

Культуры клеток в заместительной терапии

Е. М. Петручук, Н. В. Шалунова, Ю. В. Олефир, И. В. Борисевич, В. В. Перекрест,
В. А. Шевцов, А. В. Рукавишников, Л. М. Хантимирова

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

Поступила 27.06.2017 г. Принята к публикации 04.07.2017 г.

Клеточная заместительная терапия — одно из приоритетных направлений современной медицины, цель которого состоит в восстановлении структуры и функций поврежденных тканей путем трансплантации клеток, выращенных в условиях *in vitro*. В статье отражены обобщенные данные исследований по практическому применению диплоидных клеточных линий (аллогенных фибробластов) в заместительной терапии в различных областях медицины в рамках применения новых медицинских технологий. Описаны преимущества применения фибробластов и способы введения клеточной культуры в организм человека. В настоящее время применение медицинских средств, содержащих жизнеспособные клетки человека — биомедицинских клеточных продуктов, регулируется 180-ФЗ от 23.06.2016 г. «О биомедицинских клеточных продуктах». Клеточные культуры, входящие в состав БМКП, должны представлять собой морфологически однородную популяцию клеток определенного тканевого происхождения с ограниченным сроком жизни, стабильным кариотипом (не менее 75 % клеток должны иметь двойной набор хромосом), быть онкогенно безопасными, свободными от присутствия посторонних агентов, иметь низкую экспрессию антигенов гистосовместимости. В соответствии с 180-ФЗ, все характеристики клеточной линии, входящей в состав БМКП, подтверждающие качество, должны быть отражены в спецификации на БМКП. До принятия 180-ФЗ необходимым условием при использовании клеточных культур в клинической практике являлось наличие паспорта. Терапевтический потенциал фибробластов, связанный с оптимизацией течения репаративных процессов, повышением регенеративных и адаптивных возможностей организма, а также накопленный опыт их клинического применения в рамках медицинских технологий, обуславливает интерес к разработке БМКП на основе фибробластов и их применению в заместительной терапии. Однако, следует отметить, что в составе БМКП согласно 180-ФЗ не может быть использован «биологический материал, полученный путем прерывания процесса развития эмбриона или плода человека или нарушения такого процесса».

Ключевые слова: клеточные культуры; диплоидные клетки; аутофибробласты; аллофибробласты; трансплантация клеток; трансплантация тканей, биомедицинские клеточные продукты.

Библиографическое описание: Петручук ЕМ, Шалунова НВ, Олефир ЮВ, Борисевич ИВ, Перекрест ВВ, Шевцов ВА, Рукавишников АВ, Хантимирова ЛМ. Культуры клеток в заместительной терапии. БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение 2017; 17(4): 197–206.

Эффективное восстановление структуры и функций поврежденных органов и тканей — одна из актуальных проблем современной заместительной терапии. Перспективным направлением решения этой проблемы является использование биомедицинских технологий. Одними из современных тенденций развития клеточной заместительной терапии являются исследования в области длительно культивируемых клеток в системе *in vitro*. Источником клеточных культур могут быть эмбрионы и ткани взрослых животных и человека. Об актуальности применения клеточных культур человека в терапевтических целях свидетельствует и принятие нового 180-ФЗ от 23.06.2016 г. «О биомедицинских клеточных продуктах». Однако, следует отметить, что в составе БМКП, согласно 180-ФЗ, не может быть использован ксеногенный биологический материал и «биологический материал, полученный путем прерывания процесса развития эмбриона или плода человека или нарушения такого процесса».

Целью настоящей работы является анализ опыта и перспектив использования диплоидных клеточных линий в заместительной терапии, а также рассмотрение вопросов, касающихся требований и методов, подтверждающих качество клеточных линий, входящих в состав биомедицинских клеточных продуктов.

Изучение фибробластов

Впервые возможность выращивания клеток кожи, в частности, кератиноцитов *in vitro* была показана в исследованиях Р. В. Medawar [1, 2]. Большой вклад в разработку методов культивирования клеток внесли отечественные ученые А. А. Максимов, А. В. Румянцев, А. Д. Тимофеевский, Н. Г. Хлопин, Г. К. Хрущов [3–7]. Широкому распространению методов клеточных культур способствовало получение линий клеток из единичных фибробластов, растущих на стекле *in vitro* неопределенно долгое время, и разработка питательных сред для их культивирования [8–10].

Культивирование клеток *in vitro* — это выращивание отдельных клеток в оптимальных для данного типа условиях (температуры, состава газовой среды, соотношения питательных веществ и стимуляторов роста). Длительность пассирования и интенсивность роста клеток в культуре зависят от возраста организма, от которого получена клеточная линия. Эмбриональные ткани легко перевиваются *in vitro*, давая хороший прирост биомассы, в то время как получение линий клеток от взрослых организмов требует значительных усилий [1–3, 11]. Некоторые типы клеток нормальных тканей достаточно легко размножаются *in vitro*, в основном это миобласты, клетки эндотелия и

фибробласты. Фибробласты — основные клетки соединительной ткани, имеющие мезенхимальное происхождение и округлую, удлинённую или веретенообразную форму с отростками и плоским овальным ядром [12, 13].

В 1961 г. L. Hayflick и P. S. Moorhead представили данные о том, что даже в идеальных условиях культивирования фибробласты эмбриона человека способны делиться только ограниченное число раз (50 ± 10). Было установлено, что при пересевах в условиях *in vitro* клетки проходят шесть морфологически различных стадий: лаг-фазу, фазу ускоренного роста, логарифмическую фазу роста, фазу замедленного роста, стационарную фазу, фазу гибели клеток, после чего их способность к пролиферации исчерпывается. Последняя фаза жизни клеток в культуре была определена как клеточное старение, а сам феномен получил название «лимит Хейфлика» (по имени автора). Исключения составляют опухолевые клетки, способные к неограниченному росту [14].

Терапевтический эффект фибробластов

Сохранение диплоидного кариотипа фибробластов человека при культивировании в условиях *in vitro*, ограниченная продолжительность жизни, низкая экспрессия антигенов гистосовместимости, отсутствие онкогенных и туморогенных потенциалов позволило использовать их для терапевтических целей. Было показано, что фибробласты при нанесении на поврежденные участки кожи оказывают непосредственное влияние на заживление и эпителизацию ран [15, 16].

Для практического применения клетки подразделяют на аутологичные (собственные клетки организма) и аллогенные (клетки, получаемые из организма других людей). Аутологичные клетки получают из тканей конкретного человека и ему же затем трансплантируют, в то время как аллогенные клетки получают у совместимого донора и затем вводят реципиенту. Аутологичные клетки не подвергаются реакции отторжения трансплантата и не опасны по сравнению с аллогенными в связи с вероятным переносом последними контаминирующих агентов. Это делает возможным применение трансплантации клеток без приме-

нения иммуносупрессорной терапии [17]. Сравнение преимуществ и недостатков применения аутологичных и аллогенных фибробластов приведено в таблице 1.

Несмотря на ряд ограничений использования аллогенных клеток, в США и других странах мира, включая Россию, проводятся масштабные научные исследования, при этом объем использования аллогенных клеток превалирует над аутологичными [18].

Использование фибробластов в качестве лечебного препарата обусловлено их способностью ускорять механизмы регенерации и пролиферации за счет вырабатываемых ими следующих факторов:

- основной фактор роста фибробластов (β -FGF) влияет на рост всех типов клеток в ране, стимулирует продукцию внеклеточного матрикса (коллаген, эластин, фибронектин);
- β -трансформирующий фактор роста (β -TGF) стимулирует хемотаксис фибробластов и выработку новых волокон коллагена, эластина и фибронектина;
- эпидермальный фактор роста (EGF) ускоряет заживление и эпителизацию ран;
- фактор роста кератиноцитов (KGF) ускоряет пролиферацию и эпителизацию ран;
- α -трансформирующий фактор роста (α -TGF) активно влияет на ангиогенез [13].

В клинической практике в зависимости от поражения используются различные способы введения клеточной культуры в организм человека: аппликационный, внутримышечный, внутрисосудистый и внутриорганный. Рядом авторов при лечении раневых дефектов кожного покрова предложено применение культуры аллофибробластов при помощи аэрозольного нанесения [19–21].

Трансплантация клеточных продуктов осуществляется с помощью нативных клеток или используются носители естественного и искусственного происхождения. К качеству носителей предъявляется ряд требований: нетоксичность, биodeградируемость, механическая прочность, а также способность выращенных клеток к пролиферации и дифференцировке на их поверхности. Ряд исследователей считают необходимым использование синтетических

Таблица 1. Преимущества и недостатки использования аутологичных и аллогенных фибробластов

Культура клеток	Преимущества	Недостатки
Аутологичные фибробласты	• при применении наблюдается длительный клинический эффект; • исключен риск заражения пациента инфекционными агентами (ВИЧ, гепатит В и др.); • исключен риск развития аллергических реакций; • не возникает трудностей с поиском подходящих доноров; • не подвергаются реакции отторжения трансплантата; • для получения клеток биопсию кожи можно проводить неоднократно	• для получения достаточного количества клеточного материала необходимо 3–6 недель
Аллогенные фибробласты	• при применении обеспечивается быстрая эпителизация раневой поверхности и своевременное восстановление целостности кожного покрова; • для выращивания клеток необходимо 3–4 сут; • клетки могут быть предварительно наработаны и заморожены в больших количествах и доступны практически для немедленного применения; • возможность создания банков охарактеризованных клеток; • невысокая стоимость	• пересадка аллоклеток может привести к сенсибилизации организма чужеродными антигенами; • нельзя гарантировать отсутствие у донора тяжелых инфекционных заболеваний; • жизненный срок аллогенных фибробластов в трансплантате ограничен

носителей, другие авторы предлагают использовать биологические носители [22–24].

Опыт клинического применения фибробластов в России

В России биотехнология клеточных культур получила развитие в ряде учреждений здравоохранения и научно-исследовательских институтах: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт цитологии Российской академии наук, «Военно-медицинская академия имени С. М. Кирова» Министерства обороны Российской Федерации, ФГБУ «Институт хирургии им. А. В. Вишневского» Минздрава России, Федеральное государственное бюджетное учреждение Российский кардиологический научно-производственный комплекс Министерства здравоохранения Российской Федерации, Федеральное государственное бюджетное учреждение «Федеральный научный центр трансплантологии и искусственных органов имени академика В. И. Шумакова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Государственное автономное учреждение здравоохранения Свердловской области «Центр специализированных видов медицинской помощи «Институт медицинских клеточных технологий» и др.

В 1983 г. в Институте хирургии им. А. В. Вишневского впервые в мировой медицинской практике была организована лаборатория по культивированию клеток человека в прикладных целях. В лаборатории был разработан и внедрен в клиническую практику метод лечения обширных ожоговых ран, основанный на использовании культуры аллогенных фибробластов; использовались методы лечения обширных термических ожогов кожных покровов, при которых отмечалась недостаточность донорских участков кожи для аутодермопластики.

В 1989 г. В. П. Туманов с соавторами сообщили о применении культивированных аллофибробластов в лечении длительно незаживающих донорских ран [17]. Предпосылкой этому стали предшествовавшие фундаментальные исследования, показавшие ключевую роль фибробластов в регенеративных процессах. Преимуществами метода являлись небольшие сроки культивирования аллофибробластов (3 суток), хорошее приживление трансплантатов (в среднем 97 %), возможность создания банков клеток, относительно небольшая себестоимость. В отечественных и зарубежных изданиях были опубликованы обобщенные данные большого количества клинических исследований по использованию культуры фибробластов человека у пациентов с обширными ожогами. Показано, что после безуспешного применения практически всех традиционных методов терапии длительно незаживающих донорских ран продолжительность лечения которых составляет в среднем 50–60 суток, трансплантация культивированных аллофибробластов приводила к эпителизации уже через 6–8 суток. Кроме того, появление дополнительной донорской раневой поверхности, существующей до 12–14 суток и более на фоне тяжелого состояния больного с обширными ожогами, не может не отразиться на течении ожоговой болезни в послеоперационном периоде [25–28].

Культура фибробластов, выращенная на биосовместимой лавсановой пленке со сквозными порами Фолидерм (ООО «Фолиум», Россия), применялась в комплексном лечении трофических язв, обусловленных варикозной болезнью и посттромбофлебитическим синдромом. Сроки эпителизации составили в среднем 1,5 недели для вари-

козных и 3,2 недели для посттромбофлебитических язв, в то время как в контрольной группе при использовании хирургических и консервативных методов заживление язв наблюдалось у 82 % пациентов в течение 3,6–3,9 месяцев. Сообщалось о значительном сокращении у больных сроков заживления трофических язв после комплексного применения радиочастотной некрэктомии и имплантации аллофибробластов [29–31].

Одной из наиболее актуальных проблем в оториноларингологии остается лечение острых и хронических ран, восстановление слуха при травматическом разрыве барабанной перепонки. Разработан и апробирован в клинической оториноларингологии способ трансплантации культивированных аллофибробластов человека, позволяющий закрывать поврежденную перфорацию барабанной перепонки. Суть способа применения заключается в следующем: после дезэпителизации на края перфорации помещается кусочек прозрачной полимерной пленки соответствующего размера с нанесенной на нее культурой аллофибробластов человека, во время операции восстанавливается слух и в течение последующих 12–14 суток происходит активная регенерация барабанной перепонки без рубцовых деформаций. В результате лечения аллофибробластами предотвращается повторное инфицирование барабанной полости. Кроме того, метод прост в применении, малотравматичен и эффективен в 92 % случаев [32, 33].

Лечение больных с рецидивирующими и персистирующими эрозиями роговицы, в том числе послеожоговыми, является актуальной проблемой в офтальмологии. Предложен способ лечения эрозии роговицы, основанный на применении многослойного пласта аллогенных эпителиальных клеток, выращенных на внутренней поверхности контактной линзы, используемой с одной стороны в качестве матрицы и носителя клеток, а с другой — в качестве способа фиксации трансплантата [34]. Был предложен оригинальный метод лечения хронического пародонтита при использовании культивированных фибробластов человека на плодной твердой мозговой оболочке (ТМО). На основании экспериментальных и клинических данных было показано, что при применении ТМО с аллофибробластами для лечения хронического пародонтита средней и тяжелой степени процессы регенерации костных тканей и пародонта происходят более интенсивно, чем при имплантации синтетических материалов. Преимущество данного способа лечения заключается в том, что в раневом ложе при имплантации ТМО и аллофибробластов не происходит биodeградации плодного материала и культивированных аллофибробластов, а имплантат встраивается в костный дефект и трансформируется в дальнейшем в грубоволокнистую костную ткань альвеолярных отростков [35–37].

Опубликованы многочисленные исследования о возможности применения фетальных фибробластов для восстановительной терапии в косметологии. Как и во всех органах и тканях человеческого организма, в коже происходят возрастные изменения в течение жизни. Одной из основных причин старения кожи является снижение пролиферативной активности фибробластов, особенно быстро утрачивается способность к синтезу межклеточного вещества. Поэтому в стареющей коже уменьшаются содержание влаги, толщина дермы, снижается ее тургор, упругость и эластичность. Кожа истончается, растягивается, появляются сосудистые звездочки, пигментные пятна, морщины и складки. Через 6 месяцев после интрадер-

мального введения аутологичных фибробластов повышается толщина и упругость кожи, улучшается ее текстура, уменьшается количество и глубина морщин. В микроструктуре дермы усиливается активность кровотока, увеличивается объем и гидратация межклеточного матрикса, происходит стимуляция выработки собственного коллагена [38–40].

В 60-х годах прошлого века из кожно-мышечной ткани и легкого эмбриона человека были получены диплоидные клеточные линии (или диплоидные фибробласты человека) (ДКЛ). С развитием технологий получения ДКЛ стало возможным создание банков и сохранение клеток при низких температурах в замороженном состоянии в течение многих десятилетий, описание их характеристик, проведение всесторонних испытаний размороженных клеток перед их использованием на отсутствие посторонних агентов, онкогенного и туморогенного потенциалов.

Требования к качеству клеточных линий, предназначенных для применения у человека

Диплоидные клетки человека продолжают использоваться многими производителями в качестве субстратов для производства вакцин, безопасность и эффективность которых подтверждается данными многолетних исследований [41–43].

Клеточные культуры, применяемые для терапии людей с различной патологией, отличаются от клеточных линий, используемых в качестве субстратов для приготовления иммунобиологических лекарственных препаратов (ИЛП) по составу и предполагаемому механизму действия. Клеточные культуры для лечения людей должны представлять собой морфологически однородную популяцию клеток определенного тканевого происхождения с ограниченным сроком жизни, стабильным кариотипом (не менее 75 % клеток должны иметь двойной набор хромосом), быть онкогенно безопасными, свободными от присутствия посторонних агентов, иметь низкую экспрессию антигенов гистосовместимости.

Большое значение при изучении стабильности клеточных линий имеет поддержание необходимого уровня и особенностей дифференцировки, изменения кариотипа клеток (характеристика числа, размеров, структуры хромосом в процессе пассирования). Для применения ДКЛ необходимо изучение жизнеспособности линии, времени становления, активного роста и дегенерации. В качестве более доступного метода видовой идентификации клеточных культур и выявления возможной контаминации клетками иного видового происхождения применяют метод мультиплексной ПЦР с видоспецифическими праймерами.

Исходные ДКЛ должны быть получены из официальных коллекций, охарактеризованы в соответствии с национальными и международными требованиями и разрешены к применению для производства препаратов, вводимых людям в установленном порядке [44–46]. В связи с особенностями препарата, источником получения стерильных клеток, небольшим объемом серий, коротким сроком годности, особенностями хранения необходимо проводить детальное изучение методов его аттестации. Требования к качеству препарата должны охватывать все стадии жизненного цикла клеточной линии и представлять собой комплексную систему ее оценки, начиная с донора, времени, метода и способа получения. Следует оце-

нивать как производственный процесс, так и обеспечение стабильности характеристик [47].

В. П. Туманов с соавторами в обзоре по разработке и применению клеточных технологий в клинической практике в течение 30 лет приводит следующую форму паспорта клеточной культуры:

1. Происхождение и история клеточной культуры:
 - лаборатория, культивировавшая клетки;
 - сведения о культуре (ткань или орган, из которых приготовлена линия);
 - сведения о доноре (этническое, географическое происхождение, пол; при использовании фибробластов обязательно указание возраста донора).
2. История культивирования:
 - ссылки на метод выделения и культивирования;
 - описание оборудования и средств для культивирования;
 - состав сред (в том числе сыворотки, ферменты, гидролизаты; обязательны сопроводительные документы на используемое сырье);
 - физические и химические методы, использованные в процессе культивирования;
 - пассажы (количество пассажей).
3. Идентификация клеточной культуры (тесты могут быть выбраны произвольно):
 - морфологический анализ (субстрат культивирования, специфические маркеры, специфические антитела, генетический полиморфизм или другие генетические тесты);
 - анализ чистоты клеточной культуры (тесты могут быть выбраны произвольно): стерильность, присутствие микоплазм, посторонних вирусов.
4. Стабильность культуры:
 - сроки и условия наработки, хранения;
 - метод криоконсервации.

Разработанный паспорт клеточной культуры — аналог паспорта, принятого в Европе и США, необходимый в современных условиях применения клеточных культур в клинической практике [17], а также во многом согласуется с содержанием спецификации на БМКП [Приказ Министерства здравоохранения РФ от 19 января 2017 г. № 14н «Об утверждении формы спецификации на биомедицинский клеточный продукт»].

Для сравнения приводим форму паспорта на диплоидную клеточную культуру, в котором отражены требования для перевиваемых клеток — субстратов иммунобиологических препаратов, в том числе полученных из эмбриональной ткани, а также определяет требования и методы, подтверждающие качество клеточных линий:

1. Наименование линии;
2. Шифр коллекционный;
3. Происхождение;
4. История получения (кем и когда получена клеточная линия, сведения о доноре);
5. Коллекция;
6. Морфология;
7. Способ культивирования;
8. Среда для культивирования;
9. Посевная концентрация (количество клеток в 1 мл);
10. Метод снятия (0,25 % трипсин, 0,02 % раствор Версена);
11. Кратность посева;
12. Частота пассирования;
13. Условия криоконсервации (питательная среда, фетальная бычья сыворотка);

14. Номер пассажа в жидком азоте;
15. Жизнеспособность после криоконсервации (в процентах);
16. Контроль контаминации (наличие бактерий, грибов, микоплазм и вирусов);
17. Видовая идентичность (методы определения спектра изоферментов, кариологический анализ хромосом, ПЦР в реальном времени);
18. Кариология (стабильность кариотипа, межвидовая идентификация клеток);
19. Стабильность биологических свойств (количество рекомендованных для производства пассажей);
20. Область применения, чувствительность к производственному штамму вируса (или способность продуцировать биологически активное вещество) [45].

Опыт ГИСК им. Л. А. Тарасевича в аттестации диплоидных клеточных линий

В течение многих лет в специализированной лаборатории ГИСК им. Л. А. Тарасевича проводилась аттестация диплоидных клеточных линий человека и животных, представленных рядом производственных и научных учреждений страны в виде главного и рабочего банков. Комплексное изучение вновь установленных перевиваемых клеточных линий необходимо для их аттестации в качестве возможных субстратов для производства и контроля иммунологических лекарственных препаратов.

В соответствии с научной программой проводилась аттестация представленных авторами диплоидных клеточных линий (М-22, ЛЭЧ-4(81), Л-68, ФЭЧ-16-1 и ФЭЧ-16-2). Изучались культуральные, морфологические свойства клеток, их онкогенные потенции, чувствительность к некоторым вирусам, определялась их видовая идентичность, отсутствие контаминантов. ДКЛ с успехом культивировались на отечественных питательных средах с добавлением фетальной бычьей сыворотки. Определение жизненного цикла диплоидных линий показало, что клетки оставались способными к субкультивированию в зависимости от фазы роста. В фазе активного роста все культуры были представлены фибробластоподобными клетками, максимум митозов наблюдался к 96 часам после посева, модальное число хромосом ($2n = 46$) составляло 83–90 %. Электронная микроскопия подтверждала нормальную ультраструктуру, характерную для диплоидных клеток. Число клеток с гипо-, гипер- и полиплоидным набором, со структурными нарушениями хромосом определялось в соответствии с требованиями ВОЗ. Изучение подвижности изоферментов Г-6-ФДГ (глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа) и ЛДГ (лактатдегидрогеназа) показало отсутствие контаминации клетками других видов, посторонними агентами, в том числе и микоплазмами. Туморогенные и онкогенные свойства клеток не были выявлены ни на иммуносупрессированных животных, ни в органных культурах кожи куриного эмбриона. Представленные авторами банки клеточных линий были зарегистрированы в ГИСК им. Л. А. Тарасевича в качестве национальных для приготовления профилактических и диагностических препаратов [46, 47]. Впоследствии эти клеточные культуры были использованы для применения в заместительной терапии в Государственном бюджетном учреждении здравоохранения города Москвы «Научно-исследовательский институт скорой помощи им. Н. В. Склифосовского Департамента здравоохранения города Москвы», ФБУН «ЕНИИВИ»

Роспотребнадзора (г. Екатеринбург), ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора (г. Новосибирск).

В Институте им. Н. В. Склифосовского в комбустиологии для лечения пациентов на поверхность раны накладывали повязку, основание которой было выполнено из гидрофобной перфорированной кремнийорганической пленки Карбоксил-П («ВНИИмедполимер», Россия), покрытой слоем человеческого коллагена типа 1 и охарактеризованными клетками линии диплоидных фибробластов человека М-22 на уровне 15–25 пассажа. Предложенный способ позволил сократить срок заживления ожогов II–IIIА степени до 5–7 суток [48].

Известно о применении клеток М-22 в хирургической пародонтологии. В ФГБУ «ЦНИИСиЧЛХ» Минздрава России для лечения воспалительно-деструктивных форм пародонтита использовались препараты фирмы «Geistlich» (Швейцария): Bio-OSS и Bio-Gide. Перед применением гранулы Bio-OSS пропитывали взвесью клеток линии М-22 и помещали в костные дефекты. Через 3 месяца наблюдалось формирование новых костных структур, исчезновение или резкое снижение остеопороза, увеличивалась четкость контуров кости [49].

Препарат Культура клеток диплоидных человека для заместительной терапии был разработан на основе культуры клеток эмбриона человека ЛЭЧ-4(81), полученной и аттестованной в соответствии с требованиями Всемирной ассоциации клеточных культур в 1983 году группой авторов во главе с профессором Н. П. Глинских. Клеточная культура ЛЭЧ-4(81) представляет собой морфологически однородную популяцию фибробластов с ограниченным сроком жизни определенного тканевого происхождения и сохраняющего стабильный диплоидный кариотип ($2n$ не менее 75 %); культура свободна от антигенов гистосовместимости и не содержит грибов, бактерий, микоплазм и вирусов [50]. Препарат был зарегистрирован Минздравом России в качестве оригинального иммунобиологического препарата и внесен в Государственный реестр лекарственных средств, в 2002 г. был разрешен для медицинского применения и промышленного выпуска.

Препарат успешно применяется в комбустиологии и хирургии (лечение глубоких и обширных ожогов любых ран, трофических язв, в том числе при сахарном диабете), в стоматологии (при оперативном лечении пародонтита, периодонтита, цистэктомии, резекции верхушки корня зуба, рецессии десны, вестибулопластике, язвенно-некротических поражениях слизистой оболочки полости рта, после удаления зуба с целью ускорения костной регенерации при последующей имплантации, в имплантологии), в челюстно-лицевой хирургии, в косметологии (для лечения возрастных изменений кожи, угревой болезни, рубцов, алопеций, папиллом, бородавок, шипиг), у больных с травмами опорно-двигательного аппарата. Для применения в комбустиологии препарат выпускается в виде взвеси клеток и на биополимерном покрытии Фолидерм, для стоматологии — на остеопластических материалах Гапкол-Л и Коллапан-Л, содержащих коллаген и гидроксиапатит [51, 52]. На основе препарата Культура клеток диплоидных человека для заместительной терапии была получена лиофилизированная форма аллофибробластов (АФБ) для лечения герпесвирусных инфекций. Препарат АФБ оказался эффективным также при лечении глубоких обширных субдермальных ожоговых ран III(A, Б) и IV степени, при обморожениях, при лечении слизистых оболочек ротовой полости и носоглотки. Было показано, что препа-

рат АФБ обладает бактерицидным репаративным действием [53].

В ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» (г. Новосибирск) на основе штаммов диплоидных клеток легкого эмбриона человека (Л-68), фибробластов эмбриона человека (ФЭЧ 16-1) и кожно-мышечной ткани человека (ФЭЧ 16-2) был разработан препарат Культуры клеток диплоидные человека для заместительной терапии. Препарат выпускают в форме монослойной культуры клеток на основе биodeградируемого носителя коллаген-хитозановой пленки, суспензии клеток в питательной среде или растворе Хэнкса, суспензии клеток в питательной среде Игла MEM в замороженном состоянии и суспензии клеток в 5 % геле полиэтиленоксида. Морфологически диплоидные линии Л-68, ФЭЧ 16-1 и ФЭЧ 16-2 в фазе активного роста были представлены фибробластоподобными клетками с четко выраженной поточностью. В доклинических исследованиях было подтверждено отсутствие признаков токсичности, анафилактической, местного раздражающего действия, пирогенности у животных (ФСП 42-0196532004). В результате проведенных исследований было показано, что в диплоидных клетках отсутствовали возбудители ВИЧ-инфекции, герпеса, туберкулеза, сифилиса, хламидиоза, токсоплазмоза, цитомегалии, уреаплазмоза, микоплазмоза и гепатита В. При проведении опытов по эффективности и безопасности была определена доза препарата и его переносимость при лечении пациентов: с ожогами общей площадью 10–25 % поверхности тела, из которых глубокие ожоги IIIA–IIIB степени составляли 5–15 %; с трофическими язвами на фоне хронической венозной недостаточности; с хроническими ранами после длительных нагноительных процессов; с хроническими язвами на фоне сахарного диабета. Определили вероятность развития нежелательных побочных эффектов и их зависимость от дозы препарата, обширности раневого процесса, сопутствующих заболеваний и терапии. Оценку переносимости препарата проводили на основании визуальной оценки ран в процессе лечения, данных клинического анализа крови, динамики клеточного состава в цитологических отпечатках ран. В результате проведенных исследований было показано, что препарат является малотоксичным, не обладает раздражающим, алергизирующим, токсическим, онкогенным свойствами и может быть применен для лечения пациентов с длительно незаживающими ранами различного генеза [54, 55].

На сегодняшний день использование упомянутых аттестованных эмбриональных клеточных линий человека возможно лишь в научных целях, в клинической практике — запрещено в соответствии с 180-ФЗ.

Развитие новых биомедицинских технологий целиком зависит от наличия необходимого количества клеточного материала, не вызывающего иммунного отторжения трансплантатов. Клеточные культуры могут быть связаны с дополнительными компонентами, тогда их следует рассматривать как часть готового биологического препарата.

Научные исследования, направленные на разработку новых методов применения культуры фибробластов являются актуальными и перспективными, так как позволяют оптимизировать течение репаративных процессов, повысить регенеративные и адаптивные возможности организма.

Заключение

Одним из перспективных методов лечения в современной медицине является заместительная клеточная терапия,

позволяющая восстанавливать пораженные органы и ткани, стимулировать регенеративные и адаптивные возможности организма человека за счет трансплантации клеток, выращенных *in vitro*. Опыт клинического использования в России в рамках медицинских технологий показывает, что особое место в заместительной терапии ДКЛ занимают фибробластоподобные клетки, полученные из эмбриональных тканей. Это в первую очередь относится к ДКЛ, аттестованным в соответствии с требованиями ВОЗ: ЛЭЧ-4(81), Л-68, М-22, ФЭЧ 16-1 и ФЭЧ 16-2. Аттестация и сохранение ДКЛ в криобанках при температуре жидкого азота способствовало сокращению сроков получения трансплантатов, готовых к использованию в клинике через 3–4 суток, а в случае экстренной необходимости через сутки. Однако на сегодняшний день использование на территории Российской Федерации упомянутых аттестованных эмбриональных клеточных линий человека возможно лишь в научных целях, разработки и применение в клинической практике — запрещены в соответствии с 180-ФЗ. Кроме того, биомедицинские клеточные продукты могут использоваться в широкой медицинской практике только после их государственной регистрации [56].

Литература

1. Medawar PB. Sheets of pure epidermal epithelium from human skin. *Nature* 1941; (148): 783–4.
2. Medawar PB. The cultivation of adult mammalian skin epithelium *in vitro*. *Quart Microsc Sci.* 1948; 89: 187–96.
3. Максимов АА. О культивировании *in vitro* соединительной ткани взрослых млекопитающих. *Русский архив анатомии, гистологии и эмбриологии* 1916; 1(1): 115–82.
4. Румянцев АВ. Большая советская энциклопедия 1975; 22: 391–2.
5. Тимофеевский АД. Длительные культуры тканей и малигнизация клеток. *Вестник Академии медицинских наук СССР* 1964; 11(3): 205–6.
6. Хлопин НГ. Большая медицинская энциклопедия 1986; 26: 556.
7. Хрущов ГК. Большая советская энциклопедия 1978; 28: 407.
8. Sanford KK, Earle WR, Likely GD. The growth *in vitro* of single isolated tissue cells. *J Natl Cancer Inst.* 1948; 9(3): 229–46.
9. Sanford KK, Merwin RM, Hobbs GL, Young JM. Clonal analysis of variant cell lines transformed to malignant cells in tissue culture. *J Natl Cancer Inst.* 1959; 23: 1035–59.
10. Eagle H. Nutrition needs of mammalian cells in tissue culture. *Science* 1955; 122(3168): 501–14.
11. Колокольцова ТД, Юрченко НД, Нечаева ЕА, Радаева ИФ, Шалунова НВ, Петручук ЕМ и др. Получение аттестованных фибробластов человека, пригодных для научных и медицинских исследований. *Биотехнология* 2007; (1): 58–64.
12. Бобро ЛИ. Фибробласты и их значение в тканевых реакциях. *Архив патологии* 1990; 52(12): 65–8.
13. Гончарова ВП. Факторы роста фибробластов (краткий обзор). *Физиологический журнал им. И. М. Сеченова* 1994; 9(80): 163–73.
14. Hayflick L, Moorhead PS. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res.* 1961; 25: 585–621.
15. Coulomb B, Saïag P, Bell E, Breitburd F, Lebreton C, Heslan M, Dubertret L. A new method for studying epidermalization *in vitro*. *Br J Dermatol.* 1986; 114(1): 91–101.
16. Coulomb B, Lebreton C, Dubertret L. Influence of human dermal fibroblasts on epidermalization. *J Invest Dermatol.* 1989; 92(1): 122–5.
17. Туманов ВП, Жакота ДА, Корчагина НС. 30-летний опыт разработки и применения клеточных технологий в клинической практике. *Пластическая хирургия и косметология* 2012; (3): 433–49.
18. Олефир ЮВ, Медуницын НВ, Авдеева ЖИ, Солдатов АА, Мовсисянц АА, Меркулов ВА, Бондарев ВП. Современные биологиче-

- ские / биотехнологические лекарственные препараты. Актуальные вопросы разработки и перспективы использования. БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение 2016; 16(2): 67–77.
19. Чаплыгин СС. Применение культуры аллофибробластов в лечении раневых дефектов кожного покрова (экспериментальное исследование): дис. ... канд. мед. наук. Самара; 2013.
 20. Келлер Г, Себастиан Дж, Лакомбе Ю, Тофт К, Ласк Г, Ревазова Е. Сохранность инъецируемых аутологичных человеческих фибробластов. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины 2000; 130(8): 203–6.
 21. Gerlach JC, Johnen C, Ottomann C, Bräutigam K, Plettig J, Belfekroun C, et al. Method for autologous single skin cell isolation for regenerative cell spray transplantation with non-cultured cells. Int J Artif Organs 2011; 34(3): 271–9.
 22. Савинцева ИВ, Селезнева ИИ, Гаврилюк БК. Гидроген на основе коллагена типа 1 и хитозана — система иммобилизации и направленной доставки клеток. В кн.: Сборник тезисов конференции «Стволовые клетки и перспективы их использования в здравоохранении». М.; 2006; С. 19–20.
 23. Хрупина АС, Юркевич ЮВ, Смолянинов АБ, Трофимова ИЛ, Супильникова ОВ, Крылов КМ и др. Применение геля гидроксизтилцеллюлозы в качестве клеточного носителя для трансплантации культивированных аллофибробластов на обширные раневые поверхности. Здоровье — основа человеческого потенциала: проблемы и пути их решения 2013; 8(2): 698–700.
 24. Адамян АА, Голованова ПМ, Добыш СВ, Килимчук ЛЕ, Кригер АГ, Фрончек ЭВ. Биологическая композиция для лечения ран «Коллахит». Патент Российской Федерации, № 2108114; 1998.
 25. Саркисов ДС, Федоров ВД, Глуценко ЕВ, Алексеев АА, Туманов ВП, Серов ГГ и др. Использование культивированных фибробластов при лечении обожженных. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины 1995; (6): 566–70.
 26. Алексеев АА, Саркисов ДС, Яшин АЮ, Кашин ЮД, Крутиков МГ. Восстановление кожных покровов на основе применения культивированных аллофибробластов. В кн.: Материалы городской научно-практической конференции «Новые медицинские технологии в лечении тяжелообожженных» М.; 1997; С. 52.
 27. Алексеев АА, Кашин ЮД, Яшин АЮ, Рахеев АМ. Техника хирургического лечения на основе применения культивированных аллофибробластов. В кн.: Материалы II Международного симпозиума «Новые методы лечения ожогов с использованием культивированных клеток кожи». Саратов: 1998; С. 9–12.
 28. Алейник ДЯ, Аминев ВА, Чарыкова ИН, Кувакина НА. Использование современных биотехнологий для лечения поверхностных ожогов у детей младшего возраста. В кн.: Материалы II Международного симпозиума «Новые методы лечения ожогов с использованием культивированных клеток кожи». Саратов; 1998; С. 6–8.
 29. Рашитова АД, Фаязов РР, Мухамедьянов ГС, Чистоступов КС. Клеточные технологии в комплексном лечении трофических язв при тяжелой хронической венозной недостаточности. Кубанский научный медицинский вестник 2008; 6(105): 60–3.
 30. Седов ВМ, Андреев ДЮ, Смирнова ТД, Парамонов БА, Енькина ТН, Соминина АА и др. Клеточная терапия в лечении трофических язв нижних конечностей. Вестник хирургии им. И. И. Грекова 2006; 165(2): 90–4.
 31. Винник ЮС, Салмина АБ, Дробушевская АИ, Теплякова ОВ, Пожиленкова ЕА, Зыкова ЛД. Клеточные технологии и тканевая инженерия в лечении длительно незаживающих ран. Вестник экспериментальной и клинической хирургии 2011; 4(2): 392–7.
 32. Поматилов АА. Лечение острых и хронических ран в оториноларингологии методом трансплантации культивированных аллофибробластов человека: дис. ... д-ра мед. наук. М.; 2008.
 33. Туманов ВП, Пальчун ВТ, Поматилов АА, Миронов АА. Способ устранения травматического дефекта барабанной перепонки. Патент Российской Федерации, № 2165765; 2001.
 34. Гундоров РА, Макаров ПВ, Васильев АВ, Терских ВВ, Ходжабекян ГВ, Правильникова ПА и др. Способ лечения эрозии роговицы. Патент Российской Федерации, № 2173122; 2001.
 35. Рунова ГС. Использование культивированных аллофибробластов в комплексном лечении заболеваний пародонта: дис. ... канд. мед. наук. М.; 2000.
 36. Кяримова РР, Лахонина КА, Фаркашди Ш. Применение фибробластов в стоматологии. Электронный научно-образовательный вестник «Здоровье и образование в XXI веке» 2008; 10(12): 486–7.
 37. Туманов ВП, Рунова ГС, Туманова ЕЛ. Способ восстановления костных структур челюсти. Патент Российской Федерации, № 2336830; 2008.
 38. Крихели ЗА, Згурский АА, Терехов СМ. Применение аутогенных фибробластов в косметологии. Эстетическая медицина 2004; 3(4): 336–42.
 39. Зорин ВЛ, Зорина АИ, Черкасов ВР, Копнин ПБ, Деев РВ, Исаев АА и др. Качественная и количественная оценка состояния кожи лица после применения аутологичных дермальных фибробластов. Вестник эстетической медицины 2011; 10(2): 16–26.
 40. Зорина АИ, Зорин ВЛ, Черкасов ВР. Дермальные фибробласты: разнообразие фенотипов и физиологических функций, роль в старении кожи. Эстетическая медицина 2012; 11(1): 15–31.
 41. Анджаларидзе ОГ, Доссер ЕМ, Рапопорт РИ, Унанов СС, Дорофеев ВМ, Яблокова МЛ и др. Живая коревая вакцина на диплоидных клетках человека (безопасность, реактивность, иммуногенность). Вопросы вирусологии 1967; (6): 651–7.
 42. ХАВРИКС® (HAVRIX) инструкция по применению. VIDAL Справочник лекарственных средств. Available from: https://www.vidal.ru/drugs/havrix_924.
 43. ФС. 3.3.1.0024.15. Вакцина против краснухи культуральная живая. Государственная фармакопея Российской Федерации, XIII изд. Т. 3. М. 2015. С. 964–72. Available from: <http://www.femb.ru/feml>.
 44. Колокольцова ТД, Шалунова НВ, Петручук ЕМ. К вопросу о контроле безопасности культур клеток, пригодных для заместительной терапии. БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение 2006; (2): 8–12.
 45. Радаева ИФ, Нечаева ЕА, Дроздов ИГ. Коллекция культур клеток ФГУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора. Новосибирск: ЦЭРИС; 2009. С. 251.
 46. Шалунова НВ, Меркулов ВА, Комратов АВ, Петручук ЕМ, Семенова ИС, Волгин АР, Трусов ГА. Требования к клеточным культурам, используемым для производства и контроля качества иммунобиологических лекарственных препаратов. Вedomости Научного центра экспертизы средств медицинского применения 2013; (1): 28–32.
 47. 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.
 48. Хватов ВБ, Конюшко ОИ, Ермолов АС, Смирнов СВ, Жиркова ЕА, Бочарова ВС, Миронова ЛЛ. Способ лечения ожоговой раны. Патент Российской Федерации, № 2373944; 2009.
 49. Грудянов АИ, Ерохин АИ, Бякова СФ. Применение препаратов фирмы «Geistlich» (Bio-Oss, Bio-Gide). Новое в стоматологии 2001; (8): 72–7.
 50. Глинских НП, Устьянцев ИВ, Бахарева АА, Устьянцев ПВ, Бахарева ТЛ. Способ получения препаратов для медицинских целей. Патент Российской Федерации, № 2398873; 2010.
 51. Штукатуров АК, Марковская ОВ, Салистый ПВ. Организация помощи детям с термической травмой в Свердловской области. В кн.: Материалы тезисов III съезда комбустиологов России. М.; 2010; С. 49–51.
 52. Глинских НП, Новикова ИА, Ронь ГИ, Устьянцев ИВ. Композиция для лечения воспалительных заболеваний пародонта на

основе клеточных культур. Патент Российской Федерации, № 2210352; 2003.

53. Глинских НП, Донник ИМ, Порываева АП, Шилова ЕН, Устьянцев ИВ. Использование лиофилизированного препарата аллофибробластов для лечения заболеваний, вызванных вирусом герпеса. *Аграрный вестник Урала* 2012; 7(99): 25–7.
54. ОФС. 1.7.2.0011.15. Требования к клеточным культурам — субстратам производства иммунобиологических лекарств-

венных препаратов. Государственная фармакопея Российской Федерации, XIII изд. Т. 2. М. 2015. С. 672–88. Available from: <http://www.femb.ru/feml>.

55. Колокольцова ТД, Нечаева ЕА, Юрченко НД. Штамм диплоидных клеток человека для заместительной терапии (варианты). Патент Российской Федерации, № 2285040; 2006.
56. Федеральный закон от 23 июня 2016 г. № 180-ФЗ «О биомедицинских клеточных продуктах».

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.

Петручук Елена Мидатовна. Эксперт 1-й категории лаборатории вирусных вакцин Испытательного центра экспертизы качества МИПБ. Шалунова Нина Васильевна. Главный эксперт Управления экспертизы противовирусных МИБП Центра экспертизы и контроля МИБП, д-р мед. наук, проф.

Олефир Юрий Витальевич. Генеральный директор, д-р мед. наук.

Борисевич Игорь Владимирович. Директор Центра планирования и координации НИР, д-р мед. наук, проф.

Перекрест Валентина Васильевна. Ведущий эксперт управления экспертизы противовирусных МИБП Центра экспертизы и контроля МИБП, канд. биол. наук.

Шевцов Владимир Александрович. Начальник управления экспертизы противовирусных МИБП Центра экспертизы и контроля МИБП, канд. мед. наук.

Рукавишников Андрей Владимирович. Заместитель начальника управления экспертизы противовирусных МИБП Центра экспертизы и контроля МИБП, канд. биол. наук.

Хантимирова Лейсан Маратовна. Аналитик управления экспертизы противовирусных МИБП Центра экспертизы и контроля МИБП.

Адрес для переписки: Петручук Елена Мидатовна; Petruchuk@expmed.ru

Cell cultures in replacement therapy

E. M. Petruchuk, N. V. Shalunova, Yu. V. Olefir, I. V. Borisevich, V. V. Perekrest, V. A. Shevtsov, A. V. Rukavishnikov, L. M. Khantimirova

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

Cell replacement therapy is one of the top priority areas of modern medicine, which is aimed at restoring the structure and functions of damaged tissues by transplanting cells grown *in vitro*. The article summarizes data obtained in several studies of diploid cell lines (allogeneic fibroblasts) used as replacement therapy in various therapeutic areas as part of application of medical technology innovations. The article describes benefits of using fibroblasts and the routes of cell culture administration. At present the use of medicinal products containing viable human cells (biomedical cell products) is regulated by Federal Law 180-FZ «On biomedical cell products» of 23 June 2016. Cell cultures used in the production of biomedical cell products should be morphologically homogeneous populations of cells derived from a specific tissue and should have a limited life span, a stable karyotype (at least 75 % of cells should have a double set of chromosomes), should not be associated with cancer risks, be free from extraneous agents, have low levels of histocompatibility antigens expression. According to 180-FZ, all characteristics of a cell line supporting the quality of a biomedical cell product should be reflected in the biomedical cell product specification. Before the adoption of 180-FZ only certified cell cultures could be clinically used. The therapeutic potential of fibroblasts related to optimization of reparative processes, improvement of regenerative and adaptive capabilities, as well as the accumulated experience of their clinical use are stirring interest to the development of fibroblast-based biomedical cell products and their use as replacement therapy. However, it should be pointed out that according to 180-FZ biomedical cell products may not be produced using «biological material obtained by interrupting or jeopardising an embryo/fetus development process».

Key words: cell cultures; diploid cells; autologous fibroblasts; allogeneic fibroblasts; cell transplantation; tissue transplantation; biomedical cell products.

Bibliographic description: Petruchuk EM, Shalunova NV, Olefir YuV, Borisevich IV, Perekrest VV, Shevtsov VA, Rukavishnikov AV, Khantimirova LM. Cell cultures in replacement therapy. *BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment* 2017; 17(4): 197–206.

References

1. Medawar PB. Sheets of pure epidermal epithelium from human skin. *Nature* 1941; (148): 783–4.
2. Medawar PB. The cultivation of adult mammalian skin epithelium *in vitro*. *Quart Microsc Sci.* 1948; 89: 187–96.
3. Maksimov AA. *In vitro* culture of adult mammals conjunctive tissue. *Russkij arhiv anatomii, gistologii i embriologii* 1916; 1(1): 115–82 (in Russian).
4. Rumjantsev AV. *The Great Soviet Encyclopedia* 1975; 22: 391–392 (in Russian).
5. Timofeevskij AD. Long-term tissue cultures and malignancy of cells. *Vestnik Akademii medicinskih nauk SSSR* 1964; 11(3): 205–6 (in Russian).
6. Khlopin NG. *The Great Soviet Encyclopedia* 1986; 26: 556 (in Russian).
7. Hrushhov GK. *The Great Soviet Encyclopedia* 1978; 28: 407 (in Russian).

8. Sanford KK, Earle WR, Likely GD. The growth in vitro of single isolated tissue cells. *J Natl Cancer Inst.* 1948; 9(3): 229–46.
9. Sanford KK, Merwin RM, Hobbs GL, Young JM. Clonal analysis of variant cell lines transformed to malignant cells in tissue culture. *J Natl Cancer Inst.* 1959; 23: 1035–59.
10. Eagle H. Nutrition needs of mammalian cells in tissue culture. *Science* 1955; 122(3168): 501–14.
11. Kolokol'tsova TD, Yurchenko ND, Nechaeva EA, Radaeva IF, Shalunova NV, Petruchuk EM, et al. Obtaining of certified human fibroblasts that are suitable for scientific and medical studies. *Biotechnology in Russia* 2007; (1): 58–64 (in Russian).
12. Bobro LI. Fibroblasts and their significance in tissue reactions. *Arkiv Patologii* 1990; 52(12): 65–8 (in Russian).
13. Goncharova VP. Fibroblast growth factors (a short review). *Fiziologicheskii Zhurnal Imeni I. M. Sechenova* 1994; 9(80): 163–73 (in Russian).
14. Hayflick L, Moorhead PS. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res.* 1961; 25: 585–621.
15. Coulomb B, Saiag P, Bell E, Breitburd F, Lebreton C, Heslan M, Dubertret L. A new method for studying epidermalization in vitro. *Br J Dermatol.* 1986; 114(1): 91–101.
16. Coulomb B, Lebreton C, Dubertret L. Influence of human dermal fibroblasts on epidermalization. *J Invest Dermatol.* 1989; 92(1): 122–5.
17. Tumanov VP, Zhakota DA, Korchagina NS. 30 year experience of development and application of cell technologies in clinical practice. *Plasticheskaja hirurgija i kosmetologija* 2012; (3): 433–49 (in Russian).
18. Olefir YuV, Medunitsyn NV, Avdeeva Zhl, Soldatov AA, Movsesyants AA, Merkulov VA, Bondarev VP. Modern biological/biotechnological medicinal products. Topical issues and prospects for development. *BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment* 2016; 16(2): 67–77 (in Russian).
19. Chaplygin SS. Application of allofibroblasts in the treatment of wound defects in the skin (experimental study). *Cand. Med. Sci. [dissertation]. Samara;* 2013 (in Russian).
20. Keller G, Sebastian J, Lacombe U, Toft K, Lask G, Revazova E. Safety of injectable autologous human fibroblasts. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine* 2000; 130(8): 786–9 (in Russian).
21. Gerlach JC, Johnen C, Ottomann C, Bräutigam K, Plettig J, Belfekroun C, et al. Method for autologous single skin cell isolation for regenerative cell spray transplantation with non-cultured cells. *Int J Artif Organs* 2011; 34(3): 271–9.
22. Savinceva IV, Selezneva II, Gavriluk BK. Collagen type 1 based and chitosan hydrogen is a system of immobilization and directional cell delivery. In: *Stem Cells and Perspectives of Their Use in Health Care: Proc. Conference. Moscow, 2006. P. 19–20* (in Russian).
23. Hrupina AS, Yurkevich YuV, Smolyaninov AB, Trofimova IL, Supilnikova OV, Krylov KV, et al. The use of hydroxyethyl cellulose gel as a carrier for transplantation of cultured allogenic fibroblasts on extensive wound surfaces. *Zdorov'e — osnova chelovecheskogo potentsiala: problemy i puti ih reshenija* 2013; 8(2): 698–700 (in Russian).
24. Adamjan AA, Golovanova PM, Dobysh SV, Kilimchuk LE, Kriger AG, Fronchek EV. Biological composition for the treatment of wounds «Kollahit». *Patent RF, № 2108114;* 1998 (in Russian).
25. Sarkisov DS, Fedorov VD, Glushchenko EV, Alekseev AA, Tumanov VP, Serov GG et al. Use of cultured fibroblasts for restoration of skin in severe burns. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine* 1995; (6): 566–70 (in Russian).
26. Alekseev AA, Sarkisov DS, Jashin AJu, Kashin JuD, Krutikov MG. Skin regeneration of by using cultured allofibroblasts. In: *New medical technologies in the treatment of heavy-burned: Proc. Scientific and practical conference. Moscow, 1997. P. 52* (in Russian).
27. Alekseev AA, Kashin YuD, Jashin AYU, Rahaev AM. The technique of surgical treatment based on the application of cultured allofibroblasts. In: *New methods of treating burns using cultured skin cells: Proc. 11th Int. Symp. Saratov, 1998. P. 9–12* (in Russian).
28. Alejnik DJa, Aminev VA, Charykova IN, Kuvakina NA. The use of modern biotechnologies for the treatment of superficial burns in young children. In: *New methods of treating burns using cultured skin cells: Proc. 11th Int. Symp. Saratov, 1998. P. 6–8* (in Russian).
29. Rashitova AD, Fayazov RR, Muhamedyanov GS, Chistostupov KS. Stem cell technology in the complex treatment of trophic ulcers in severe chronic venous insufficiency. *Kubanskij nauchnyj medicinskij vestnik* 2008; (6): 60–3 (in Russian).
30. Sedov VM, Andreev DYU, Smirnova TD, Paramonov BA, Enkina TN, Sominina AA, et al. Cell therapy in treatment of trophic ulcers of lower extremities. *Vestn Khir Im I I Grek.* 2006; 165(2): 90–4 (in Russian).
31. Vinnik YuS, Salmina AB, Drobushvskaya AI, Teplyakova OV, Pogilenkova EA, Zicova LD. The cell technologies and the tissue engineering are for healing chronic wounds. *Vestnik Eksperimental'noj i Klinicheskoy Hirurgii* 2011; 4(2): 392–7 (in Russian).
32. Pomatilov AA. Treatment of acute and chronic wounds in otorhinolaryngology by the method of transplantation of cultured human allofibroblasts. *Dr. Med. Sci. [dissertation]. Moscow;* 2008 (in Russian).
33. Tumanov VP, Pal'chun VT, Pomatilov AA, Mironov AA. Method for eliminating a traumatic defect of the tympanic membrane. *Patent RF, № 2165765;* 2001 (in Russian).
34. Gundorova RA, Makarov PV, Vasilyev AV, Terskih VV, Hodzhabekeyan GV, Pravilnikova PA, et al. Method for treating corneal erosion. *Patent RF, № 2173122;* 2001 (in Russian).
35. Runova GS. The use of cultured allofibroblasts in the complex treatment of periodontal diseases. *Dr. Med. Sci. [dissertation]. Moscow;* 2000 (in Russian).
36. Kjarimova RR, Lahonina KA, Farkashdi Sh. The use of fibroblasts in dentistry. *Elektronnyj nauchno-obrazovatel'nyj vestnik «Zdorov'e i obrazovanie v XXI veke»* 2008; 10(12): 486–7 (in Russian).
37. Tumanov VP, Runova GS, Tumanova EL. Method of regeneration of the jaw bone structures. *Patent RF, № 2336830;* 2008 (in Russian).
38. Kriheli EA, Zgurskij AA, Terehov SM. Application of autologous fibroblasts in cosmetology. *Esteticheskaja medicina* 2004; 3(4): 336–42 (in Russian).
39. Zorin VL, Zorina AI, Cherkasov VR, Kopnin PB, Deev RV, Isaev AA, et al. Face skin condition quality and quantity estimation after autologous dermal fiberblasts application. *Vestnik Esteticheskoy mediciny* 2011; 10(2): 16–26 (in Russian).
40. Zorina AI, Zorin VL, Cherkasov VR. Dermal fibroblasts: a variety of phenotypes and physiological functions, a role in skin aging. *Esteticheskaja medicina* 2012; 11(1): 15–31 (in Russian).
41. Andzhaparidze OG, Dosser EM, Rapoport RI, Unanov SS, Dorofeev VM, Iablokova ML et al. Live measles vaccine from human diploid cells (safety, reactogenicity and immunogenicity). *Vopr Virusol.* 1967; (6): 651–7 (in Russian).
42. HAVRIX® Instruction for medical use. *VIDAL Medicines Compendium.* Available from: https://www.vidal.ru/drugs/havrix_924 (in Russian).
43. FS. 3.3.1.0024.15. Rubella vaccine live cultural attenuated. *State Pharmacopoeia of the Russian Federation. 13th ed. V. 3. P. 964–72.* Available from: <http://www.femb.ru/feml> (in Russian).
44. Kolokol'tsova TD, Shalunova NV, Petruchuk EM. To the question of controlling the safety of cell cultures suitable for substitution therapy. *BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment* 2006; (2): 8–12 (in Russian).
45. Radaeva IF, Nechaeva EA, Drozdov IG. Collection of cell cultures FGUN GNC VB «Vector» *Rospotrebnadzor. Novosibirsk: TCERIS;* 2009. P. 251 (in Russian).
46. Shalunova NV, Merkulov VA, Comratov AV, Petruchuk EM, Semenova IS, Volgin AR, Trusov GA. Requirements for cell cultures, used for manufacture and quality control of immunobiological medicines. *Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products* 2013; (1): 28–32 (in Russian).
47. Melnikova EV, Merkulova OV, Rachinskaya OA, Chaplenko AA, Merkulov VA, Olefir YuV, et al. Modern approaches to quality control of cell-therapy products. *Biopharmaceutical J.* 2016; 8(4): 35–46 (in Russian).
48. Hvato VB, Konyushko OI, Ermolov AS, Smirnov SV, Zhirkova EA, Bocharova VS, Mironova LL. Treatment of burn wound. *Patent RF, № 2373944;* 2009 (in Russian).
49. Grudjanov AI, Erohin AI, Bjakova SF. Application of preparations of firm «Geistlich» (Bio-Oss, Bio-Gide). *Novoe v stomatologii* 2001; (8): 72–7 (in Russian).
50. Glinskikh NP, Ustyancev IV, Baharev AA, Ustyancev PV, Bahareva TL. Method of obtaining drugs for medical purposes. *Patent RF, № 2398873;* 2010 (in Russian).
51. Shtukaturov AK, Markovskaja OV, Salistij PV. Organization of assistance to children with thermal trauma in the Sverdlovsk region

- In: Proc. IIIth congress of Russia combustiologists. Moscow, 2010. P. 49–51 (in Russian).
52. Glinskikh NP, Novikova IA, Ron' GI, Ustyancev IV. Cell cultures based composition for the treatment of inflammatory periodontal diseases. Patent RF, № 2210352; 2003 (in Russian).
 53. Glinskikh NP, Donnik IM, Poryvayeva AP, Shilova EN, Ustyantsev IV. The use of lyophilized preparation alofibroblasts for treatment of diseases caused by the herpes virus. Agrarnyj vestnik Urala 2012; 7(99): 25–7 (in Russian).
 54. OFS. 1.7.2.0011.15. Requirements for cell cultures — substrates for the production of immunobiological drugs. State Pharmacopoeia of the Russian Federation. 13th ed. V. 2. P. 672–88. Available from: <http://www.femb.ru/feml> (in Russian).
 55. Kolokol'tsova TD, Nechaeva EA, Jurchenko ND. Strain of human diploid cells for replacement therapy (variants). Patent RF, № 2285040; 2006 (in Russian).
 56. The Federal Law of June 23, 2016 № 180-FZ «On Biomedical Cell Products» (in Russian).

Authors

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

Petruchuk EM. 1st professional category expert of the Laboratory of viral vaccines of the Testing Centre for Evaluation of Medicinal Immunobiological Products' Quality.

Shalunova NV. Chief expert of the Division for Expert Evaluation of Antiviral Medicinal Immunobiological Products of the Centre for Evaluation and Control of Medicinal Immunobiological Products. Doctor of Medical Sciences, professor.

Olefir YuV. Director-General. Doctor of Medical Sciences.

Borisevich IV. Director of the Centre for Planning and Coordination of Scientific Activities. Doctor of Medical Sciences, professor.

Perekrest VV. Leading expert of the Division for Expert Evaluation of Antiviral Medicinal Immunobiological Products of the Centre for Evaluation and Control of Medicinal Immunobiological Products. Candidate of Biological Sciences.

Shevtsov VA. Head of the Division for Expert Evaluation of Antiviral Medicinal Immunobiological Products of the Centre for Evaluation and Control of Medicinal Immunobiological Products. Candidate of Medical Sciences.

Rukavishnikov AV. Deputy head of the Division for Expert Evaluation of Antiviral Medicinal Immunobiological Products of the Centre for Evaluation and Control of Medicinal Immunobiological Products. Candidate of Biological Sciences.

Khantimirova LM. Analyst of the Division for Expert Evaluation of Antiviral Medicinal Immunobiological Products of the Centre for Evaluation and Control of Medicinal Immunobiological Products.

Contact e-mail: Petruchuk Elena Midatovna; Petruchuk@expmed.ru