

## Обоснование методических подходов к экспертной оценке подлинности биомедицинских клеточных продуктов

Е. В. Мельникова<sup>1,\*</sup>, О. А. Рачинская<sup>1</sup>, Г. А. Трусов<sup>1</sup>, М. Д. Хорольский<sup>1</sup>, И. С. Семенова<sup>1</sup>,  
Н. В. Терешкина<sup>1</sup>, В. А. Меркулов<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Федеральное государственное бюджетное учреждение  
«Научный центр экспертизы средств медицинского применения»

Министерства здравоохранения Российской Федерации,  
Петровский б-р, д. 8, стр. 2, Москва, 127051, Российская Федерация

<sup>2</sup>Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования  
«Первый Московский государственный медицинский университет им. И. М. Сеченова»

Министерства здравоохранения Российской Федерации,  
Трубецкая ул., д. 8, стр. 2, Москва, 119991, Российская Федерация

На каждый разработанный биомедицинский клеточный продукт (БМКП), прошедший доклинические исследования, производитель (разработчик) составляет спецификацию, которая входит в состав регистрационного досье при подаче заявления на государственную регистрацию БМКП. В соответствии с Приказом Министерства здравоохранения Российской Федерации от 19 января 2017 г. № 14н «Об утверждении формы спецификации на биомедицинский клеточный продукт» спецификация должна содержать сведения об идентичности (подлинности) клеточной линии, входящей в состав БМКП, которая включает: морфологические характеристики, экспрессию специфических маркеров, экспрессию специфических генов, экспрессию специфических белков, а также маркеры стабильности клеточной линии. В Российской Федерации на сегодняшний день отсутствует практический опыт проведения экспертизы качества БМКП. **Цель работы:** обоснование методических подходов к определению идентичности (подлинности) клеточных линий, входящих в состав БМКП, в рамках экспертизы качества на модельной клеточной линии DF-2 при использовании методов, позволяющих характеризовать морфологический, генетический, иммунофенотипический и цитогенетический профиль клеточной линии. **Материалы и методы:** объектом исследования была клеточная линия DF-2 — дермальные фибробласты человека (мезенхимные стволовые клетки) — получена из Института цитологии РАН (Санкт-Петербург). В работе использовали следующие методы анализа: морфологический анализ; метод проточной цитометрии для иммунофенотипирования модельной клеточной линии DF-2; метод коротких tandemных повторов для построения аллельного профиля модельной клеточной линии; цитогенетическое исследование — DAPI-дифференциальное окрашивание метафазных хромосом. **Результаты:** в статье представлены методические подходы к определению подлинности препаратов, содержащих жизнеспособные клетки человека (аналогов БМКП), используемые в мировой практике, а также представлены результаты экспериментального определения показателя «Идентичность (подлинность)» на модельной клеточной линии. **Выводы:** методы оценки подлинности БМКП должны гарантировать однозначную идентификацию клеточной линии в соответствии с представленной спецификацией. В результате проведенных исследований отработана процедура экспертной оценки идентичности (подлинности) модельной клеточной линии.

**Ключевые слова:** биомедицинский клеточный продукт; идентичность (подлинность); экспертиза качества; клеточная линия

**Для цитирования:** Мельникова ЕВ, Рачинская ОА, Трусов ГА, Хорольский МД, Семенова ИС, Терешкина НВ, Меркулов ВА. Обоснование методических подходов к экспертной оценке подлинности биомедицинских клеточных продуктов. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение.* 2019;19(1):28–38. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2019-19-1-28-38>

**Контактное лицо:** Мельникова Екатерина Валерьевна; [MelnikovaEV@expmed.ru](mailto:MelnikovaEV@expmed.ru)

## Justification of Methodological Approaches to Identification Testing of Biomedical Cell Products

E. V. Melnikova<sup>1,\*</sup>, O. A. Rachinskaya<sup>1</sup>, G. A. Trusov<sup>1</sup>, M. D. Khorolsky<sup>1</sup>, I. S. Semenova<sup>1</sup>,  
N. V. Tereshkina<sup>1</sup>, V. A. Merkulov<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products,  
8/2 Petrovsky Blvd, Moscow 127051, Russian Federation

<sup>2</sup>I. M. Sechenov First Moscow State Medical University,  
8/2 Trubetskaya St, Moscow 119991, Russian Federation

The manufacturer (developer) has to prepare a specification for each newly developed biomedical cell product (BCP) that has passed the stage of preclinical studies. The specification is included into the registration dossier when applying for marketing authorisation of a BCP. In accordance with the Order of the Ministry of Health of the Russian Federation No. 14n of 19 January 2017 «On approval of the specification format for a biomedical cell product» the specification should contain information about authenticity of the cell line used in the BCP, namely:

morphological characteristics, expression of specific markers, expression of specific genes, expression of specific proteins, as well as markers of cell line stability. At present Russia has no practical experience in BCP quality evaluation. **The aim of the study** was to substantiate methodological approaches to authentication of cell lines used in BCPs as illustrated by quality evaluation of the DF-2 model cell line using test methods that allow for characterisation of the morphological, genetic, immunophenotypic, and cytogenetic profile of the cell line. **Materials and methods:** the study analysed the DF-2 cell line — human dermal fibroblasts (mesenchymal stem cells) obtained from the Institute of Cytology of the Russian Academy of Sciences (St. Petersburg). The following analytical test methods were used in the study: morphological analysis; flow cytometry for immunophenotyping of the DF-2 model cell line; short tandem repeats for creating an allelic profile of the model cell line; cytogenetic analysis — differential DAPI staining of metaphase chromosomes. **Results:** the paper summarises methodological approaches to identification testing of medicines containing living human cells (BCP analogues) currently used in international practice, and presents the results of authentication of the model cell line. **Conclusions:** methods used for BCP identification testing should ensure unambiguous authentication of the cell line according to its specification. The study performed helped to work out the procedure of authentication of a model cell line.

**Key words:** biomedical cell product; identification; authentication; quality evaluation; cell line

**For citation:** Melnikova EV, Rachinskaya OA, Trusov GA, Khorolsky MD, Semenova IS, Tereshkina NV, Merkulov VA. Justification of methodological approaches to identification testing of biomedical cell products. *BIOpreparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie = BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2019;19(1):28–38. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2019-19-1-28-38>

**Corresponding author:** Ekaterina V. Melnikova; [MelnikovaEV@expmed.ru](mailto:MelnikovaEV@expmed.ru)

Одним из критических показателей качества препаратов для медицинского применения является подлинность, определяющая соответствие формулы, состава, химической и биологической структуры препарата, предназначенного для применения в клинической практике, препарату, для которого доказана эффективность и безопасность в ходе проведения доклинических и клинических исследований. Учитывая сложность состава биомедицинских клеточных продуктов (БМКП) — наличие жизнеспособных клеток, которые могут при введении их реципиенту не только вызвать не требуемое вмешательство в систему его гомеостаза с развитием нежелательных реакций, но и создавать реальную угрозу здоровью человека инициированием опухолевого процесса — идентичность (подлинность) клеточного компонента БМКП играет важную роль в обеспечении гарантий применения безопасного препарата.

В Российской Федерации на сегодняшний день отсутствует опыт проведения экспертизы качества БМКП, однако мировой опыт оценки подлинности клеточных линий, входящих в состав препаратов клеточной терапии (аналогов БМКП), представлен достаточно широко. В настоящее время необходимо выделить следующие основные принципы определения подлинности клеточных линий (КЛ), принятые на мировом уровне.

В соответствии с монографией <1046> USP 41–NF 36<sup>1</sup> одним из трендов определения подлинности (аутентификации — выявления принадлежности конкретной клеточной линии конкретному человеку) клеточных линий, получивших распространение в последнее время, является использование технологии ДНК-фингерпринтинга, например анализа коротких tandemных повторов (short tandem repeat, STR), результаты которого должны содержаться в спецификации на готовый продукт на основе клеток и тканей человека.

Рабочей группой по биологическим лекарственным препаратам Европейского агентства по лекарственным средствам

было обращено внимание, что «на сегодняшний день использование проточной цитометрии считается недостаточным для доказательства подлинности препарата для клеточной терапии»<sup>2</sup>. Например, могут быть использованы методы построения генного профиля, анализ экспрессии микро-РНК, которые контролируют экспрессию целых классов генов, анализ эпигенетического профиля, изучающего степень метилирования генных промоторов, методы ДНК-фингерпринтинга.

Согласно рекомендациям American Type Culture Collection Standards Development Organization Workgroup ASN-0002 (2010), American National Standardization Institute (2012)<sup>3</sup>, эталоном анализа подлинности (аутентификации) КЛ является STR-анализ наряду с исследованием кариотипа. Ведущие мировые коллекции в спецификациях на КЛ человека указывают характеристику кариотипа и STR-профиль [1].

В соответствии с рекомендациями ВОЗ (WHO/BS/10.2132)<sup>4</sup> и ICH Q5D<sup>5</sup>, при характеристике клеточных банков необходимо подтверждать подлинность и генетическую стабильность КЛ (диплоидных, в том числе стволовых клеток) следующими методами: методы анализа профиля ДНК STR, SNP (Single nucleotide polymorphism) и др.; методы, основанные на HLA-типировании (Human leucocyte antigens, HLA); изоферментный анализ; цитогенетические методы.

На каждый разработанный БМКП, прошедший доклиническое исследование, разработчиком или производителем БМКП составляется спецификация, представляющая собой документ, содержащий сведения о его типе (аутологичный, аллогенный, комбинированный), качественном и количественном составе, биологических и иных характеристиках клеточной линии (клеточных линий) и БМКП. Форма спецификации утверждена Приказом Министерства здравоохранения РФ от 19 января 2017 г. № 14н «Об утверждении формы спецификации на биомедицинский клеточный продукт». В соответствии

<sup>1</sup> USP 41–NF 36 <1046> Cellular and tissue-based products.

<sup>2</sup> SME Workshop on CMC of Biological Medicinal Products. EMA London 14–16.04.2015. CMC ISSUES for Cell Based ATMP. [http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/Presentation/2015/05/WC500187353.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Presentation/2015/05/WC500187353.pdf)

<sup>3</sup> American Type Culture Collection Standards Development Organization Workgroup ASN-0002. Cell line misidentification: the beginning of the end. *Nat Rev Cancer*. 2010;10(6):441–8. <https://doi.org/10.1038/nrc2852>

<sup>4</sup> 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 (WHO/BS/10.2132). WHO; 2010. [https://www.who.int/biologicals/BS2132\\_CS\\_Recommendations\\_CLEAN\\_19\\_July\\_2010.pdf](https://www.who.int/biologicals/BS2132_CS_Recommendations_CLEAN_19_July_2010.pdf)

<sup>5</sup> ICH Topic Q 5 D Quality of Biotechnological Products: Derivation and Characterisation of Cell Substrates Used for Production of Biotechnological/Biological Products (CPMP/ICH/294/95). EMEA; 1998. [https://www.ema.europa.eu/documents/scientific-guideline/ich-q-5-d-derivation-characterisation-cell-substrates-used-production-biotechnological/biological-products-step-5\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/documents/scientific-guideline/ich-q-5-d-derivation-characterisation-cell-substrates-used-production-biotechnological/biological-products-step-5_en.pdf)

Дермальные фибробласты человека в составе медицинского изделия «Эквивалент дермальный, ЭД»	
Разработчик: Институт цитологии РАН (Санкт-Петербург)	
Первое изделие медицинского назначения, в котором использовались клетки кожи человека (было получено регистрационное удостоверение, срок действия которого истек)	
Предназначено для лечения термических поражений, трофических язв и ран другой этиологии	
ЭД — гель из белков внеклеточного матрикса ( <b>коллагена I типа</b> либо <b>фибриногена</b> ) с дермальными фибробластами человека, заключенными внутри геля	
ЭД на основе <b>коллагена (плотный и полужидкий)</b> обеспечивает эффективное заживление всех типов ран. Плотный накладывается на неадгезивную повязку и переносится на раневую поверхность. Полужидкий вариант ЭД можно наносить на раневую поверхность из медицинского шприца без иглы	ЭД на основе <b>фибриногена</b> (менее плотный чем на основе коллагена) — для заживления неглубоких ран. У пациентов с аллергией коллаген может вызывать негативную реакцию, и в этих случаях целесообразнее применять ЭД на основе фибрина
В процессе применения в клинической практике к 2012 г. было вылечено более <b>450</b> пациентов с разнообразными повреждениями кожного покрова и другими ранами	

Рис. 1. Пример использования дермальных фибробластов в клинической практике [2, 7, 8].  
Fig. 1. An example of using dermal fibroblasts in clinical practice [2, 7, 8].

со спецификацией определение «Идентичность (подлинность)» КЛ, входящей в состав БМКП, включает:

- морфологические характеристики (форма, размер, степень гетерогенности, особенности роста клеток и др.);
- экспрессию специфических маркеров (поверхностные маркеры: CD<sup>+</sup>, CD<sup>-</sup>);
- экспрессию специфических генов (при генетической модификации или дифференцировке; например для генетически модифицированных клеток должны быть указаны использованные генетические конструкции, особенности их состава, методы оценки стабильности, описание целевого гена, ответственного за терапевтический эффект);
- экспрессию специфических белков — собственные специфические белки или целевые белки, экспрессия которых обусловлена модификацией, связанной с терапевтическим действием БМКП (в том числе их количественное определение);
- маркеры стабильности клеточной линии (формула кариотипа, наличие структурных и численных хромосомных аномалий; «ДНК-отпечаток» КЛ: STR-профиль или однонуклеотидный полиморфизм (SNP-профиль КЛ). В данном случае под стабильностью КЛ подразумевается не классическое понятие стабильной (перевиваемой) КЛ, принятое в вирусологии, или стабильная экспрессия генно-инженерной конструкции, принятая в молекулярной биологии, а генетическая стабильность КЛ.

Таким образом, определение показателя «Идентичность (подлинность)» клеточного компонента зависит от происхождения КЛ и наличия модификации, при этом должен быть охарактеризован фенотипический и генотипический профиль клеток.

Кроме того, при обосновании стратегии контроля качества и состава спецификации необходимо учитывать сложность

стандартизации клеточного компонента БМКП (учитывая вариативность донорского материала) и отсутствие соответствующих референс-препаратов, поэтому спецификация должна содержать диапазон приемлемых значений подлинности КЛ, входящей в состав БМКП.

Целью данной работы является обоснование методических подходов к определению идентичности (подлинности) клеточных линий, входящих в состав БМКП, в рамках экспертизы качества на примере клеточной линии DF-2 при использовании методов, позволяющих характеризовать морфологический, генетический, иммунофенотипический и цитогенетический профиль КЛ.

В настоящее время в России отсутствуют зарегистрированные БМКП, а также БМКП, представленные на государственную регистрацию. Учитывая данный факт, для отработки методов оценки идентичности (подлинности) КЛ в рамках экспертизы качества БМКП была выбрана модельная КЛ DF-2, которая может представлять собой БМКП или входить в состав БМКП. Более того, к настоящему времени известны примеры успешного использования подобного типа КЛ в клинической практике [2–6], в том числе в рамках новых медицинских технологий (рис. 1) [2, 7, 8].

## Материалы и методы

### Материалы

Клеточная линия DF-2 — дермальные фибробласты человека (мезенхимные стволовые клетки) из кожи век 45-летнего донора — получена из Института цитологии РАН (Санкт-Петербург)<sup>6</sup> на 8-м пассаже. КЛ имеет нормальный кариотип;

<sup>6</sup> Российская коллекция клеточных культур позвоночных (РККК П). Институт цитологии РАН. [http://www.cytspb.rssi.ru/rkkk/katalog\\_rccc\\_v\\_2018\\_rus.pdf](http://www.cytspb.rssi.ru/rkkk/katalog_rccc_v_2018_rus.pdf)

свободна от бактерий, микоплазм, грибов; экспрессирует поверхностные антигены, характерные для мезенхимных стволовых клеток (МСК): CD44, CD73, CD90, CD105 и HLA-ABC; отсутствует экспрессия антигенов: CD34, CD45 и HLA-DR; КЛ способна к направленной дифференцировке в адипогенном, остеогенном и хондрогенном направлениях. Подробные характеристики и работа с КЛ описаны в работе Т.А. Крыловой с соавт. [9].

#### Методы

1. *Оценку подлинности* модельной КЛ проводили на 12-м пассаже. Однако необходимо обратить внимание, что при проведении экспертизы качества должны быть определены показатели качества КЛ, входящей в состав БМКП, на том пассаже, который используется для его производства.

2. *Культивирование* КЛ DF-2 осуществляли на среде DMEM/F-12 с HEPES (Gibco, кат. № 31330-038) с содержанием 10 % FBS (HyClone, кат. № SH30070.03), в условиях 5,0 % CO<sub>2</sub> при 37 °С и влажности 90 % в течение 21 сут (на протяжении 4 пассажей). Плотность посева составляла 20·10<sup>3</sup> клеток/см<sup>2</sup>. Среднее время удвоения популяции составило 44,9 ± 5,2 ч. Жизнеспособность — 99 %.

3. *Морфологическое исследование* клеток проводили при окрашивании клеточных препаратов по стандартной методике красителем Азур-зозином (арт. 12000101, ООО «МиниМед», Россия) по Романовскому–Гимзе. Окрашенные препараты просматривали в световом микроскопе MICROS (Австрия) (при увеличении ×40, ×100, ×1000). Фотографирование клеток осуществляли встроенной цветной цифровой камерой высокого разрешения CAM V400/1.3M.

4. *Определение иммунофенотипа* КЛ проводили методом проточной цитометрии с использованием прибора NovoCyte 3000 (ACEA, Biosciences, Inc., США) по стандартному протоколу. Применяли моноклональные антитела (Sony Biotechnology, США) к антигенам человека для иммунофенотипирования FITC anti-human CD90 (Thy1) (№ 2240535), PE anti-human CD44 (кат. № 2294035), PE/Cy7 anti-human CD73 (Ecto-55'-nucleotidase) (кат. № 2320045), Alexa Fluor® 700 anti-human CD45 (кат. № 2120115), APC anti-human CD105 (кат. № 2216035), APC/Cy7 anti-human CD34 (кат. № 2317565), Brilliant Violet 421™ anti-human HLA-DR (кат. № 2138175).

Рабочая концентрация суспензий клеток составляла 1·10<sup>6</sup> клеток/мл. Для оценки жизнеспособности использовали флуоресцентный маркер для ДНК 7-AAD Viability Staining Solution (кат. № 2702015, Sony Biotechnology, США).

Данные иммунофенотипического анализа обрабатывали с использованием программного обеспечения (NovoExpress 1.1.0) для проточной цитометрии. Оценивали 10000 событий. Клеточный дебрис был исключен путем гейтирования согласно сигналам светорассеяния. Мертвые клетки были исключены в соответствии с флуоресценцией 7-AAD. Спектральное перекрытие компенсировали с помощью одноцветных контролей.

5. *Построение аллельного профиля* модельной клеточной линии осуществляли методом коротких tandemных повторов с использованием двух наборов для определения STR-локусов: COrDIS Plus (арт. CP-192S, Gordiz, Россия) и AuthenticFiler™ PCR Amplification Kit (кат. № 4479566, Applied Biosystems, США) в соответствии с рекомендациями производителей. Выделение ДНК проводили при помощи набора PureLink gDNA (кат. № K182002, Invitrogen, США). Концентрацию ДНК определяли по оптической плотности раствора ДНК на приборе Nanodrop 2000 (Thermo Scientific, США). Амплификацию проводили

с помощью прибора T100 (Bio-Rad, Сингапур). Для получения полного STR-профиля проводили фрагментный анализ — электрофоретическое разделение продуктов амплификации на приборе Genetic Analyzer 3500 Series (Applied Biosystems, Сингапур), результаты обрабатывали с помощью программного обеспечения GeneMapper ID-X 1.4 (Applied Biosystems).

6. *Цитогенетическое исследование* проводили методом DAPI-дифференциального (4',6-Diamidino-2-Phenylindole, DAPI) окрашивания метафазных хромосом. При приготовлении клеточной суспензии клетки выдерживали 20 мин в гипотоническом растворе 0,56 % KCl при температуре 37 °С, осаждали клетки центрифугированием при 180 г в течение 5 мин и фиксировали в смеси ледяной уксусной кислоты и метанола в соотношении 3:1 со сменой фиксатора через 20 мин. Фиксированную клеточную суспензию по каплям наносили на предварительно очищенные и обезжиренные предметные стекла в оптимально подобранных с помощью метафазного спредера Nanabi-PO (ADSTEK Corporation, Япония) условиях. Полученные хромосомные препараты окрашивали флуоресцентным красителем DAPI (Fluoroshield with DAPI, Sigma, США), нанося каплю красителя на препарат под покровное стекло. Анализ метафазных хромосомных пластинок осуществляли на флуоресцентном микроскопе BX43 (Olympus Corp., Япония) при увеличении ×200 и ×600. Фотографирование клеток осуществляли встроенной цветной цифровой камерой высокого разрешения BV 300 (ASI, Израиль). Полученные изображения обрабатывали с помощью программного обеспечения для автоматизированных цитогенетических и морфологических исследований Band View System (ASI, Израиль).

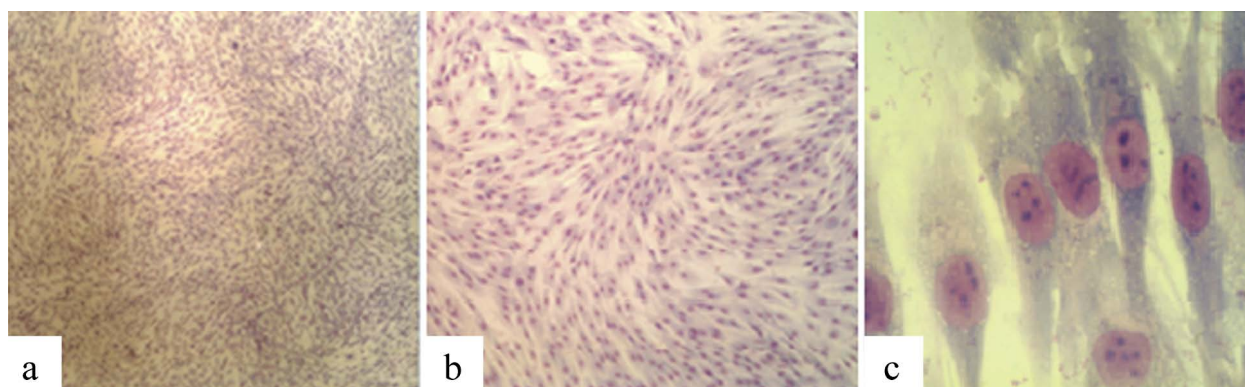
#### Результаты и обсуждение

Требуемый профиль идентичности (подлинности) БМКП должен быть изученным и подтвержденным по цитогенетическим, молекулярно-биологическим, иммунохимическим, физико-химическим показателям КЛ, входящих в его состав. Методы, выбранные для подтверждения требуемого профиля качества, эффективности и безопасности, должны быть научно обоснованы, объективны и адекватны, информативны и стандартизованы.

В соответствии с требованиями спецификации<sup>7</sup> к сведениям о КЛ, входящей в состав БМКП, основным принципом оценки идентичности (подлинности) клеточного компонента БМКП является использование совокупности методов, позволяющих осуществить характеристику морфологического, генетического, иммунофенотипического и цитогенетического профиля КЛ, входящей в состав БМКП.

Критерием приемлемости оценки подлинности КЛ является соответствие определенных в ходе экспертизы качества характеристик представленной спецификации. В соответствии с данным принципом нами была осуществлена оценка идентичности (подлинности) модельной КЛ, разработчицей которой показали стабильность ее свойств до 20 пассажа [9]. Необходимо отметить, что КЛ, используемая для производства, должна быть стандартизирована на этапе разработки и доклинических исследований БМКП, также должно быть установлено число пассажей, при которых показатели качества КЛ остаются приемлемыми. Например, для лечения трофических язв венозной этиологии использовали фибробласты, культивированные в течение 2–8 сут (до 3-го пассажа) [10]; при использовании аутологических фибробластов для коррекции возрастных изменений клетки культивировали 4–6 нед. (около 8–12 пассажей) [11].

<sup>7</sup> Приказ Минздрава России от 19 января 2017 г. № 14н «Об утверждении формы спецификации на биомедицинский клеточный продукт».



**Рис. 2.** Культура клеток DF-2. Окраска по Романовскому–Гимзе: а — увеличение  $\times 40$ ; б — увеличение  $\times 100$ ; в — увеличение  $\times 1000$  (масляная иммерсия).

**Fig. 2.** The DF-2 cell culture. Romanovsky–Giemsa staining: а —  $40\times$  magnification; б —  $100\times$  magnification; в —  $1000\times$  magnification (oil immersion).

Полученные данные по оценке идентичности (подлинности) модельной КЛ сравнивали с паспортом на КЛ, предоставленным Институтом цитологии РАН<sup>8</sup>.

Учитывая отсутствие на сегодняшний день общих фармакопейных статей для БМКП использованные методы при определении показателя «Идентичность (подлинность)» соответствуют требованиям фармакопей США<sup>9</sup> и ЕС<sup>10</sup>.

#### **Морфологический анализ**

Морфологический анализ модельной клеточной линии DF-2 показал, что исследованная культура характеризуется низким уровнем гетерогенности. Большую часть клеток (до 90 %) составляют фибробластоподобные клетки с четко различимым, центрально расположенным ядром, ядрышками (от 2 до 7, преимущественно до 5), цитоплазмой с перинуклеарной зернистостью, четко выраженной поточностью роста и многочисленными завихрениями (рис. 2).

Результаты морфологического анализа соответствуют описанным в работе Т.А. Крыловой с соавт. [9] и паспорте свойствам клеточной линии.

#### **Определение поверхностных маркеров**

При определении показателя «Идентичность (подлинность)» клеточного компонента методом проточной цитометрии проводят иммунофенотипирование клеток, входящих в его состав, с помощью меченных флуорохромами моноклональных антител, специфичных к антигенам целевых клеток или другим важным для конкретного исследования маркерам<sup>11</sup>. Пробоподготовка для исследования методом проточной цитометрии подлинности клеточного компонента БМКП, который представляет собой суспензию клеток, осуществляется по стандартной методике, однако пробоподготовка (получение суспензии клеток) при наличии в составе БМКП неклеточных компонентов, медицинского устройства, геля или других носителей (скаффолдов) может быть затруднена, а в некоторых случаях практически неосуществима без потери жизнеспособности клеток. Определение жизнеспособности клеток после отделения клеточного компонента от неклеточного является необходимой процедурой перед проведением анализа [12]. Таким образом, при проведении иммунофенотипирования кле-

ток, входящих в состав БМКП, методом проточной цитометрии в случае наличия в составе БМКП неклеточного компонента производителем для проведения экспертизы качества должна быть предоставлена методика отделения клеточного компонента от неклеточного.

При подтверждении фенотипа обеспечивают соблюдение следующих условий<sup>12,13</sup> [13]:

- концентрация клеток в конечной суспензии должна быть определена по крайней мере трижды методикой, которая валидирована для данного типа клеток (подсчет в камере Горяева, при использовании гемоцитометра или счетчиков клеток);
- между взятиями аликвот на анализ рекомендуется тщательно суспендировать клетки для более точного определения; полученное усредненное значение концентрации клеток в суспензии должно соответствовать выбранной дозе клеток и выбранному объему введения;
- объем суспензии для анализа должен превышать рассчитанный объем, необходимый для введения в прибор, в соответствии с рекомендациями производителей приборов (для компенсации потерь препарата на этапе введения в прибор, связанных с «мертвым» объемом шприцев и другими потерями);
- суспензия должна быть стерильной;
- суспензия не должна содержать примесей, информации о которых нет в регламенте подготовки клеток к введению. Наилучшим реагентом для разведения клеток является физиологический раствор или фосфатно-солевой буфер; от примесей питательной среды рекомендуется избавиться путем трехкратного переосаждения клеток;
- поскольку затруднительно точно определить период от подготовки образца (например, суспензии клеток после оттаивания) до его введения пациенту, то не рекомендуется хранить конечную суспензию клеток для анализа дольше, чем срок хранения до предполагаемого использования. По этой причине проводить тестирование продукта следует в течение периода не большего, чем время ожидания до инокуляции (например, 2 ч), в том числе для того, чтобы гарантировать правильную дозу клеток, вводимую пациенту.

В результате анализа иммунофенотипа модельной КЛ показано (табл. 1), что полученная из Института цитологии РАН

<sup>8</sup> Паспорт коллекционной клеточной линии DF-2.

<sup>9</sup> USP 41–NF 36 <1046> Cellular and tissue-based products.

<sup>10</sup> European Pharmacopoeia 9th Ed.

<sup>11</sup> USP 41–NF 36 <1027> Flow Cytometry.

<sup>12</sup> 2.7.24. Flow cytometry. European Pharmacopoeia 9th Edition.

<sup>13</sup> USP 41–NF 36 <1027> Flow Cytometry.

**Таблица 1.** Сравнение доли клеток, экспрессирующих поверхностные антигены в модельной клеточной линии DF-2, с данными литературы

**Table 1.** Comparison of the proportion of cells expressing surface antigens in the model DF-2 culture with literature data

Маркер	Доля клеток, несущих маркер, %	
	DF-2	DF-2 [9]
CD44	99,63 ± 0,15	99,5 ± 0,3
CD73	99,73 ± 0,1	99,4 ± 0,2
CD90	99,76 ± 0,06	99,4 ± 0,04
CD105	98,22 ± 1,24	95,4 ± 3,0
CD34	3,62 ± 0,99	0,07 ± 0,05
CD45	0,23 ± 0,07	0,32 ± 0,15
HLA-DR	0,2 ± 0,08	0,07 ± 0,03

*Примечание.* Даны средние значения и их ошибки доли клеток (несущих маркер) из 3 экспериментов.

КЛ DF-2 соответствует паспорту по характеру и уровню экспрессии исследованных поверхностных антигенов — CD90, CD73, CD105, CD44, что свидетельствует о том, что культура DF-2 человека представляет собой популяцию МСК.

Известно, что фибробласты отвечают большинству предложенных минимальных критериев идентификации МСК и одним из критериев, используемых для определения МСК, является отсутствие экспрессии CD34, CD45 и HLA-DR по меньшей мере в 98 % клеток [14].

Отличие в результатах экспрессии маркеров CD34, CD45 и HLA-DR по сравнению с данными паспорта клеточной линии свидетельствует о гетерогенности популяции модельной КЛ, что с высокой долей вероятности объясняется дифференцировкой некоторого количества клеток КЛ.

Необходимо также обратить внимание, что в настоящей статье была проанализирована модельная КЛ, которая не предназначена для производства БМКП. Для определения диапазона соответствия анализируемых параметров необходимо проведение валидационных мероприятий.

#### Определение маркеров стабильности клеточной линии

STR-анализ — автоматизированный метод, позволяющий достаточно быстро аутентифицировать клеточную линию человека и получить результаты в формате, подходящем для сравнения со стандартной референсной базой данных, паспортом, спецификацией или STR-профилем, полученным на основе клинического материала (например, крови) донора. STR-анализ не может выявить контаминацию клетками других биологических видов, для выявления которой рекомендуется использовать метод ПЦР с видоспецифичными праймерами [15].

Рабочей группой SDO ATCC (ASN-0002) и Международным комитетом по идентификации клеточных линий ICLAC для наглядного сравнения родственных клеточных линий (клеточной линии и донорского материала) рекомендованы восемь из наиболее информативных полиморфных маркеров в геноме человека (D5S818, D13S317, D7S820, D16S539, vWA, TH01, TPOX, CSF1PO) и ген амелогенина (принадлежность к полу) [1].

Учет результатов STR-анализа основан на алгоритме, предусматривающем определение числа общих аллелей между двумя клеточными линиями / между исходной клеточной

линией и линией, входящей в состав БМКП / между донорским материалом и клеточной линией, входящей в состав БМКП, выраженного в процентах. Оценку результатов проводят с использованием программного обеспечения к генетическому анализатору.

При необходимости производителем могут быть выбраны другие аналогичные методы (например, SNP-анализ [16]) или дано обоснование невозможности/нецелесообразности проведения метода определения STR-профиля КЛ при оценке показателя «Идентичность (подлинность)». Производитель вправе также рекомендовать использование любого из существующих наборов STR-анализа при условии доказательства целесообразности их использования и валидации методики.

Для оценки возможности использования метода STR-анализа для аутентификации КЛ человека, входящих в состав БМКП, в рамках экспертизы качества при определении показателя «Идентичность (подлинность)» нами была проведена аутентификация модельной КЛ. По итогу проведенных исследований были созданы STR-профили исследуемой модельной КЛ DF-2, которые сравнивали с данными паспорта (рис. 3, 4).

Полученные STR-профили клеточной линии DF-2 доказывают ее полное совпадение с представленным паспортом и происхождение от донора женского пола. В таблице 2 представлены данные, характеризующие совпадение аллелей в одинаковых локусах клеточных линий, определенные разными наборами, а также их соответствие паспорту.

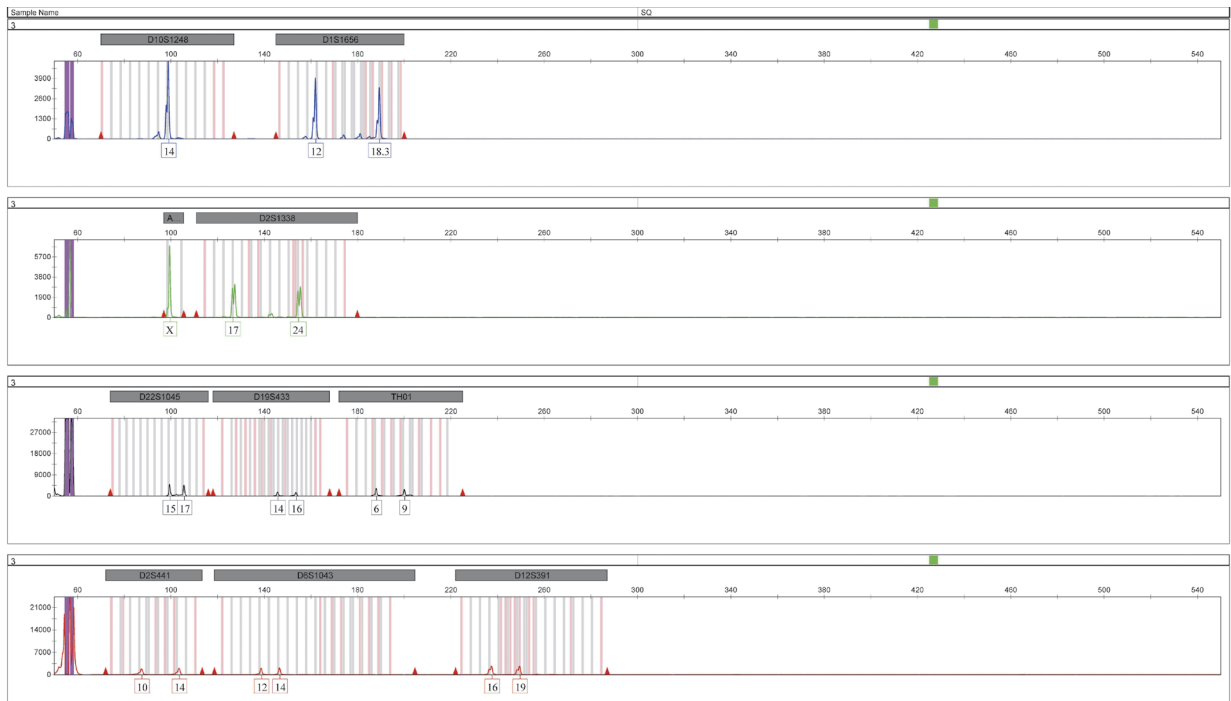
При определении маркеров стабильности КЛ цитогенетическими методами могут быть использованы как методы, основанные на анализе метафазных хромосом (табл. 3)<sup>14</sup> [17], так и методы, основанные на анализе интерфазных ядер и ДНК клеток — в случае невозможности получения достаточного количества клеток на стадии митоза (табл. 4) [18–20]. Для уточнения полученных результатов в некоторых случаях может возникнуть необходимость в применении нескольких цитогенетических методов.

**Таблица 2.** Данные экспериментально полученных STR-профилей и паспорта клеточной линии DF-2

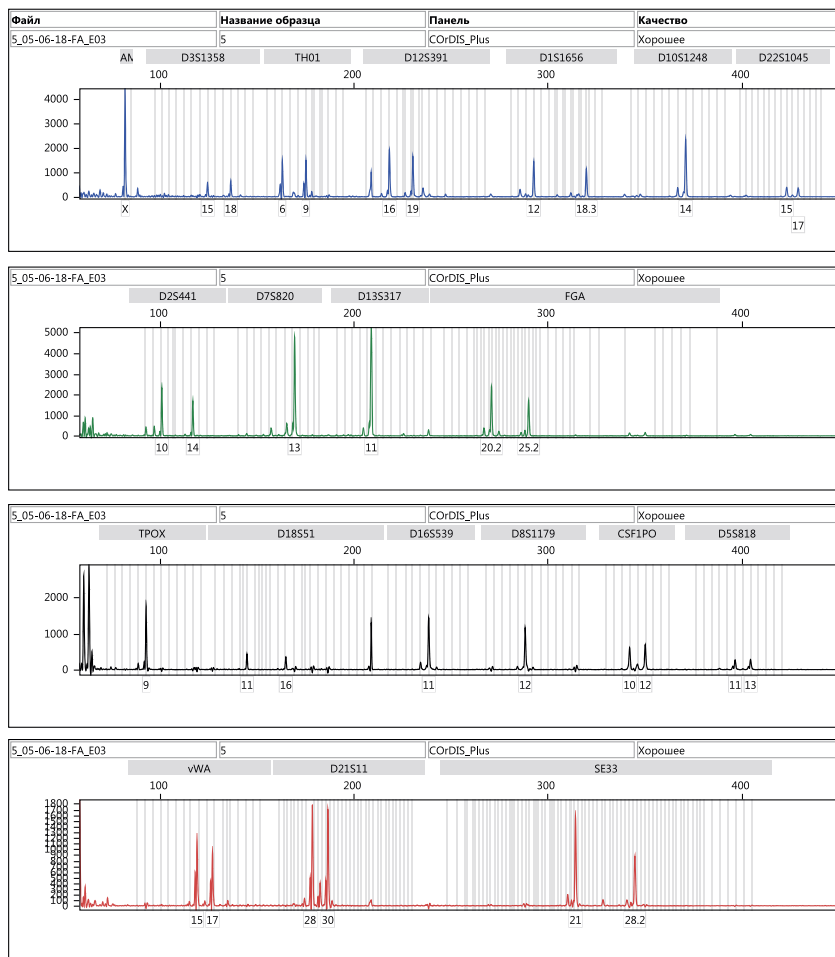
**Table 2.** Data of experimentally obtained STR-profiles and passport of DF-2 cell line

Данные паспорта	Данные STR-профилей, определенные набором...	
	AuthentiFiler PCR Amplification Kit	COrDIS plus
Amelogenin: X, X CSF1PO: 10, 12 D13S317: 11, 11 D16S539: 11, 11 D5S818: 11, 13 D7S820: 13, 13 TH01: 6, 9 TPOX: 9, 9 vWA: 15, 17	Amelogenin: X, X D10S1248: 14 D1S1656: 12, 18.3 D2S1338: 17, 24 D22S1045: 15, 17 D19S433: 14, 16 TH01: 6, 9 D2S441: 10, 14 D6S1043: 12, 14 D12S391: 16, 19	Amelogenin: X, X D10S1248: 14, 14 D1S1656: 12, 18.3 D3S1358: 15, 18 D22S1045: 15, 17 D7S820: 13, 13 TH01: 6, 9 D2S441: 10, 14 D12S391: 16, 19 D13S317: 11, 11 FGA: 20.2, 25.2 TPOX: 9, 9 D18S51: 11, 16 D16S539: 11, 11 D8S1179: 12, 12 CSF1PO: 10, 12 D5S818: 11, 13 vWA: 15, 17 D21S11: 28, 30 SE33: 21, 28.2

<sup>14</sup> Рубцов НБ. Методы работы с хромосомами млекопитающих: учебное пособие. Новосибирск: Новосибирский гос. ун-т; 2006.



**Рис. 3.** STR-профиль клеточной линии DF-2, полученный при амплификации набором AuthenticFiler PCR Amplification Kit.  
**Fig. 3.** The STR-profile of the DF-2 cell line obtained by amplification using the AuthenticFiler PCR Amplification Kit.



**Рис. 4.** STR-профиль клеточной линии DF-2, полученный при амплификации набором COrDIS plus.  
**Fig. 4.** The STR-profile of the DF-2 cell line obtained by amplification using the COrDIS plus kit.

Таблица 3. Методы, основанные на анализе метафазных хромосом  
Table 3. Methods based on the analysis of metaphase chromosomes

Метод	Возможности методов	Ограничения методов	Требование к материалу
Дифференциальное окрашивание, в том числе окрашивание хромосом красителем Гимзы и флуоресцентными красителями	Гендерная принадлежность клеток. Хромосомные перестройки, размером превышающие 10 млн п.н.: - инверсии; - дупликации/делеции; - сбалансированные и несбалансированные транслокации; - анеуплоидии. Клональный мозаицизм	Хромосомные перестройки, не превышающие 10 млн п.н.	Клеточный материал должен обладать достаточным количеством клеток на стадии митоза. Культивирование перед отбором материала должно осуществляться по требованиям методик анализа с возможным применением цитостатирующих и интеркалирующих хромосомы веществ. Таким образом, клеточная линия должна быть представлена в состоянии, гарантирующем сохранение заявленных в паспорте свойств клеток и обеспечивающем возможность проведения цитогенетического анализа
Спектральное кариотипирование (SKY) и многоцветная FISH (M-FISH)	Гендерная принадлежность клеток. Хромосомные перестройки, менее 10 млн п.н.: - сбалансированные и несбалансированные транслокации; - анеуплоидии. Клональный мозаицизм	Внутрихромосомные перестройки	

Таблица 4. Методы, основанные на анализе интерфазных ядер и ДНК клеток  
Table 4. Methods based on the analysis of interphase nuclei and DNA of cells

Метод	Возможности методов	Ограничения методов	Требование к материалу
Метафазная сравнительная геномная гибридизация (CGH) и матричная сравнительная геномная гибридизация (array-CGH)	Гендерная принадлежность клеток. Геномные изменения менее 10 млн п.н.: - изменение числа копий; - дупликации/делеции; - несбалансированные транслокации; - анеуплоидии. Клональный мозаицизм более 10 %	Сбалансированные транслокации. Инверсии. Клональный мозаицизм менее 10 %	Количество клеточного материала, прописанное в инструкции к реактивам для выделения ДНК
Флуоресцентная гибридизация <i>in situ</i> (FISH) на ядрах	Гендерная принадлежность клеток (при использовании зондов, специфичных к половым хромосомам). Численные и, возможно, структурные изменения районов хромосом, к которым выбраны локус-специфичные зонды	Перестройки районов хромосом, для которых не использовались локус-специфичные зонды	От 1·10 <sup>6</sup> клеток клеточной линии в состоянии, гарантирующем сохранение заявленных в паспорте свойств клеток и обеспечивающем возможность проведения анализа
Микроядерный тест	Ацентрические фрагменты хромосом. Отстающие хромосомы	Гендерная принадлежность клеток. Численные хромосомные аномалии. Структурные хромосомные аномалии без образования ацентрических фрагментов хромосом	От 1·10 <sup>6</sup> клеток клеточной линии в состоянии, гарантирующем сохранение заявленных в паспорте свойств клеток и обеспечивающем возможность проведения анализа

В процессе цитогенетического анализа модельной КЛ DF-2 общее число хромосом было посчитано в 540 клетках. Установлено, что около 2 % клеток обладают тетраплоидным кариотипом. Более 98 % клеток содержат околодиплоидный набор хромосом (45–46 хромосом). Такое процентное соотношение диплоидных и полиплоидных клеток не превышает значений (3–5 %), свойственных для тканей здорового человека.

Кариотипирование 17 метафазных пластинок выявило женский набор половых хромосом (45,XX или 46,XX) во всех исследованных клетках, что соответствует паспортным данным КЛ, полученной от донора женского пола [9].

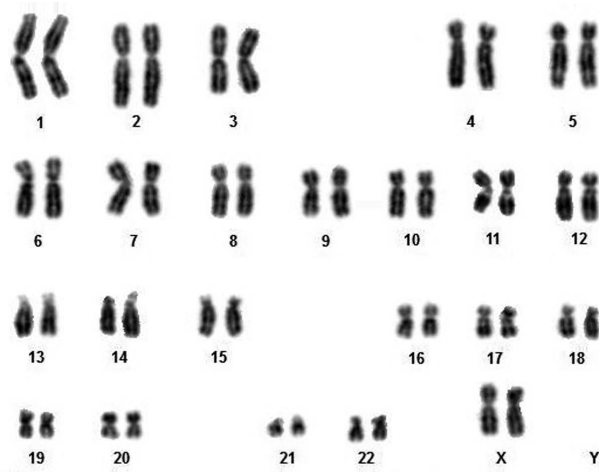
Нормальный кариотип (46,XX) несут 53 % клеток — модальный класс (рис. 5). Формула кариотипа человека — основная характеристика, определяющая статус линий клеток<sup>15</sup>. 47 % клеток исследованной клеточной линии обладают различными численными и/или структурными хромосомными аномалиями (рис. 5).

Подобная высокая варибельность клеток по числу хромосом и наличие межклеточной гетерогенности указывают на наличие генетической нестабильности у клеток исследуемой линии [21]. Генетическая нестабильность в клетках линии DF-2, возможно, свидетельствует о начальных стадиях старения этой клеточной линии [22].

Все выявленные в результате исследования хромосомные аномалии (анеуплоидии, внутрихромосомные перестройки, однохроматидные разрывы) носят неклональный характер, т.е. встречаются всего в одном из проанализированных кариотипов.

В большинстве цитогенетических лабораторий на данный момент принято при стандартном анализе исследовать 11 или более клеток для исключения мозаицизма более 25 % [20]. Число исследованных в настоящей работе клеток позволяет с достоверной вероятностью 95 % исключить наличие клона, составляющего более 17 % популяции клеток. Анализ большего числа метафазных пластинок в рамках проведения экспертизы

<sup>15</sup> Shaffer LG, McGowan-Jordan J, Schmid M, eds. ISCN (2013): An International System for Human Cytogenetic Nomenclature. Basel: S. Karger; 2013.



**Рис. 5.** Кариотип клеток линии DF-2 с модальным классом хромосом.  
**Fig. 5.** The DF-2 cell line karyotype with a modal class of chromosomes.

качества БМКП потребует большего количества клеточного материала и времени, что не всегда возможно получить в связи с ограниченным объемом и сроком годности БМКП. Таким образом, более полный цитогенетический анализ в целях подтверждения стабильности генома клеточной линии целесообразнее проводить на этапе доклинических исследований.

### Выводы

Методы оценки подлинности БМКП должны гарантировать однозначную идентификацию клеточной линии в соответствии с представленной спецификацией. В результате проведенных исследований отработана процедура экспертной оценки идентичности (подлинности) модельной КЛ.

Приемлемость использования той или иной КЛ для производства БМКП обосновывается разработчиком по результатам оценки качественных характеристик (идентичности (подлинности) КЛ, стерильности, бактериальных эндотоксинов, инфекционной безопасности, активности), стабильности их сохранения в процессе производства, а также проведения доклинических исследований БМКП.

На основании проведенных испытаний клеточного компонента БМКП по показателю «Идентичность (подлинность)» в нормативной документации (спецификации) рекомендуется внести следующие сведения о КЛ:

- форма, размер, степень гетерогенности, особенности строения и роста клеток;
- STR-профиль КЛ;
- видовая принадлежность клеток;
- гендерная принадлежность клеток;
- процентное содержание клеток с увеличенной плоидностью;
- процентное содержание и формула кариотипа клеток с модальным классом хромосом;
- процентное содержание клонов с кариотипом, отличным от клеток модального класса, или процентное содержание клеток с неклональными перестройками (если применимо). В случае наличия клеток с хромосомными аномалиями (особенно носящими клональный характер) производитель должен обосновать приемлемость использования данной клеточной линии при производстве препарата на ее основе;
- перечень и уровень экспрессии специфических генов (при генетической модификации или дифференцировке);

- перечень и уровень экспрессии специфических белков (собственных или белков, экспрессия которых обусловлена модификацией).

Учитывая сложность стандартизации клеточного компонента БМКП и отсутствие референс-препаратов, спецификация на БМКП должна содержать диапазон приемлемых значений, в том числе по показателю «Идентичность (подлинность)».

**Благодарности.** Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России № 056-00154-19-00 на проведение прикладных научных исследований (номер государственного учета НИР АААА-А18-118021590045-2).

**Acknowledgments.** The study reported in this publication was carried out as part of a publicly funded research project No. 056-00154-19-00 and was supported by the FSBI «SCE-EMP» of the Ministry of Health of Russia (R&D public accounting No. АААА-А18-118021590045-2).

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

**Conflict of interest.** Authors declare no conflict of interest requiring disclosure in this article.

### Литература/References

1. Masters JR, Reid YA. Cell line authentication and characterization. *eLS*. 2014. <https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0002559.pub2>.
2. Пинаев ГП. Необходимость соответствия нормативно-правового регулирования реальному процессу создания и применения биомедицинских клеточных технологий. *Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова*. 2012;8(3):61–4. [Pinaev GP. Compliance with regulatory actual process of creation and application of biomedical cell technologies. *Vestnik biotekhnologii i fiziko-himicheskoy biologii im. Yu.A. Ovchinnikova* = *Yu.A. Ovchinnikov bulletin of biotechnology and physical and chemical biology*. 2012;8(3):61–4 (In Russ.)]
3. Гилевич ИВ, Федоренко ТВ, Коломийцева ЕА, Богданов СБ, Поляков ИС, Порханов ВА. Опыт совершенствования оказания помощи ожоговым пациентам в Краснодарском крае. В кн.: *Сборник материалов всероссийской конференции с международным участием «StemCellBio-2018: фундаментальная наука как основа клеточных технологий»*, 15–17 ноября 2018 г., г. Санкт-Петербург. С. 21. [Gilevich IV, Fedorenko TV, Kolomyitseva EA, Bogdanov SB, Polyakov IS, Porhanov VA. Experience in improving the care of burn patients in the Krasnodar region. In: *Materials of the all-Russian conference with international participation «StemCellBio-2018: fundamental science as the basis of cellular technologies»*, November 15–17, 2018, St. Petersburg. P. 21 (In Russ.)]
4. Ионов ПМ, Юркевич ЮВ, Дейнега ИВ, Беседина НК, Багаева ВВ. Перспективы эндоскопического лечения бронхиальных свищей введением *in situ* культивированных аллофибробластов. В кн.: *Сборник материалов всероссийской конференции с международным участием «StemCellBio-2018: фундаментальная наука как основа клеточных технологий»*, 15–17 ноября 2018 г., г. Санкт-Петербург. С. 45–6. [Ionov PM, Yurkevich YuV, Deynega IV, Besedina NK, Bagaeva VV. Prospects for endoscopic treatment of bronchial fistulas by the injection of *in situ* cultivated alloblasts. In: *Materials of the all-Russian conference with international participation «StemCellBio-2018: fundamental science as the basis of cellular technologies»*, November 15–17, 2018, St. Petersburg. P. 45–6 (In Russ.)]
5. Алейник ДЯ, Арефьев ИЮ, Докукина ЛН, Чарыкова ИН, Соловьев РА, Стручков АА, Сидорова ТИ. Опыт использования культивированных фибробластов в комбусти-

- ологии (по данным Нижегородского ожогового центра). В кн.: *Сборник материалов всероссийской конференции с международным участием «StemCellBio-2018: фундаментальная наука как основа клеточных технологий»*, 15–17 ноября 2018 г., г. Санкт-Петербург. С. 9. [Aleyunik DY, Arefiev IU, Dokukina LN, Charykova IN, Solovyov RA, Struchkov AA, Sidorova TI. Experience in the use of cultured fibroblasts in combustiology (according to the Nizhny Novgorod burn center). In: *Materials of the all-Russian conference with international participation «StemCellBio-2018: fundamental science as the basis of cellular technologies»*, November 15–17, 2018, St. Petersburg. P. 9 (In Russ.)]
6. Вагнер ДО, Зиновьев ЕВ, Солошенко ВВ, Крылов ПК, Костяков ДВ, Юркевич ЮВ и др. Применение аллогенных фибробластов в комплексном лечении пациентов с обширными ожогами. В кн.: *Сборник материалов всероссийской конференции с международным участием «StemCellBio-2018: фундаментальная наука как основа клеточных технологий»*, 15–17 ноября 2018 г., г. Санкт-Петербург. С. 20. [Vagner DO, Zinoviev EV, Soloshenko VV, Krylov PK, Kostyakov DV, Yurkevich YuV, et al. The use of allergenic fibroblasts in the complex treatment of patients with extensive burns. In: *Materials of the all-Russian conference with international participation «StemCellBio-2018: fundamental science as the basis of cellular technologies»*, November 15–17, 2018, St. Petersburg. P. 20 (In Russ.)]
  7. Блинова МИ, Юдинцева НМ, Александрова ОИ, Баллюзек МФ, Хабарова ИГ, Маркин СМ, Чагунава ОЛ. Клинический опыт заживления трофических язв с использованием клеточного продукта «Эквивалент дермальный ЭД». *Здоровье — основа человеческого потенциала: проблемы и пути их решения*. 2015;10(2):690–4. [Blinova IM, Udintsev NM, Aleksandrova OI, Ballyuzek MF, Khabarova IG, Markin SM, Chagunava OL. Clinical experience healing of venous ulcers with the use of a cellular product «The dermal equivalent ED». *Zdorove — osnova chelovecheskogo potentsiala: problemy i puti ikh resheniya = Health is the basis of human potential: problems and their solutions*. 2015;10(2):690–4 (In Russ.)]
  8. Блинова МИ, Никольский НН, Михайлова НА. 25-летний опыт применения дермального эквивалента: итоги и перспективы. В кн.: *2-й Национальный Конгресс по регенеративной медицине. Материалы Конгресса*. 3–5 декабря 2015 года, Москва. М.: «МЕДИ Экспо»; 2015. С. 33–4. [Blinova MI, Nikol'skiy NN, Mikhailova NA. 25 years experience in the use of dermal equivalent: results and prospects. In: *II National Congress on Regenerative Medicine. Materials of the Congress*. December 3–5, 2015, Moscow. Moscow: «MEDI Ekspo»; 2015. P. 33–4 (In Russ.)]
  9. Крылова ТА, Мусорина АС, Зенин ВВ, Кольцова АМ, Кропачева ИВ, Турилова ВИ и др. Получение и характеристика неиммортизированных клеточных линий дермальных фибробластов человека, выделенных из кожи век взрослых доноров разного возраста. *Цитология*. 2016;58(11):850–64. [Krylova TA, Musorina AS, Zenin VV, Koltsova AM, Kropacheva IV, Turilova VI, et al. Derivation and characteristic of a non-immortalized cell lines of human dermal fibroblasts, generated from skin of the eyelids of adult donors of different age. *Tsitologiya = Cytology*. 2016;58(11):850–64 (In Russ.)]
  10. Мельцова АЖ, Гриценко ВВ, Орловский ПИ, Томсон ВВ, Сабельников ВВ, Шулепова ЕК и др. Применение дермальных фибробластов в комплексном лечении больных с трофическими язвами венозной этиологии. *Вестник хирургии им. И.И. Грекова*. 2007;166(1):72–7. [Meltsova AZh, Gritsenko VV, Orlovsky PI, Thomson VV, Sabelnikov VV, Shulepova EK, et al. Application of dermal fibroblasts in complex treatment of patients with trophic ulcers of venous etiology. *Vestnik khirurgii im. I.I. Grekova = Vestnik khirurgii named after I.I. Grekov*. 2007;166(1):72–7 (In Russ.)]
  11. Зорин В, Зорина А, Черкасов В, Копнин П, Деев Р, Исаев А и др. Применение аутологичных дермальных фибробластов для коррекции возрастных изменений кожи лица. Результаты годичных исследований. *Эстетическая медицина*. 2012;XI(2):171–82. [Zorin V, Zorina A, Cherkasov V, Kopnin P, Deev R, Isaev A, et al. The use of autologous dermal fibroblasts for correction of age changes of skin. The results of annual studies. *Esteticheskaya medicina = Aesthetic medicine*. 2012;XI(2):171–82 (In Russ.)]
  12. Трусов ГА, Чапленко АА, Семенова ИС, Мельникова ЕВ, Олефир ЮВ. Применение проточной цитометрии для оценки качества биомедицинских клеточных продуктов. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2018;18(1):16–24. [Trusov GA, Chaplenko AA, Semenova IS, Melnikova EV, Olefir YuV. Use of flow cytometry for quality evaluation of biomedical cell products. *BIOpreparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie = BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2018;18(1):16–24 (In Russ.)] <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2018-18-1-16-24>
  13. Ткачук ВА, ред. *Методические рекомендации по проведению доклинических исследований биомедицинских клеточных продуктов*. М.: МГУ им. М.В. Ломоносова; 2017. [Tkachuk VA, ed. *Methodical recommendations for conducting preclinical studies of biomedical cellular products*. Moscow: Lomonosov Moscow State University; 2017 (In Russ.)]
  14. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymalstromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006;8(4):315–7. <https://doi.org/10.1080/14653240600855905>
  15. Barallon R, Bauer SR, Butler J, Capes-Davis A, Dirks WG, Elmore E, et al. Recommendation of short tandem repeat profiling for authenticating human cell lines, stem cells, and tissues. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*. 2010;46(9):727–32. <https://doi.org/10.1007/s11626-010-9333-z>
  16. Мельникова ЕВ, Меркулова ОВ, Меркулов ВА, Олефир ЮВ, Ручко СВ, Бокованов ВЕ. Идентификация клеточных линий человека с использованием метода генотипирования короткими tandemными повторами: мировая практика. *Биофармацевтический журнал*. 2015;7(6):3–10. [Melnikova EV, Merkulova OV, Merkulov VA, Olefir YuV, Ruchko SV, Bokovanov VE. Human cell line identification by typing of short tandem repeats: world practice. *Biofarmaceuticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biopharmaceuticals*. 2015;7(6):3–10 (In Russ.)]
  17. Sumner AT. Chromosome banding and identification absorption staining. In: Gosden JR, ed. *Chromosome Analysis Protocols. Methods in Molecular Biology™*. Vol. 29. Totowa: Humana Press; 1994. P. 59–81. <https://doi.org/10.1385/0-89603-289-2:59>
  18. *Полиорганный микроядерный тест в эколого-гигиенических исследованиях*. Монография. Рахманин ЮА, Сычева ЛП, ред. М.: Гениус; 2007. [Multi-organ micro-nuclear test in ecological and hygienic research. Monograph. Rahmanin YuA, Sycheva LP, eds. Moscow: Genius; 2007 (In Russ.)]
  19. Theisen A. Microarray-based comparative genomic hybridization (aCGH). *Nature Education*. 2008;1(1):45.
  20. Гинтер ЕК, Золотухина ТВ, Антоненко ВГ, Шилова НВ, Цветкова ТГ, Жулева ЛЮ. *Цитогенетические методы диагностики хромосомных болезней. Методическое пособие для врачей*. М.; 2009. [Ginter EK, Zolotukhina TV, Antonenko VG, Shilova NV, Tsvetkova TG, Zhuleva LYu. *Cytogenetic methods of diagnosis of chromosomal diseases. Methodical manual for doctors*. Moscow; 2009 (In Russ.)]
  21. 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. *Tsitologiya = Cytology*. 1996;38(8):787–814 (In Russ.)]
  22. Moskalev AA, Shaposhnikov MV, Plyusnina EN, Zhavoronkov A, Budovsky A, Yanai H, Fraifeld VE. The role of DNA damage and repair in aging through the prism of Koch-like criteria. *Ageing Res Rev*. 2013;12(2):661–84. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2012.02.001>

## Об авторах

**Мельникова Екатерина Валерьевна**, канд. биол. наук, главный эксперт лаборатории биомедицинских клеточных продуктов Испытательного центра экспертизы качества лекарственных средств ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России, **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0002-9585-3545>

**Рачинская Ольга Анатольевна**, канд. биол. наук, эксперт 1 категории лаборатории биомедицинских клеточных продуктов Испытательного центра экспертизы качества лекарственных средств ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России, **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0001-8377-9205>

**Трусов Георгий Александрович**, эксперт 2 категории лаборатории биомедицинских клеточных продуктов Испытательного центра экспертизы качества лекарственных средств ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России, **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0002-8922-6342>

**Хорольский Михаил Дмитриевич**, старший лаборант лаборатории биомедицинских клеточных продуктов Испытательного центра экспертизы качества лекарственных средств ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России, **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0001-8222-0805>

**Семенова Ирина Семеновна**, канд. биол. наук, эксперт 1 категории лаборатории биомедицинских клеточных продуктов Испытательного центра экспертизы качества лекарственных средств ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России, **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0001-9026-0508>

**Терешкина Наталья Васильевна**, канд. мед. наук, эксперт 1 категории управления экспертизы безопасности лекарственных средств Центра экспертизы и контроля готовых лекарственных средств ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России, **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0002-6932-4965>

**Меркулов Вадим Анатольевич**, д-р мед. наук, профессор, заместитель генерального директора по экспертизе лекарственных средств ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России; профессор кафедры фармакологии ФГАОУ ВО «Первый МГМУ им. И. М. Сеченова» Минздрава России, **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0003-4891-973X>

Поступила 20.12.2018  
После доработки 10.02.2019  
Принята к публикации 14.02.2019

## Authors

**Ekaterina V. Melnikova**, Candidate of Biological Sciences, Chief Expert of the Laboratory of Biomedical Cell Products of the Testing Centre for Evaluation of Medicinal Products' Quality of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products, **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0002-9585-3545>

**Olga A. Rachinskaya**, Candidate of Biological Sciences, 1st Professional Category Expert of the Laboratory of Biomedical Cell Products of the Testing Centre for Evaluation of Medicinal Products' Quality of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products, **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0001-8377-9205>

**Georgy A. Trusov**, 2nd Professional Category Expert of the Laboratory of Biomedical Cell Products of the Testing Centre for Evaluation of Medicinal Products' Quality of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products, **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0002-8922-6342>

**Mikhail D. Khorolsky**, Major Laboratorian of the Laboratory of Biomedical Cell Products of the Testing Centre for Evaluation of Medicinal Products' Quality of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products, **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0001-8222-0805>

**Irina S. Semenova**, Candidate of Biological Sciences, 1st Professional Category Expert of the Laboratory of Biomedical Cell Products of the Testing Centre for Evaluation of Medicinal Products' Quality of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products, **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0001-9026-0508>

**Nataliya V. Tereshkina**, Candidate of Medical Sciences, 1st Professional Category Expert of the Division for Evaluation of Medicinal Products' Safety of the Center for Examination and Control of Finished Drugs of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products, **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0002-6932-4965>

**Vadim A. Merkulov**, Doctor of Medical Sciences, Professor, Deputy General Director for Medicinal Products Evaluation of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products; Professor of the Department of Pharmacology of I. M. Sechenov First MSMU, **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0003-4891-973X>

Received 20 December 2018  
Revised 10 February 2019  
Accepted 14 February 2019