; 270(2): 456–8 (In Russ.)]
52. Мамеева СЕ. Атлас хромосом постоянных клеточных линий человека и животных. М.: Науч. мир; 2002. [Mamaeva SE. Atlas Chromosomes of Human and Animal Cell Lines. Moscow: Nauch. mir; 2002 (In Russ.)]
53. Baronchelli S, Bentivegna A, Redaelli S, Riva G, Butta V, Paoletta L, et al. Delineating the Cytogenomic and Epigenomic Landscapes of Glioma Stem Cell Lines. *PLoS One* 2013; 8(2): e57462.
54. Яковлева ТК, Ярцева НМ, Турилова ВИ. Прогрессия кариотипа клеточных линий острого миелобластного лейкоза человека. *Клеточные культуры* 2011; 27: 34–45. [Yakovleva TK, Yartseva NM, Turilova VI. Progression of Karyotype of Acute Myeloblastic Leukemia Cell Lines. *Cell Cultures* 2011; 27: 34–45 (In Russ.)]
55. Kowalczyk M, Srebniak M, Tomaszewska A. Chromosome Abnormalities without Phenotypic Consequences. *J Appl Genet.* 2007; 48(2): 157–66.
56. Laurent LC, Ulitsky I, Slavin I, Tran H, Schork A, Morey R, et al. Dynamic Changes in the Copy Number of Pluripotency and Cell Proliferation Genes in Human ESCs and iPSCs during Reprogramming and Time in Culture. *Cell Stem Cell* 2011; 8(1): 106–18.
57. Comings DE, Avelino E, Okada TA, Wyandt HE. The Mechanism of C- and G-Banding of Chromosomes. *Exp Cell Res.* 1973; 77(1): 469–83.
58. Sumner AT. Chromosome Banding and Identification Absorption Staining. In: *Chromosome Analysis Protocols. Methods in Molecular Biology*. Gosden GR, ed. Totowa: Humana Press; 1994. P. 59–81.
59. Speicher MR, Carter NP. The New Cytogenetics: Blurring the Boundaries with Molecular Biology. *Nat Rev Genet.* 2005; 6(10): 782–92.
60. Meisner LF, Johnson JA. Protocols for Cytogenetic Studies of Human Embryonic Stem Cells. *Methods* 2008; 45(2): 133–41.
61. Caspersson T, Zech L, Johansson C, Modest EJ. Identification of Human Chromosomes by DNA-Binding Fluorescent Agents. *Chromosoma* 1970; 30(2): 215–27.
62. Schweizer D, Ambros PF. Chromosome Banding. Stain Combinations for Specific Regions. *Methods Mol Biol.* 1994; 29: 97–112.
63. Schweizer D. Reverse Fluorescent Chromosome Banding with Chromomycin and DAPI. *Chromosoma* 1976; 58(4): 307–24.
64. Tobey RA, Crissman HA. Unique Techniques for Cell Analysis Utilizing Mithramycin and Flow Microfluorometry. *Exp Cell Res.* 1975; 93(1): 235–9.
65. Lin CC, Van de Sande JH. Differential Fluorescent Staining of Human Chromosomes with Daunomycin and Adriamycin — the D-Bands. *Science* 1975; 190(4209): 61–3.
66. Anderson R. Multiplex Fluorescence In Situ Hybridization (M-FISH). *Methods Mol Biol.* 2010; 659: 83–97.
67. du Manoir S, Speicher MR, Joos S, Schröck E, Popp S, Döhner H, et al. Detection of Complete and Partial Chromosome Gains and Losses by Comparative Genomic In Situ Hybridization. *Hum Genet.* 1993; 90(6): 590–610.
68. Бочков НП. Клиническая генетика. М.: ГЭОТАР-МЕД; 2002. [Bochkov NP. Clinical Genetics. Moscow: GEOTAR-MED; 2002 (In Russ.)]
69. Schmid W. The Micronucleus Test. *Mutat Res.* 1975; 31(1): 9–15.
70. Olive PL, Bandth JP. The Comet Assay: a Method to Measure DNA Damage in Individual Cells. *Nat Protoc.* 2006; 1(1): 23–9.
71. Theisen A. Microarray-Based Comparative Genomic Hybridization (aCGH). *Nature Education* 2008; 1(1): 45.
72. Kim S, Misra A. SNP Genotyping: Technologies and Biomedical Applications. *Annu Rev Biomed Eng.* 2007; 9: 289–320.

Об авторах

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Российская Федерация, 127051, Москва, Петровский бульвар, д. 8, стр. 2

Рачинская Ольга Анатольевна. Эксперт 1 категории лаборатории биомедицинских клеточных продуктов Испытательного центра экспертизы качества лекарственных средств, канд. биол. наук

Меркулов Вадим Анатольевич. Заместитель генерального директора по экспертизе лекарственных средств, д-р мед. наук, профессор

Поступила 18.08.2017

Принята к публикации 08.02.2018

Authors

Federal State Budgetary Institution «Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products» of the Ministry of Health of the Russian Federation, 8/2 Petrovsky boulevard, Moscow 127051, Russian Federation

Olga A. Rachinskaya. 1st Professional Category Expert of the Laboratory of Biomedical Cell Products of the Testing Centre for Evaluation of Medicinal Products' Quality. Candidate of Biological Sciences

Vadim A. Merkulov. Deputy Director-General for Medicinal Products' Evaluation. Doctor of Medical Sciences, Professor

Received 18 August 2017

Accepted 8 February 2018