

Применение проточной цитометрии для оценки качества биомедицинских клеточных продуктов

* Г. А. Трусов, А. А. Чапленко, И. С. Семенова, Е. В. Мельникова, Ю. В. Олефир

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

Метод проточной цитометрии — наиболее информативный метод идентификации и количественного определения поверхностных маркеров клеток. Проточная цитометрия дает возможность проводить подсчет клеток, а также характеризацию их типов и подтипов путем мечения клеток моноклональными антителами, конъюгированными с флуорохромом. В настоящее время производителями продуктов на основе клеток человека накоплен значительный опыт применения проточной цитометрии, разработано большое количество методик, подлежащих валидации и включению в спецификацию на клеточный продукт. В обзоре авторами рассмотрен опыт применения метода проточной цитометрии для оценки качества клеточных линий человека, используемых, в частности, для создания препаратов с целью применения в клеточной терапии. Учитывая обязательное наличие клеточного компонента в составе биомедицинских клеточных продуктов (БМКП), метод проточной цитометрии будет являться обязательным при подтверждении подлинности в ходе экспертизы качества БМКП в Российской Федерации.

Ключевые слова: проточная цитометрия; биомедицинские клеточные продукты; мезенхимальные стромальные клетки; поверхностные маркеры; клеточная терапия

Для цитирования: 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. DOI: 10.30895/2221-996X-2018-18-1-16-24

* **Контактное лицо:** Трусов Георгий Александрович; trusov@expmed.ru

Use of Flow Cytometry for Quality Evaluation of Biomedical Cell Products

* G. A. Trusov, A. A. Chaplenko, I. S. Semenova, E. V. Melnikova, Yu. V. Olefir

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

Flow cytometry is the most common method of identification and quantitation of cell surface markers. Flow cytometry can be used for cell counting and characterization of cell types and subtypes by labeling cells with fluorochrome-conjugated monoclonal antibodies. Manufacturers of human cell-based medicinal products have accumulated significant experience in flow cytometry and developed a large number of procedures that can be validated and included into cell products specifications. The present review summarises the experience gained with the use of flow cytometry for characterization of human cell lines used to develop cell therapy products. Since all biomedical cell products (BMCPs) have a cellular component, it will be necessary to use the flow cytometry method for identification testing of BMCPs during evaluation of their quality.

Key words: flow cytometry; biomedical cell products; mesenchymal stromal cells; surface markers; cell therapy

For citation: Trusov GA, Chaplenko AA, Semenova IS, Melnikova EV, Olefir YuV. Use of Flow Cytometry for Quality Evaluation of Biomedical Cell Products. *BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment* 2018; 18(1): 16–24. DOI: 10.30895/2221-996X-2018-18-1-16-24

* **Contact person:** Trusov Georgy Aleksandrovich; trusov@expmed.ru

В настоящее время метод проточной цитометрии описан в ведущих мировых фармаколеях для количественной и качественной оценки популяций клеток как в биологических образцах пациентов, так и в клеточных продуктах [1, 2]. В Европейском союзе и США при определении показателей качества и составлении спецификаций препаратов для клеточной терапии метод проточной цитометрии используется для определения иммунофенотипического профиля, характеризующего чистоту, подлинность и эффективность клеточного продукта [3, 4]. Под эффективностью препарата понимается количественная мера биологической активности на основе характеристик продукта, которые связаны с соответствующими биологическими свойствами. Анализ, демонстрирующий биологическую активность, должен основываться на предполагаемом биологическом эффекте, который в идеале должен быть связан с клиническим ответом на применение продукта [5].

Основные клеточные характеристики (жизнеспособность, принадлежность к той или иной популяции, степень дифференцировки и др.), непосредственно влияющие на качество как конечных, так и промежуточных продуктов, могут быть определены с помощью технологии проточной цитометрии [6].

Проточная цитометрия применяется для определения подлинности клеточного компонента. Результаты теста могут быть получены в течение нескольких часов. Методика может быть валидирована при использовании набора антител, взаимодействующих с определенными эпитопами на клеточной поверхности. Оценка подлинности проводится определением иммунофенотипа, идентичность которого должна быть более 80 %. На сегодняшний день использование проточной цитометрии считается обязательным, но недостаточным для доказательства подлинности препарата, применяемого для клеточной терапии [3, 7, 8].

В связи с принятием в июне 2016 г. Федерального закона № 180-ФЗ «О биомедицинских клеточных продуктах» все вновь разрабатываемые продукты, содержащие клеточные линии человека, должны быть стандартизованы. Одним из ключевых методов оценки показателей качества биомедицинских клеточных продуктов (БМКП), безусловно, будет являться метод проточной цитометрии [9]. Цель работы — оценить наработанный отечественными и зарубежными учеными опыт стандартизации клеточных линий с использованием метода проточной цитометрии, возможные проблемы при его использовании и подходы к их решению.

Основные характеристики метода

Метод проточной цитометрии — метод идентификации и количественного определения поверхностных маркеров клеток. При выполнении исследования образцы клеток окрашивают флуоресцирующими моноклональными антителами и затем подвергают анализу как однородную клеточную суспензию при помощи лазера. С помощью проточной цитометрии определяют также такие параметры, как морфологические характеристики клеток и клеточно-подобных структур, клеточные пигменты, содержание ДНК, содержание РНК, белки, внутриклеточные маркеры, pH и др. Особенностью проточной цитометрии является автоматическая количественная оценка заданных параметров для большого числа отдельных клеток в процессе каждого анализа [7].

Проточная цитометрия является подходящим методом для идентификации, характеристики и выделения стволовых клеток и клетко-предшественников для исследований и потенциального клинического применения [10]. Особенность метода проточной цитометрии заключается в том, что с ее помощью

можно быстро выполнять количественные измерения на отдельных клетках в их гетерогенной популяции. Идентификация и количественное определение отдельных клеточных подмножеств сопровождается мультипараметрическим анализом: обычно определяют размер и неоднородность (измеренные прямым и боковым светорассеянием), а также используют маркеры подлинности (измерение флуоресценции). Одновременное количественное определение жизнеспособности клеток может проводиться с использованием 7-амино-актиномицина D (7-AAD). Многомерный проточно-цитометрический анализ позволяет выявить aberrантные популяции клеток костного мозга, лимфоидной ткани и периферической крови пациентов с лейкемией и лимфомой. Современные функциональные анализы позволяют непосредственно изучать состояние активности клеток путем измерения внутриклеточной продукции/секреции цитокинов или хемокинов [10].

Проточная цитометрия позволяет проводить анализ подтипов лейкоцитов путем мечения клеток моноклональными антителами, конъюгированными с флуорохромом. Экспрессия CD34 класса III обычно используется для характеристики гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) в периферической и пуповинной крови, костном мозге и очищенных препаратах ГСК из перечисленных источников. Сочетание реагентов анти-CD45, анти-CD34 и красителя для определения жизнеспособности, например, 7-AAD широко используется в клинической практике. Эти анализы позволяют определять соответствующее количество и тип требуемых клеточных популяций, а также обнаруживать нежелательные клетки, такие как остаточные плюрипотентные клетки, которые у реципиента могут оказать ся опухоленными.

Преимуществами метода проточной цитометрии являются:

- возможность одновременного измерения нескольких параметров для каждой клетки;
- достаточно высокая скорость проведения анализа;
- выделение популяций клеток (определение как поверхностного фенотипа, так и внутриклеточных маркеров) и возможность их сортировки;
- определение абсолютного и относительного содержания клеток в образце;
- оценка состояния ДНК, исследование стадий клеточного цикла, степени пролиферативной активности;
- одновременное изучение нескольких антигенных структур на одной клетке (коэкспрессия);
- способность обнаружить и охарактеризовать редкие события и малочисленные клеточные популяции.

Среди основных недостатков метода проточной цитометрии следует отметить:

- необходимость использования суспензии из отдельных клеток для проведения анализа и разрушения структуры ткани;
- достаточно высокая стоимость оборудования и реагентов;
- высокие требования к квалификации персонала и др.

Сложности возникают также с разработкой и производством стандартов как клеточных популяций, так и антител, меченных флуорохромами.

Определение экспрессии различных поверхностных маркеров стволовых клеток для классификации клеточного типа может быть затруднено вследствие артефактов в гетерогенной клеточной популяции. Применение рекомендуемых маркеров для иммунофенотипирования часто не является достаточным в гетерогенных клеточных смесях, таких как обработанный липоаспират.

Кроме того, в нашей стране в настоящее время отсутствуют производство стандартов для цитофлуориметрии и междуна-

родная гармонизированная система, согласно которой данные стандарты должны производиться.

Субъективность ручной работы вносит корректировку в данные и в значительной степени влияет на воспроизводимость, надежность и сопоставимость результатов анализа методом проточной цитометрии [11].

В частности, при появлении в результатах исследования редких случаев, как правило, невозможно отличить фрагменты нежизнеспособных клеток («клеточный дебрис») от редкой уникальной субпопуляции клеток. Обычно такие результаты исключаются из анализа данных. Однако эти «артефакты» могут представлять собой модифицированные типы клеток, присутствие которых нежелательно в готовом клеточном продукте. Технологические достижения в настоящее время позволяют проводить быструю и многомерную количественную оценку миллионов отдельных клеток для определения клеточных субпопуляций, а также оценку клеточной разнородности [12]. Например, была создана платформа OpenCyto (<http://www.opencyto.org>) и разработаны методы автоматизированного гейтирования для анализа, создающего сотни значений фенотипов популяции клеток.

Автоматизированное гейтирование — это логическое ограничение, используемое для селекции событий при анализе по нескольким коррелирующим параметрам [13]. OpenCyto выполняет предварительную обработку, идентификацию популяции клеток, сопоставление популяции и корреляцию полученных результатов [10]. Эта платформа обеспечивает исследователя набором инструментов, которые хорошо подходят для гейтирования лимфоцитов, переходных В-клеток, синглетов, бимодальных, мультимодальных или редких популяций клеток. Таким образом, подходы к минимизации ошибок при цитометрическом иммунофенотипировании должны включать в себя:

- определение стандартных панелей антител для иммунофенотипирования;
- использование предварительно лиофилизированных реагентов;
- автоматизация сбора данных на основе выборочных данных;
- подготовка образцов к окрашиванию *in situ*;
- использование калибровочных частиц для настройки прибора;
- центральный анализ одним или несколькими согласованными экспертами;
- использование автоматических алгоритмов гейтирования.

Учитывая обязательное наличие клеточного компонента в составе БМКП, метод проточной цитометрии будет являться обязательным при подтверждении подлинности в ходе экспертизы качества БМКП в Российской Федерации.

Необходимое условие для исследования клеточной линии методом проточной цитометрии — использование суспензии клеток, так как измерение проводится в токе жидкости. Таким образом, исследование подлинности БМКП, которые представляют собой суспензии клеток, методом проточной цитометрии не составит трудностей, однако пробоподготовка (получение суспензии клеток) при наличии в составе БМКП 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 (например, от коллагена) является необходимой процедурой перед проведением анализа [14].

Для проведения экспертизы качества в рамках государственной регистрации БМКП в соответствии с п. 17 Приложения к Приказу Министерства здравоохранения Российской

Федерации от 31 января 2017 г. № 30н «Об утверждении Правил проведения биомедицинской экспертизы биомедицинских клеточных продуктов и форм заключений комиссии экспертов федерального государственного бюджетного учреждения по проведению биомедицинской экспертизы биомедицинских клеточных продуктов» заявитель представляет в экспертное учреждение, помимо образцов БМКП, клеточную линию (клеточные линии), входящую(ие) в состав БМКП, а в спецификации на БМКП должны содержаться сведения об идентичности (подлинности), в том числе в части экспрессии специфических поверхностных маркеров клеточной линии (иммунофенотип) и допустимое количественное содержание клеток до нанесения на носитель, определяемые методом проточной цитометрии.

Опыт применения проточной цитометрии для характеристики клеточных линий человека

Рассмотрим опыт применения метода проточной цитометрии при характеристике клеточных линий человека, используемых, в частности, для создания препаратов в клеточной терапии.

Прогресс в области изучения регенеративного потенциала стволовых клеток обуславливает их широкое использование в клинических исследованиях. На сегодняшний день клинические исследования в соответствии с данными «Реестра клинических исследований федеральных и частных фармацевтических компаний» (Clinical Trials registry and database, www.ClinicalTrials.gov) проводятся с препаратами на основе стволовых клеток для лечения рака, повреждений мышц, аутоиммунных заболеваний, травм спинного мозга и ряда других нарушений, для которых в настоящее время нет эффективной медикаментозной терапии или основные механизмы заболевания еще не выяснены.

В целях стандартизации мезенхимальных стромальных клеток (МСК), изолированных из различных тканей и культивируемых в различных условиях, Международным обществом по клеточной терапии (Mesenchymal and Tissue Stem Cell Committee of the International Society for Cellular Therapy) были определены следующие минимальные критерии идентификации: адгезия к пластику при соблюдении стандартных условий при культивировании; способность к дифференцировке в остеобласты, адипоциты, хондроциты в условиях *in vitro*; позитивное окрашивание по поверхностным антигенам CD105/CD90/CD73 и негативное по CD34/CD45/CD11b, или CD14/CD19, или CD79α/HLA-DR1 [15].

Если эти критерии не выполняются полностью, то термин «мезенхимальные стромальные клетки» должен использоваться для клеток, полученных из костного мозга, или следует использовать другие термины для МСК-подобных клеток различного происхождения [16].

После публикации минимальных критериев в 2006 г. некоторые исследователи отмечали, что с учетом новых идентифицированных маркеров следует пересмотреть минимальные критерии для определения человеческих МСК, а также для тканеспецифичных вариаций фенотипа этих клеток [17]. Хотя функциональное определение МСК вряд ли изменится, фенотипическое определение, по-видимому, меняется в зависимости от вида и источника ткани. Вероятно, появятся новые ткане- и видоспецифичные маркеры МСК.

При изучении свойств МСК было обнаружено большое количество поверхностных кластеров дифференцировки, экспрессируемых клетками, примеры которых представлены в таблице 1 [18].

Таблица 1. Кластеры дифференцировки, наиболее часто используемые в качестве маркеров стволовых клеток

Название	Расположение	Основные функции
CD44	СК: эмбриональные, мезенхимальные, гематопозитические. Клетки злокачественных опухолей (изоформы CD44 S и V)	Рецептор гиалуроновой кислоты
CD105 (эндоглин)	Фибробласты, гладкомышечные и мезенхимальные СК	Трансмембранный белок, составная часть рецептора к трансформирующему фактору роста бета, стимуляция ангиогенеза
CD90 (Thy-1)	Гематопозитические, мезенхимальные, нейрональные СК	Стимуляция нейрогенеза
CD73 (NT5E)	СК всех типов, лимфоциты и лимфобласты	5'-рибонуклеотидфосфогидролаза
CD13 (аланинаминопептидаза)	Клетки микроворсинок тонкого кишечника и почек. СК жировой ткани и эндометрия	Является экзопептидазой и высвобождает N-концевую аминокислоту из пептида (предпочтительно аланин)
CD10 (неприлизин)	Гематопозитические СК — предшественницы Т-, В-лимфоцитов и натуральных киллеров. Клетки лимфом различного генеза	Нейтральная эндопептидаза, участвует в деградации натрийуретического пептида, а также брадикинина

Считается, что загрязнение культур МСК фибробластами может привести к снижению потенциала дифференцировки стволовых клеток [19]. Согласно данным научной литературы МСК и фибробласты имеют общие свойства, однако определение, предложенное Международным обществом по клеточной терапии, не позволяет различить МСК и фибробласты [20]. Результаты исследований показывают, что использование CD10, CD26, CD106, CD146 и ITGA11 может быть полезно для идентификации МСК костного мозга и их отделения от человеческих дермальных фибробластов [21]. Такие поверхностные маркеры могут использоваться для контроля качества культур МСК после культивирования, криоконсервации, трансфекции генов и других манипуляций.

МСК обладают способностью к дифференцировке в различных направлениях. Например, хондрогенная дифференцировка возможна у клеток, положительных по CD90 и отрицательных по CD45 [22]. По мнению Y. Sakaguchi и соавт. (2005 г.), синовиальные МСК в сравнении с клетками, выделенными из костного мозга и надкостницы, характеризуются большей способностью к хондрогенной дифференцировке [22]. Несмотря на то что МСК жировой ткани обладают меньшим хондрогенным потенциалом в сравнении с МСК, выделенными из других источников, они легко могут быть получены в количестве,

необходимом для последующей трансплантации [23]. Необходимо отметить, что МСК из костного мозга и надкостницы обладают выраженным остеогенным потенциалом и способны к спонтанной дифференцировке в данном направлении, что может быть использовано при лечении дефектов костной ткани [22].

В настоящее время нельзя заключить, что МСК, расположенные в разных тканях, имеют сходства (общие черты) или идентичны [24]. Например, МСК жировой ткани экспрессируют маркер CD34 [25], тогда как МСК костного мозга данный маркер не экспрессируют. CD271 экспрессируется в синовиальной жидкости [26, 27]. МСК костного мозга экспрессируют W8-B2/MSCA-1 в отличие от МСК, полученных из плаценты [28]. Это, вероятно, может способствовать производству терапевтических продуктов на основе МСК с значительно улучшенным качеством и предсказуемым биологическим поведением. Кроме того, дальнейшее изучение функций МСК костного мозга при заболеваниях, связанных с физиологией кости и развитием клеток крови, включая остеопороз и лейкоз, приведет к пониманию роли МСК в развитии этих заболеваний и открывает перспективы развития их терапии в дальнейшем. Различия в иммунофенотипе МСК, выделенных из разных источников, представлены в таблице 2.

Таблица 2. Иммунофенотип МСК в зависимости от источника выделения

Источник МСК	(+) маркеры	(-) маркеры	Источник литературы
Пуповинная кровь	CD10, CD13, CD29-integrin b1, CD49b-integrin a2, CD49c-integrin a4, CD49d-integrin a3, CD49e, CD51, CD73 (SH3), CD90 (Thy-1), CD105 (SH2), CD146, CD166 (ALCAM)	CD14, CD31 (PECAM), CD33, CD34, CD45, CD38, CD56, CD123 (IL-3 receptor), CD133, CD235a	[29]
Жировая ткань	CD9, CD10, CD13, CD29, CD44, CD49d, CD49e, CD54, CD55, CD59, CD73, CD90, CD105, CD106, CD146, CD166, HLA I, фибронектин, эндомуцин, виментин, коллаген 1-го типа	CD11b, CD14, CD19, CD31, CD34, CD45, CD79a, CD80, CD117, CD133, CD144, HLA-DR, c-kit, MyD88, STRO-1, Lin, HLA II	[30]
Эндометрий	CD13, CD29, CD44, CD73, CD90, CD105	CD34, HLA-DR	[31]
Пульпа	CD29, CD90, CD10, CD54, CD56, CD166	CD14, CD34, CD45	[32]
Костный мозг	CD13, CD44, CD73, CD90, CD105	CD31, CD34, CD45, CD117	[24]

С использованием проточной цитометрии показана высокая экспрессия CD44 в сперматогониальных стволовых клетках (SSC, Spermatogonial stem cells), стволовых клетках волосяного фолликула (HFSC, Hair follicle stem cell), гранулезных клетках (GC, Granulosa cells) и МСК вартониева студня (WJ-MSC, Warton's Jelly-derived mesenchymal stromal cells), что способствует поддержанию свойства мультипотентности. Кроме того, высокая экспрессия CD105 в SSC, HFSC и WJ-МСК выявляет остеогенный потенциал этих клеток. Высокая экспрессия CD90 в SSC и HFSC может ассоциироваться с более высоким потенциалом роста и дифференцировки этих клеток. Таким образом, клеточная терапия, основанная на применении четырех типов МСК, может использоваться в клинической практике [33].

По данным авторов [32], которыми проведена оценка влияния состава питательных сред для культивирования МСК на их рост и иммунофенотипические характеристики, установлено, что наличие или отсутствие сывороток животного происхождения в среде культивирования не влияет на содержание поверхностных маркеров, характерных для МСК.

С начала 2000-х годов проводятся активные исследования возможностей применения различных типов стволовых клеток в терапии ишемической болезни сердца [34, 35]. Например, имеются сообщения о результатах проведенных клинических исследований, свидетельствующие о том, что CD133⁺ ГСК после трансплантации улучшают функцию левого желудочка [36].

Некоторые исследователи считают более перспективным использование стволовых клеток сердца (СКС), которые считаются эндогенными предшественниками кардиомиоцитов (КМЦ). Эти клетки идентифицируют по наличию различных маркеров клеточной поверхности, таких как c-kit, MDR, NKX2.5, CD195 и Sca-1 [37–39]. Например, было показано, что Sca-1⁺-клетки, выделенные из сердца взрослого организма, могут быть дифференцированы в сокращающиеся кардиомиоциты при культивировании в специфических условиях [37, 40]. По результатам Wang и соавт. [41], трансплантация Sca-1⁺/CD31⁺ популяции СКС в условиях моделирования инфаркта миокарда на мышах приводила к улучшению функции левого желудочка благодаря стимуляции процесса ангиогенеза. В работе [42] было показано, что трансплантация c-kit⁺-положительных клеток улучшала функции левого желудочка. При анализе Zaruba и соавт. [43] кардиомиогенного потенциала c-kit⁺ СКС, выделенных из нормального неонатального, нормального взрослого и инфарктного взрослого сердца мыши, было продемонстрировано, что только c-kit⁺/CD45⁻ субпопуляция клеток, выделенных из неонатального сердца, демонстрировала выраженную кардиомиогенную активность.

Метод проточной цитометрии широко используется и для характеристики клеточных линий, находящихся в мировых коллекциях. Так, в Американской коллекции типовых культур (ATCC, American Type Culture Collection) в настоящее время представлены три клеточные линии мезенхимальных стволовых клеток: из жировой ткани (ATCC[®] PCS500011[™]); из костного мозга (ATCC[®] PCS-500-012[™]); из пуповинной крови (ATCC[®] PCS-500-010[™]). Для идентификации линии мезенхимальных стволовых клеток жировой ткани используются следующие поверхностные маркеры: CD29⁺, CD44⁺, CD73⁺, CD90⁺, CD105⁺, CD166⁺, CD14⁻, CD31⁻, CD34⁻, CD45⁻; для идентификации линии мезенхимальных стволовых клеток из костного мозга: CD29⁺, CD44⁺, CD73⁺, CD90⁺, CD105⁺, CD166⁺, CD14⁻, CD34⁻, CD19⁻, CD45⁻ [44].

Метод проточной цитометрии также позволяет проводить сортировку стволовых клеток. Например, выделенные стволовые клетки эпидермиса, использование которых перспективно

в терапии витилиго, буллезного эпидермолиза, реконструкции уретры, обладают следующим иммунофенотипом: высокое содержание интегрин-β1, сочетание высокого содержания интегрин-α6 с низким содержанием трансферрина (α6^{high}/CD71^{low}) [45]. К другим недавно выявленным маркерам поверхности стволовых клеток эпидермиса относятся лиганд Нотча, дельтаподобные 1 (DLL1, Delta-like ligands 1) [40] и иммуноглобулин-подобные домены 1 (LRIG1) [46] и CD46 [47].

Метод проточной цитометрии для оценки качества препаратов клеточной терапии

Препарат на основе аллогенных мезенхимальных стволовых клеток костного мозга Prochymal[®] («Osiris», США) был разрешен к медицинскому применению в Канаде и Новой Зеландии в 2012 г. для лечения реакции «трансплантат против хозяина». После продажи технологии компанией-разработчиком препарат был переименован в TEMCELL[®] и клинически исследуется к применению в Австралии и Японии для лечения лучевых поражений, хронической обструктивной болезни легких, болезни Крона и др. Ключевыми характеристиками качества препарата являются:

- внешний вид — клетки от белого до светло-желтого цвета;
- жизнеспособность ≥ 70 %;
- подлинность (поверхностные маркеры):
положительные — CD105 (Эндоглин), CD166 (молекула клеточной адгезии активированных лейкоцитов);
отрицательные — CD45 (общий лейкоцитарный антиген);
- эффективность:
экспрессия рецептора I типа фактора некроза опухоли (TNF RI) ≥ 108 пг/мл;
экспрессия ингибитора α рецептора интерлейкина-2 (IL-2Rα) ≥ 30 % ингибирование.

Для оценки чистоты препарата (присутствие жизнеспособных клеточных популяций, отличных от целевой) возможна идентификация клеток, положительных по CD45 или, например, CD45⁻/CD105⁻/CD166⁺ в количестве не более 5 % [48].

Хондрогенная дифференцировка МСК открывает перспективы клинического применения клеток с целью восстановления хрящевой ткани, прежде всего суставных хрящей. В настоящее время для восстановления поврежденной хрящевой поверхности используются следующие технологии: ауто трансплантация хондроцитов (ACI, Autological chondrocyte implantation), матрикс-индуцированная имплантация хондроцитов (MACI, Matrix associated chondrocyte implantation), имплантация клеточной культуры мезенхимальных стволовых клеток, в том числе в сочетании с технологиями генной модификации клеток [49–52].

Для определения фенотипической стабильности хондроцитов, применяемых в лечении хрящевых дефектов, Лютен и соавт. [53] предложили ряд маркеров, которые могут достоверно использоваться для прогнозирования потенциала образования хряща:

- позитивный маркер FRZB (Frizzled-подобный белок 1);
- негативный маркер ALK1 (рецептор активина α, тип II-подобная киназа);
- один или более маркеров, выбранных из группы, состоящей из негативного маркера PEDF (Pigment epithelium-derived factor; фактор, выделенный из пигментного эпителия), позитивного маркера COL11 (коллаген, тип XI A1), позитивного маркера COL2 (коллаген, тип II, альфа 1) и позитивного маркера FGFR3 (Fibroblast growth factor; рецептор фактора роста фибробластов 3), OPN (остеопонтин), BMP-2 (костный морфогенетический белок 2) и RASF-PLA (фосфолипаза A2).

В России с 2010 г. применяется технология, разработанная Институтом стволовых клеток человека (ПАО «ИСКЧ», Москва, Россия), которая основана на использовании дермальных аутологичных фибробластов для коррекции возрастных изменений кожи (SPRS-терапия, Service for personal regeneration of skin) [54]. Иммунофенотипический профиль фибробластов кожи в норме соответствует профилю клеток мезенхимного ряда. Фибробласты имеют высокий уровень экспрессии виментина, молекул адгезии (CD44, CD49b, CD54, CD90, CD105), не экспрессируют маркеры прогениторных, гемопоэтических (CD34, CD45, CD133, CD117, HLA-DR, нестин) и эндотелиальных (фактор фон Виллебранда, CD106) клеток [55].

При стандартизации аутологичных фибробластов определение иммунофенотипа получаемых клеток авторы выполняли с помощью проточной цитометрии и флуоресцентной микроскопии. С помощью иммунофенотипического анализа культур дермальных аутофибробластов, предназначенных для клинического применения, можно определить:

- высокий уровень экспрессии коллагенов (I, III типов), эластана и виментина;
- наличие маркеров (CD73+, CD90+ и CD105+), подтверждающих мезенхимное происхождение применяемых клеток;
- отсутствие гемопоэтических (CD34-, CD45-) и эпителиальных (цитокератины 14, 15, 16, 19) маркеров [56].

Метод проточной цитометрии также рекомендован Европейским медицинским агентством (EMA, European Medicines Agency) для определения потенциала (эффektivности) дендритных клеток (ДК) при изготовлении дендритно-клеточных вакцин [57]. Рабочая группа EMA по препаратам передовой терапии выдвинула ряд требований к потенциалу ДК (табл. 3) [58].

Метод проточной цитометрии применяется не только для характеристики готового продукта, но также в процессе разработки и производства, например как один из способов получения незрелых ДК из моноцитов периферической крови человека, как описано в работе Ж.К. Назаркиной и соавт. [59].

Заключение

Актуальность применения метода проточной цитометрии в Российской Федерации для характеристики клеточных линий, входящих в состав БМКП, прежде всего диктуется требованиями к спецификации на БМКП, определенными приказом Минздрава России от 19.01.2017 № 14н «Об утверждении формы спецификации на биомедицинский клеточный продукт». В настоящее время производителями медицинских продуктов, полученных на основе клеток человека, накоплен значительный опыт применения метода проточной цитометрии, который позволяет получить интегральные данные о количестве клеток,

Таблица 3. Требования к дендритным клеткам, используемым при изготовлении дендритно-клеточных вакцин

Показатель	Метод	Критерии приемлемости
Жизнеспособность	Окраска трипановым синим	> 80 %
Иммунофенотип (основные поверхностные маркеры)	Проточная цитометрия	CD11c ⁺ /MHC-II ⁺ > 95 % CD80 ⁺ > 60 %
Иммунофенотип (дополнительные поверхностные маркеры)	Проточная цитометрия	CD54, CD69, CD83 и др.

совокупности маркеров на их поверхности и косвенно — об их состоянии и биологической активности. Учитывая колоссальный объем получаемой информации, который сочетается с экспрессностью и стоимостью анализа, проточная цитометрия является одним из ключевых методов определения основных характеристик клеточных линий человека. Однако разработчик БМКП должен обосновать выбор панели маркеров иммунофенотипирования, позволяющей однозначно идентифицировать используемую целевую популяцию клеток или выявить нежелательные популяции, влияющие на безопасность конечного продукта. Данная задача осложняется тем фактом, что число известных видов поверхностных маркеров постоянно увеличивается, а профиль их экспрессии изменяется в зависимости от стадии дифференцировки и микроокружения клеток.

Информация об отсутствии конфликта интересов.

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

Литература / References

1. *United States Pharmacopeia: United States Pharmacopeial Convention. 37th ed.*
2. *European Pharmacopoeia: EDQM. 8th ed. Available from: <http://online.edqm.eu/entry.htm>*
3. *Carmen J, Burger SR, McCaman M, Rowley JA. Developing Assays to address Identity, Potency, Purity and Safety: Cell Characterization in Cell Therapy Process Development. Regen Med. 2012; 7(1): 85–100.*
4. *Commission Directive 2009/120/EC of 14 September 2009 Amending Directive 2001/83/EC of the European Parliament and of the Council on the Community Code Relating to Medicinal Products for Human Use as Regards Advanced Therapy Medicinal Products. Available from: https://ec.europa.eu/health/sites/health/files/files/eudralex/vol-1/dir_2009_120/dir_2009_120_en.pdf*
5. *ICH Q6B Note for Guidance on Specifications: Test Procedures and Acceptance Criteria for Biotechnological/Biological Products (CPMP/ICH/365/96). Available from: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500002824.pdf*
6. *Guideline on Human Cell-based Medicinal Products (EMA/CHMP/410869/2006). Available from: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500003894.pdf*
7. *Bravery CA, Carmen J, Fong T, Oprea W, Hoogendoorn KH, Woda J, et al. Potency Assay Development for Cellular Therapy Products: an ISCT Review of the Requirements and Experiences in the Industry. Cytotherapy 2013; 15(1): 9–19.*
8. *SME Workshop on CMC of Biological Medicinal Products. EMA London 14–16.04.2015. CMC ISSUES for Cell Based ATMP. Available from: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Presentation/2015/05/WC500187353.pdf*
9. *Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации от 19.01.2017 № 14н «Об утверждении формы спецификации на биомедицинский клеточный продукт». [Order of Ministry of Health of the Russian Federation No. 14n of January 19, 2017 (In Russ.)]*
10. *Donnenberg VS, Ulrich H, Tárnok A. Cytometry in Stem Cell Research and Therapy. Cytometry A. 2013; 83(1): 1–4.*
11. *Aghaeepour N, Finak G, Hoos H, Mosmann TR, Brinkman R, et al. Critical Assessment of Automated Flow Cytometry Data Analysis Techniques. Nat Methods 2013; 10: 228–38.*
12. *Maecker HT, McCoy JP, Nussenblatt R. Standardizing Immunophenotyping for the Human Immunology Project. Nat Rev Immunol. 2012; 12(3): 191–200.*
13. *O'Neill K, Aghaeepour N, Spidlen J, Brinkman R. Flow Cytometry Bioinformatics. PLoS Comput Biol. 2013; 9(12): e1003365.*

14. Papadimitropoulos A, Piccinini E, Brachat S, Braccini A, Wendt D, Barbero A, et al. Expansion of Human Mesenchymal Stromal Cells from Fresh Bone Marrow in a 3D Scaffold-Based System under Direct Perfusion. *PLoS One* 2014; 9(7): e102359.
15. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, et al. Minimal Criteria for Defining Multipotent Mesenchymal Stromal Cells. *The International Society for Cellular Therapy Position Statement. Cytotherapy* 2006; 8(4): 315–7.
16. Choi YH, Kurtz A, Stamm C. Mesenchymal Stem Cells for Cardiac Cell Therapy. *Hum Gene Ther.* 2011; 22(1): 3–17.
17. Schachtele S, Clouser C, Aho J. Markers and Methods to Verify Mesenchymal Stem Cell Identity, Potency, and Quality. WHITE PAPER, R&D Systems, Inc. Available from: <https://resources.rndsystems.com/images/site/wp-msc-13763.pdf>
18. Шахпазян НК, Астрелина ТА, Яковлева МВ. Мезенхимальные стволовые клетки из различных тканей человека: биологические свойства, оценка качества и безопасности для клинического применения. *Клеточная трансплантология и тканевая инженерия* 2012; 7(1): 23–33. [Shachpazyan NR, Astrelina TA, Yakovleva MV. Mesenchymal Stem Cells from Various Human Tissues: Biological Properties, Assessment of Quality and Safety for Clinical Use. *Cellular Transplantation and Tissue Engineering* 2012; 7(1): 23–33 (In Russ.)]
19. Prockop DJ, Olson SD. Clinical Trials with Adult Stem/Progenitor Cells for Tissue Repair: Let's not Overlook Some Essential Precautions. *Blood* 2007; 109(8): 3147–51.
20. Haniffa MA, Collin MP, Buckley CD, Dazzi F. Mesenchymal Stem Cells: The Fibroblasts' New Clothes? *Haematologica* 2009; 94(2): 258–63.
21. Kundrotas G. Surface Markers Distinguishing Mesenchymal Stem Cells from Fibroblasts. *Acta Medica Lituanica* 2012; 19(2): 75–9.
22. Sakaguchi Y, Sekiya I, Yagishita K, Muneta T. Comparison of Human Stem Cells Derived from Various Mesenchymal Tissues: Superiority of Synovium as a Cell Source. *Arthritis Rheum.* 2005; 52(8): 2521–9.
23. Li Q, Tang J, Wang R, Bei C, Xin L, Zeng Y, Tang X. Comparing the Chondrogenic Potential in Vivo of Autogeneic Mesenchymal Stem Cells Derived from Different Tissues. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol.* 2011; 39(1): 31–8.
24. Boxall SA, Jones E. Markers for Characterization of Bone Marrow Multipotential Stromal Cells. *Stem Cells International* 2012; 2012. Available from: <https://www.hindawi.com/journals/sci/2012/975871/cta/>
25. Quirici N, Scavullo C, de Girolamo L, Lopa S, Arrigoni E, Dellilieri GL, Brini AT. Anti-L-NGFR and -CD34 Monoclonal Antibodies Identify Multipotent Mesenchymal Stem Cells in Human Adipose Tissue. *Stem Cells Dev.* 2010; 19(6): 915–25.
26. Arufe MC, De La Fuente A, Fuentes I, de Toro FJ, Blanco FJ. Chondrogenic Potential of Subpopulations of Cells Expressing Mesenchymal Stem Cell Markers Derived from Human Synovial Membranes. *J Cell Biochem.* 2010; 111(4): 834–45.
27. Kurth TB, Dell'Accio F, Crouch V, Augello A, Sharpe PT, De Bari C. Functional Mesenchymal Stem Cell Niches in Adult Mouse Knee Joint Synovium in Vivo. *Arthritis Rheum.* 2011; 63(5): 1289–1300.
28. Mikami Y, Ishii Y, Watanabe N, Shirakawa T, Suzuki S, Irie S, et al. CD271/p75NTR Inhibits the Differentiation of Mesenchymal Stem Cells into Osteogenic, Adipogenic, Chondrogenic, and Myogenic Lineages. *Stem Cells Dev.* 2011; 20(5): 901–13.
29. Moretti P, Hatlapatka T, Marten D, Lavrentieva A, Majore I, Hass R, Kasper C. Mesenchymal Stromal Cells Derived from Human Umbilical Cord Tissues: Primitive Cells with Potential for Clinical And Tissue Engineering Applications. *Adv Biochem Eng Biotechnol.* 2010; 123: 29–54.
30. Schäffler A, Büchler C. Concise Review: Adipose Tissue-Derived Stromal Cells — Basic and Clinical Implications for Novel Cell-Based Therapies. *Stem Cells* 2007; 25(4): 818–27.
31. Домнина АП, Фридлянская ИИ, Земелько ВИ, Пуговкина НА, Ковалева ЗВ, Зенин ВВ и др. Мезенхимальные стволовые клетки эндометрия человека при длительном культивировании не подвергаются спонтанной трансформации. *Цитология* 2013; 55(1): 69–74. [Domnina AP, Fridlianskaia II, Zemelko VI, Pugovkina NA, Kovaleva ZV, Zenin VV, et al. Mesenchymal Stem Cells of Human Endometrium Do Not Undergo Spontaneous Transformation During Long-Term Cultivation. *Tsitologiya* 2013; 55(1): 69–74 (In Russ.)]
32. Шаманская ТВ, Осипова ЕЮ, Пурбуева ББ, Устюгов АЮ, Астрелина ТА, Яковлева МВ, Румянцев СА. Культивирование мезенхимальных стволовых клеток ex vivo в различных питательных средах (обзор литературы и собственный опыт). *Онкогематология* 2010; (3): 65–71. [Shamanskaya TV, Osipova YeYu, Purbueva BB, Ustyugov AYU, Astrelina TA, Yakovleva MV, Rumyantsev SA. Ex Vivo Expansion of Mesenchymal Stem Cells in Different Culture Conditions (The Literature Review and Own Experience). *Oncohematology* 2010; (3): 65–71 (In Russ.)]
33. Maleki M, Ghanbarvand F, Behvarz MR, Ejtemaei M, Ghadirikhomi E. Comparison of Mesenchymal Stem Cell Markers in Multiple Human Adult Stem Cells. *Int J Stem Cells* 2014 Nov; 7(2): 118–26.
34. Abdel-Latif A, Bolli R, Tleyjeh IM, Montori VM, Perin EC, Hornung CA, et al. Adult Bone Marrow-Derived Cells for Cardiac Repair: a Systematic Review and Meta-Analysis. *Arch Intern Med.* 2007; 167(10): 989–97.
35. Конопляников МА, Кальсин ВА, Аверьянов АВ. Стволовые клетки для терапии ишемической болезни сердца: достижения и перспективы. *Клиническая практика* 2012; (3): 63–77. [Konoplyannikov MA, Kalsin VA, Averyanov AV. Stem Cells for the Therapy of Ischemic Heart Disease: Advances and Prospects. *Clinical Practice* 2012; (3): 63–77 (In Russ.)]
36. Mansour S, Roy DC, Bouchard V, Nguyen BK, Stevens LM, Gobeil F, et al. COMPARE-AMI Trial: Comparison of Intracoronary Injection of CD133+ Bone Marrow Stem Cells to Placebo in Patients after Acute Myocardial Infarction and Left Ventricular Dysfunction: Study Rationale and Design. *J Cardiovasc Transl Res.* 2010; 3(2): 153–9.
37. Oh H, Bradfute SB, Gallardo TD, Nakamura T, Gaussen V, Mishina Y, et al. Cardiac Progenitor Cells from Adult Myocardium: Homing, Differentiation, and Fusion after Infarction. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100(21): 12313–8.
38. Valente M, Nascimento DS, Cumano A, Pinto-do-Ó P. Sca-1+ Cardiac Progenitor Cells and Heart-Making: a Critical Synopsis. *Stem Cells Dev.* 2014; 23(19): 2263–73.
39. Keith MC, Bolli R. «String theory» of C-Kit(Pos) Cardiac Cells: A New Paradigm Regarding the Nature of These Cells that May Reconcile Apparently Discrepant Results. *Circ Res.* 2015; 116(7): 1216–30.
40. Matsuura K, Nagai T, Nishigaki N, Oyama T, Nishi J, Wada H, et al. Adult Cardiac Sca-1-Positive Cells Differentiate into Beating Cardiomyocytes. *J Biol Chem.* 2004; 279(12): 11384–91.
41. Wang X, Hu Q, Nakamura Y, Lee J, Zhang G, From AH, Zhang J. The Role of the Sca-1+/CD31- Cardiac Progenitor Cell Population in Postinfarction Left Ventricular Remodeling. *Stem Cells* 2006; 24(7): 1779–88.
42. Bolli R, Chugh AR, D'Amario D, Loughran JH, Stoddard MF, Ikram S, et al. Cardiac Stem Cells in Patients with Ischaemic Cardiomyopathy (SCIPIO): Initial Results of a Randomised Phase 1 Trial. *Lancet* 2011; 378(9806): 1847–57.
43. Zaruba MM, Soonpaa M, Reuter S, Field LJ. Cardiomyogenic Potential of C-Kit+-Expressing Cells Derived from Neonatal and Adult Mouse Hearts. *Circulation* 2010; 121(18): 1992–2000.

44. Американская коллекция типовых культур (ATCC). [American Type Culture Collection (ATCC) (In Russ.)] Available from: <http://www.lgcstandards-atcc.org>
45. Jackson CJ, Tonseth KA, Uthaim TP. Cultured Epidermal Stem Cells in Regenerative Medicine. *Stem Cell Res Ther.* 2017; 8(1): 155.
46. Jensen KB, Watt FM. Single-Cell Expression Profiling of Human Epidermal Stem and Transit-Amplifying Cells: Lrig1 Is a Regulator of Stem Cell Quiescence. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103(32): 11958–63.
47. Tan DW, Jensen KB, Trotter MW, Connelly JT, Broad S, Watt FM. Single-Cell Gene Expression Profiling Reveals Functional Heterogeneity of Undifferentiated Human Epidermal Cells. *Development* 2013; 140(7):1433–44.
48. Australian Public Assessment Report for Remestemcel-L, Ex Vivo Adult Human Mesenchymal Stem Cells. Australian Government, Department of Health, Therapeutic Goods Administration, 2015. Available from: <https://www.tga.gov.au/sites/default/files/auspar-remestemcel-l-150315.pdf>
49. Божокин МС, Божкова СА, Нетьлько ГИ. Возможности современных клеточных технологий для восстановления поврежденного суставного хряща (аналитический обзор литературы). *Травматология и ортопедия России* 2016; 22(3): 122–34. [Bozhokin MS, Bozhkova SA, Netylko GI. Possibilities of Current Cellular Technologies for Articular Cartilage Repair (Analytical Review). *Traumatology and Orthopedics of Russia* 2016; 22(3): 122–34 (In Russ.)]
50. Gille J, Schuseil E, Wimmer J, Gellissen J, Schulz AP, Behrens P. Mid-Term Results of Autologous Matrix-Induced Chondrogenesis for Treatment of Focal Cartilage Defects in the Knee. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 2010; 18(11): 1456–64.
51. Vasiladis HS, Danielson B, Ljungberg M, McKeon B, Lindahl A, Peterson L. Autologous Chondrocyte Implantation in Cartilage Lesions of the Knee: Long-Term Evaluation with Magnetic Resonance Imaging and Delayed Gadolinium-Enhanced Magnetic Resonance Imaging Technique. *Am. J. Sports. Med.* 2010; 38(5): 943–49.
52. Camarero-Espinosa S, Rothen-Rutishauser B, Foster EJ, Weder C. Articular Cartilage: from Formation to Tissue Engineering. *Biomater Sci.* 2016; 4(5): 734–67.
53. Тижени НВ, Лютен Ф, Де Бари К, Делль'аччо Ф. Маркерные гены для применения в идентификации фенотипической стабильности хондроцитов и в скрининге факторов, влияющих на продуцирование хряща. Патент Российской Федерации, № 2508548; 2014. [Tigenix NV, Luyten F, De Bari C, Dell'Accio F. Marker Genes for Use in the Identification of Chondrocyte Phenotypic Stability and in the Screening of Factors Influencing Cartilage Production. Patent of the Russian Federation, No. 2508548; 2014 (In Russ.)]
54. Исаев АА, Приходько АВ, Зорин ВЛ и др. Медицинская технология «Забор, транспортировка, выделение, культивирование, криоконсервирование, хранение и использование аутологичных фибробластов для коррекции возрастных и рубцовых изменений кожи». ФС № 2009/398 от 21 июля 2010 г. [Isaev AA, Prikhodko AV, Zorin VL, et al. Medical technology «Fence, Transportation, Isolation, Cultivation, Cryopreservation, Storage and Use of Autologous Fibroblasts for Correction of Age-Related and Cicatricial Skin Changes». FS № 2009/398 dated 21.07.2010 (In Russ.)]
55. Зорин ВЛ, Зорина АИ, Петракова ОС, Черкасов ВР. Дermalные фибробласты для лечения дефектов кожи. *Гены & Клетки Клеточная трансплантология и тканевая инженерия* 2009; 4(4): 26–40. [Zorin VL, Zorina AI, Petrakova OS, Cherkasov VR. Dermal Fibroblasts for Skin Defects Therapy. *Cell Transplantation and Tissue Engineering* 2009; 4(4): 26–40 (In Russ.)]
56. 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; 11(2): 171–82. [Zorin V, Zorina A, Cherkasov V, Kopnin P, Deev R, Isaev A, et al. Application of Autologous Dermal Fibroblasts for Correction of Age-Related Changes of Skin: the Year of Clinical Observations. *Aesthetic Medicine* 2012; 11(2): 171–82 (In Russ.)]
57. Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP). Guideline on Potency Testing of Cell Based Immunotherapy Medicinal Products for the Treatment of Cancer (EMA/CHMP/BWP/271475/2006). Available from: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500003814.pdf
58. Méndez-Hermida F. Approaches to the Non-Clinical Development of Advanced Therapy Medicinal Products. SME Workshop: Focus on Non-Clinical Aspects. European Medicines Agency, London, United Kingdom; 2016.
59. Назаркина ЖК, Лактионов ПП. Получение дендритных клеток для иммунотерапии раковых заболеваний. *Биомедицинская химия* 2015; 61(1): 30–40. [Nazarkina ZhK, Laktionov PP. Preparation of Dendritic Cells for Cancer Immunotherapy. *Biomedical Chemistry* 2015; 61(1): 30–40 (In Russ.)]

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

Трусов Георгий Александрович. Эксперт 2 категории лаборатории биомедицинских клеточных продуктов Испытательного центра экспертизы качества лекарственных средств

Чапленко Александр Андреевич. Эксперт 2 категории лаборатории биомедицинских клеточных продуктов Испытательного центра экспертизы качества лекарственных средств

Семенова Ирина Семеновна. Эксперт 1 категории лаборатории биомедицинских клеточных продуктов Испытательного центра экспертизы качества лекарственных средств, канд. биол. наук

Мельникова Екатерина Валерьевна. Ведущий эксперт лаборатории биомедицинских клеточных продуктов Испытательного центра экспертизы качества лекарственных средств, канд. биол. наук

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

Поступила 04.10.2017

Принята к публикации 08.02.2018

Authors

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

Georgy A. Trusov. 2nd Professional Category Expert of the Laboratory of Biomedical Cell Products of the Testing Centre for Evaluation of Medicinal Products' Quality

Alexander A. Chaplenko. 2nd Professional Category Expert of the Laboratory of Biomedical Cell Products of the Testing Centre for Evaluation of Medicinal Products' Quality

Irina S. Semenova. 1st Professional Category Expert of the Laboratory of Biomedical Cell Products of the Testing Centre for Evaluation of Medicinal Products' Quality. Candidate of Biological Sciences

Ekaterina V. Melnikova. Leading Expert of the Laboratory of Biomedical Cell Products of the Testing Centre for Evaluation of Medicinal Products' Quality. Candidate of Biological Sciences

Yuri V. Olefir. General Director. Doctor of Medical Sciences

Received 4 October 2017

Accepted 8 February 2018