

ИССЛЕДОВАНИЕ БИОРАСПРЕДЕЛЕНИЯ БИМЕДИЦИНСКОГО КЛЕТОЧНОГО ПРОДУКТА НА ОСНОВЕ ХОНДРОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА ПРИ ИМПЛАНТАЦИИ МЫШАМ ЛИНИИ BALB/C NUDE

А. С. Пикина¹✉, П. А. Голубинская¹, Е. С. Ручко², Е. В. Коженевская³, А. Д. Поспелов³, А. А. Бабаев³, А. В. Еремеев^{1,2}

¹ Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины имени Ю. М. Лопухина, Москва, Россия

² Институт биологии развития имени Н. К. Кольцова Российской Академии Наук, Москва, Россия

³ Нижегородский государственный университет имени Н. И. Лобачевского, Нижний Новгород, Россия

Несмотря на перспективность подхода клеточной терапии повреждений хряща человека с помощью аутологичных хондроцитов, подобные технологии только начинают внедрять в медицинскую практику в Российской Федерации. В связи с этим разработка биомедицинских клеточных продуктов (БМКП) для восстановления хрящевой ткани достаточно актуальна, а использование органоидных технологий наиболее приближено к условиям нативной ткани. Согласно требованиям законодательства РФ, в рамках доклинических исследований необходимо изучение биораспределения, характеризующего миграционный потенциал клеток, их тропность к тканям организма при имплантации. Целью работы было исследовать биораспределение нового БМКП на основе хондроцитов человека в виде хондросфер после подкожной имплантации мышам линии Balb/c nude. На первом этапе осуществляли имплантацию 12 мышам, а также введение физиологического раствора 12 контрольным животным. В течение 90 дней проводили взвешивание и наблюдение, а затем выводили мышей из эксперимента для получения образцов органов и тканей для гистологического анализа импланта, оценки его состоятельности, интеграции. На втором этапе изучали биораспределение методом ПЦР для выявления ДНК человека в образцах тканей и органов. Хондросферы успешно интегрировались в окружающие ткани зоны инокуляции, формировали хрящевую ткань. Статистически значимых ($p < 0,05$) изменений в весе не зафиксировали. В образцах из зоны имплантации хондросфер была выявлена ДНК человека, которую не обнаруживали в других органах и тканях. БМКП через 90 дней после имплантации демонстрировал отсутствие биораспределения в другие ткани и органы мышей, что свидетельствует о безопасности разрабатываемого продукта.

Ключевые слова: биомедицинский клеточный продукт, хондроциты, биораспределение, доклинические исследования, хондросферы

Финансирование: научное исследование проведено в рамках государственного задания «Хондросфера», номер государственного учета НИОКТР АААА-А19-119052890054-4.

Благодарности: авторы выражают свою признательность научным сотрудникам лаборатории клеточной биологии ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА за методологическую поддержку в процессе исследования.

Вклад авторов: А. С. Пикина — обзор литературы, сбор и анализ литературных источников, написание текста статьи; П. А. Голубинская — получение и анализ данных, редактирование текста статьи; Е. С. Ручко — получение и анализ данных; Е. В. Коженевская — проведение работ в виварии; А. Д. Поспелов — гистологический анализ; А. А. Бабаев — курация экспериментальной части на животных; А. В. Еремеев — дизайн эксперимента, финальная корректировка текста статьи. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства международным критериям ICMJE.

Соблюдение этических стандартов: исследование было одобрено Комиссией по биоэтике Нижегородского государственного университета имени Н. И. Лобачевского (протокол № 73 от 17 апреля 2023 г.).

✉ **Для корреспонденции:** Арина Сергеевна Пикина
ул. Малая Пироговская, д. 1а, г. Москва, 119435, Россия; arina.pikina@yandex.ru

Статья получена: 05.11.2023 **Статья принята к печати:** 17.12.2023 **Опубликована онлайн:** 31.12.2023

DOI: 10.47183/mes.2023.057

ASSESSING BIODISTRIBUTION OF BIOMEDICAL CELLULAR PRODUCT BASED ON HUMAN CHONDROCYTES FOLLOWING IMPLANTATION TO BALB/C NUDE MICE

Pikina AS¹✉, Golubinskaya PA¹, Ruchko ES², Kozhenevskaya EV³, Pospelov AD³, Babayev AA³, Ereemeev AV^{1,2}

¹ Lopukhin Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine of Federal Medical Biological Agency, Moscow, Russia

² Koltzov Institute of Developmental Biology of Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

³ Lobachevsky State University of Nizhny Novgorod, Nizhny Novgorod, Russia

Despite the prospects of the approach to cell therapy of cartilage damage in humans involving autologous chondrocytes, similar technologies are just beginning to be introduced into medical practice in the Russian Federation. In this regard, the development of biomedical cell products (BCPs) for cartilage tissue repair is quite topical, while the use of organoid technology is the most close to the native tissue conditions. According to requirements of legislation of the Russian Federation, it is necessary to assess biodistribution characterizing migration potential of the cells, their tropism for body tissues following implantation within the framework of preclinical trials. The study was aimed to assess biodistribution of novel BCP based on human chondrocytes in the form of chondrospheres after subcutaneous implantation in Balb/c nude mice. Implantation to 12 mice was performed during the first phase, along with administration of saline to 12 control animals. Weighting and follow-up were conducted for 90 days. Then mice were withdrawn from the experiment to collect samples of organs and tissues for histological analysis of the implant, estimation of its viability, integration. During the second phase biodistribution was assessed by PCR in order to detect human DNA in the organ and tissue samples. Chondrospheres successfully integrated in the tissues surrounding the inoculation zones and formed cartilage tissue. No significant ($p < 0.05$) changes in weight were reported. No human DNA found in chondrosphere implantation zones was detected in the samples collected from other organs and tissues. BCP demonstrated no biodistribution across other tissues and organs of mice 90 days after implantation, which suggested that the product developed was safe.

Keywords: biomedical cellular product, chondrocytes, biodistribution, preclinical trials, chondrospheres

Funding: the study was performed under the State Assignment "Chondrosphere", R&D project ID АААА-А19-119052890054-4.

Acknowledgments: the authors express their gratitude to the research staff of the laboratory of cell biology, Lopukhin Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine of FMBA of Russia, for methodological support provided during the study.

Author contribution: Pikina AS — literature review, literature source collection and analysis, manuscript writing; Golubinskaya PA — data acquisition and analysis, manuscript editing; Ruchko ES — data acquisition and analysis; Kozhenevskaya EV — carrying out work at the vivarium; Pospelov AD — histological analysis; Babayev AA — animal experiment management; Ereemeev AV — experimental design, final correction of the manuscript. All authors confirm compliance of authorship to ICMJE international criteria.

Compliance with the ethical standards: the study was approved by the Bioethics Commission of the Lobachevsky State University of Nizhny Novgorod (protocol № 73 dated 17 April 2023).

✉ **Correspondence should be addressed:** Arina S. Pikina
Malaya Pirogovskaya, 1a, Moscow, 119435, Russia; arina.pikina@yandex.ru

Received: 05.11.2023 **Accepted:** 17.12.2023 **Published online:** 31.12.2023

DOI: 10.47183/mes.2023.057

Достижения последних лет в разработке различных подходов клеточной терапии повреждений хрящевой ткани позволяют лечить некоторые патологии суставов, в том числе связанные с многофакторными поражениями хряща человека [1]. Имплантация аутологичных хондроцитов считается достаточно успешным и многообещающим методом лечения повреждений хрящевой ткани с минимальным риском нежелательных явлений [2]. Принцип этой процедуры заключается в масштабировании и культивировании хондроцитов, полученных из биоптата неповрежденного участка суставного хряща пациента, а затем — пересадке клеток непосредственно в дефект [2]. С момента первого описания имплантации аутологичных хондроцитов в поврежденный участок суставного хряща человека интерес исследователей к клеточной терапии только возрастал [3], и в течение десятилетия появлялись новые методы модификации и оптимизации данного подхода [1]. Использование биомедицинских клеточных продуктов (БМКП) на основе аутологичных хондроцитов демонстрировало преимущество в эффективности по отношению к более традиционным методам — артроскопической санации или микроповреждениям [4–7]. На сегодняшний день ряд БМКП проходит доклинические или клинические испытания разных фаз [1, 2, 6, 8, 9], и несколько продуктов одобрены к применению для терапии очаговых поражений хряща человека [11–14].

Большими преимуществами по сравнению с другими разновидностями БМКП для терапии дефектов суставного хряща обладают сфероиды, которые представляют собой трехмерные структуры, образованные в результате самоагрегации клеток в определенных условиях культивирования [15]. Так, 3D-условия благоприятно сказываются на пролиферативной активности и фенотипической стабильности зрелых хондроцитов [9]. В отличие от суспензии аутологичных хондроцитов, которые становятся способными к выработке внеклеточного матрикса (ВКМ) только через определенное время после трансплантации, клетки в составе сфероидов способны к секреции компонентов ВКМ еще на этапе культивирования [16, 17]. Кроме того, аутологичные сфероиды не требуют использования посторонних биоматериалов, легко интегрируются в ткань в зоне повреждения, а после имплантации отсутствует необходимость в системной иммуносупрессии [15]. В совокупности перечисленные свойства сфероидных БМКП могут способствовать качественному заполнению дефекта хрящевой ткани. Таким образом, эффективность сфероидов на основе аутологичных хондроцитов была продемонстрирована на животных моделях [17], в клинических исследованиях [18, 19]. Сфероидные БМКП показали значительно больший терапевтический эффект с точки зрения структурного восстановления дефекта хряща по сравнению с процедурой микроповреждений [6, 7].

Один из одобренных на мировом рынке препаратов клеточной терапии восстановления дефектов суставного хряща человека — Spherotm (Co.don; Германия) — представляет собой сфероидный БМКП. На данный момент компания ОА «Генериум» по лицензии Co.don производит этот препарат и завершает III фазу клинических исследований в РФ [10]. В это же время аналогов подобных БМКП в Российской Федерации не представлено. Таким образом, единственный продукт, представляющий собой, по сути, трансфер технологии компании Co.don, в настоящее время проходит клинические исследования на территории РФ. Учитывая оптимистичные результаты

исследований зарубежных партнеров в области клеточной терапии, развитие и внедрение подобных технологий в исследовательскую и медицинскую практику в РФ представляется очень актуальным.

Основная задача работ с БМКП заключается в поддержании эффективности и соответствии критическим параметрам качества для обеспечения безопасности и ожидаемого эффекта, что необходимо спрогнозировать еще до начала клинических исследований. Поэтому БМКП, как и другие лекарственные препараты, должны отвечать строгим требованиям для одобрения регулирующими органами с целью дальнейших исследований и реализации [8]. Для этого необходимы разработка и проведение соответствующих методов анализа для оценки клеточного продукта до и после имплантации в рамках доклинических испытаний [19, 20]. Так, перед началом доклинических исследований над животными требуется выявить основные факторы риска, такие как туморогенность, онкогенность и биораспределение [21].

Биораспределение — один из важных критериев безопасности, характеризующий миграционный потенциал клеток в составе БМКП после имплантации, способность к образованию эктопической ткани и персистенции в/вне зоне(ы) введения [9, 22–24]. Оценку биораспределения обычно проводят на животных моделях с иммунодефицитом, при этом предпочтительна подкожная имплантация ввиду ее меньшей инвазивности [24]. Поскольку тестируемый продукт по своим свойствам должен быть максимально приближен к финальному варианту БМКП или даже идентичен ему, для оценки биораспределения также желательно избегать применения флуоресцентных меток или каких-либо других подходов, потенциально вносящих изменения в структуру и свойства продукта [8].

Целью настоящего исследования было изучение биораспределения разработанного нами сфероидного БМКП «Хондросфера», предназначенного для терапии поражений суставного хряща у человека, после подкожной имплантации иммунодефицитным мышам линии Balb/c Nude.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Нормативное регулирование

Настоящая работа представляет собой доклиническое исследование нового БМКП и проводилась согласно требованиям действующих нормативных регуляторов [21, 25–27]. Исследование осуществляли согласно утвержденному письменному плану и в соответствии со Стандартными операционными процедурами. Персонал, участвующий в эксперименте, обучен правильному и гуманному обращению с лабораторными животными.

Сфероидные БМКП

Исследуемые БМКП представляли собой 3D-культуру сфероидов на основе хондроцитов человека и были получены с использованием планшета с микролунками Aggre Well 800 (STEMCELL Technologies; Канада) по протоколу производителя. Количество клеток, приходившееся на одну микролунку планшета, составляло $4\text{--}5 \times 10^3$. Полученные сфероиды (клеточный или тканеинженерный продукт имеет название «Хондросфера») культивировали в мини-биореакторах на орбитальном 3D-шейкере (Infors HT; Швейцария) при 37 °C и 5% CO₂ [28]. В качестве питательной среды использовали Advanced DMEM (Gibco, Thermo

Таблица 1. Используемые в работе праймеры

Название	Последовательность 5'→3'	Длина продукта
mActb-F	GAT GCA CAG TAG GTC TAA GTG GAG	121
mActb-R	CAC TCA GGG CAG GTG AAA CT	
CO1-F	CAA CCT CAA CAC CAC CTT C	269
CO1-R	CTC GTG TGT CTA CGT CTA TTC	

Fisher Scientific; США) с добавлением 10 нг/мл bFGF (STEMCELL Technologies; Канада), 100x GlutaMAX (Gibco, Thermo Fisher Scientific; США), 50x B27 (Gibco, Thermo Fisher Scientific; США), 1% инсулин-трансферрин-селенита (ИТС) («ПанЭко»; Россия), 50 мкг/мл аскорбиновой кислоты (Sigma Aldrich; США), 50 мкМ β-меркаптоэтанол, 50 мкг/мл плазмоцина, гентамицина («ПанЭко»; Россия) и 10 мл/л 100х-раствора пенициллина/стрептомицина («ПанЭко»; Россия). Культивирование сфероидов проводили в течение 28 суток, смену среды осуществляли раз в 4 суток.

Дизайн эксперимента

В проведенном исследовании безопасности была выбрана инбредная линия мышей Balb/c Nude с иммунодефицитом. БМКП вводили животным ($n = 12$; 6 самцов, 6 самок) подкожно однократно в область головы в одной дозе в виде пяти сфероидов в физиологическом растворе (группы 1 и 2). Дополнительно 12 мышей (6 самцов и 6 самок) использовали в качестве контрольных животных, которым подкожно в голову вводили 50 мкл физиологического раствора (группы 3 и 4). В течение эксперимента регулярно проводили взвешивание животных, а также измеряли размер инокулята в зоне имплантации. Через 90 календарных дней после введения 12 самок и 12 самцов были подвергнуты эвтаназии декапитацией под ингаляционным наркозом. Затем были извлечены образцы следующих органов и тканей: лимфатические узлы, щитовидная железа, аорта, сердце, легкие, тимус, пищевод, желудок, поджелудочная железа, тонкий кишечник, толстый кишечник, печень, селезенка, почки, мочевого пузыря, надпочечники, головной мозг, семенники, яичники, место введения, кровь, опухоль.

Умерщвленное животное обрабатывали 96% этанолом, все последующие этапы изъятия органов проводили в ламинарном боксе в асептических условиях.

Гистологический анализ

Фиксацию материала проводили в 10% формалине Histosafe (BioVitrum; Россия) в течение 24 ч, затем отмывали от избытков фиксатора под проточной водой 20 мин и пятикратно обезвоживали с помощью модифицированного изопропилового спирта «Блик» («БликМедиклПродакшн»; Россия). Далее образцы заключали в парафин. Гистологические срезы толщиной 4–5 мкм изготавливали на микротоме Microm HM325 (Microm; Германия). Депарафинизацию проводили по схеме: ксилол № 1 — 2 мин, ксилол № 2 — 2 мин, этанол 96% № 1 — 2 мин, этанол 96% № 2 — 2 мин, этанол 70% — 2 мин, дистиллированная вода — 2 мин. Гистологические срезы окрашивали гематоксилин-эозином (Гематоксилин Майера, эозин 1% водный раствор (BioVitrum; Россия)). Полученные препараты исследовали с помощью микроскопа Levenhuk 625 («Левенгук»; Россия).

Выделение геномной ДНК

Для выделения геномной ДНК из органов мышей и капиллярной крови человека, которую использовали в качестве положительного контроля человеческой ДНК, применяли набор «М-CORB-OOM» («Синтол»; Россия) согласно рекомендациям производителя. Для выделения использовали 10–20 мг фрагментов органов или 10–20 мкл капиллярной крови. В качестве отрицательного контроля использовали пробы без образцов органов и тканей. Элюцию геномной ДНК проводили в объеме 400 мкл элюирующего буферного раствора. Конечный объем раствора с выделенной геномной ДНК составил 400 мкл.

Полимеразная цепная реакция (ПЦР)

ПЦР проводили на термоциклере для амплификации нуклеиновых кислот CFX96 Touch (Bio-Rad; США) с использованием готовой смеси для ПЦР 5X Screen Mix («Евроген»; Россия) согласно инструкции производителя. В реакции использовали праймеры, специфичные к генам цитохром С оксидазы 1 (CO1), для обнаружения ДНК человека и бета-актина, специфичного для мыши (mActb), для определения мышинной ДНК (табл. 1).

Амплификацию проводили по следующему протоколу:

- 1) 95 °C — 5 мин;
- 2) 95 °C — 15 с;
- 3) 58 °C — 15 с;
- 4) 72 °C — 30 с.

Этапы 2, 3 и 4 повторяли 40 циклов.

Электрофорез в агарозном геле

Электрофорез ДНК проводили в 1%-м агарозном геле в буфере Tris-Acetate-EDTA (TAE) в камере для горизонтального электрофореза (Biorad; США). Для визуального детектирования продуктов амплификации применяли 0,5 мкг/мл бромистого этидия. Напряжение было выставлено на 120 В, время проведения электрофореза составляло 20 мин. Детекцию продуктов амплификации проводили в ультрафиолете с применением трансиллюминатора (Vilber; Германия).

Статистический анализ

Полученные результаты измерения массы испытуемых животных обрабатывали с помощью пакетов прикладных программ Microsoft Excel (Microsoft; США) и SPSS Statistics 17.0 (IBM; США). Для проверки нормального распределения признака применяли тест Шапиро–Уилка. В качестве метода сравнения использован U-тест Манна–Уитни. При множественных сравнениях применяли поправку Бонферрони. Различия между группами считали статистически достоверными при уровне значимости $p < 0,05$. Для построения графиков

использовали программное обеспечение GraphPad Prism (Dotmatics; США).

Действия с остатками БМКП

Незадействованные в эксперименте БМКП подвергали предварительному автоклавированию и утилизировали как отходы класса Б.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Морфометрический анализ

При регулярном взвешивании в течение 90 суток статистически значимых различий по весу животных не выявлено при сравнении групп, получавших БМКП, и контрольных групп (рис. 1).

Общеклиническое состояние животных опытных и контрольных групп не отличалось. Животные сохраняли активность и нормальное пищевое поведение.

Гистологический анализ

В результате гистологического окрашивания образцов ткани из зоны имплантации БМКП наблюдали стабильную хрящевую ткань с большим количеством хондроцитов и образованием лакун (рис. 2). Миграция клеток из зоны имплантации была минимальной.

Детекция ДНК человека в тканях и органах мыши

При анализе образцов цельной крови, образцов тканей и органов мышей ДНК человека была обнаружена только в области закола хондросфер (табл. 2). В остальных тканях и органах самцов и самок мышей следов анализируемого БМКП не было обнаружено ($LOQ < 0,001$ нг ДНК). Таким образом, характер биораспределения БМКП оптимален для рекомендованного пути введения.

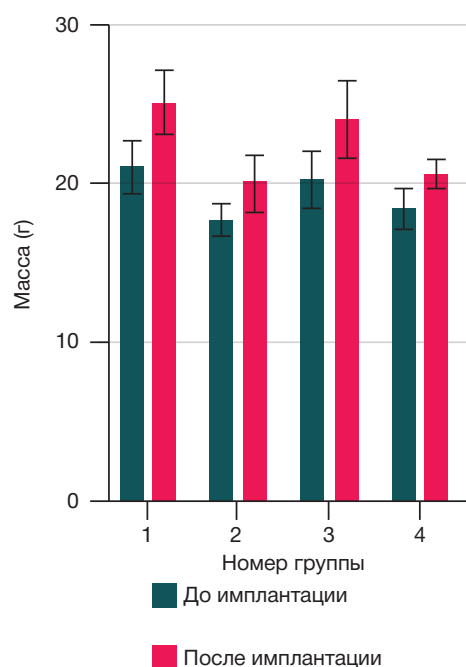


Рис. 1. Изменение массы тела экспериментальных животных по группам до и после эксперимента. 1, 2 — группы самцов и самок, которым имплантировали БМКП, $n = 12$; 3, 4 — группы самцов и самок, которым подкожно вводили физиологический раствор, $n = 12$. * — статистически значимые различия внутри групп исследования, $p < 0,05$

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Получение трехмерных сфероидных БМКП на основе аутологичных хондроцитов человека с помощью органоидной технологии представляется достаточно перспективным направлением в создании продуктов для клеточной терапии объемных очаговых дефектов гиалинового хряща [28]. Несмотря на то что разрабатываемый нами продукт аналогичен по составу продукту компании АО «Генериум», его получают по

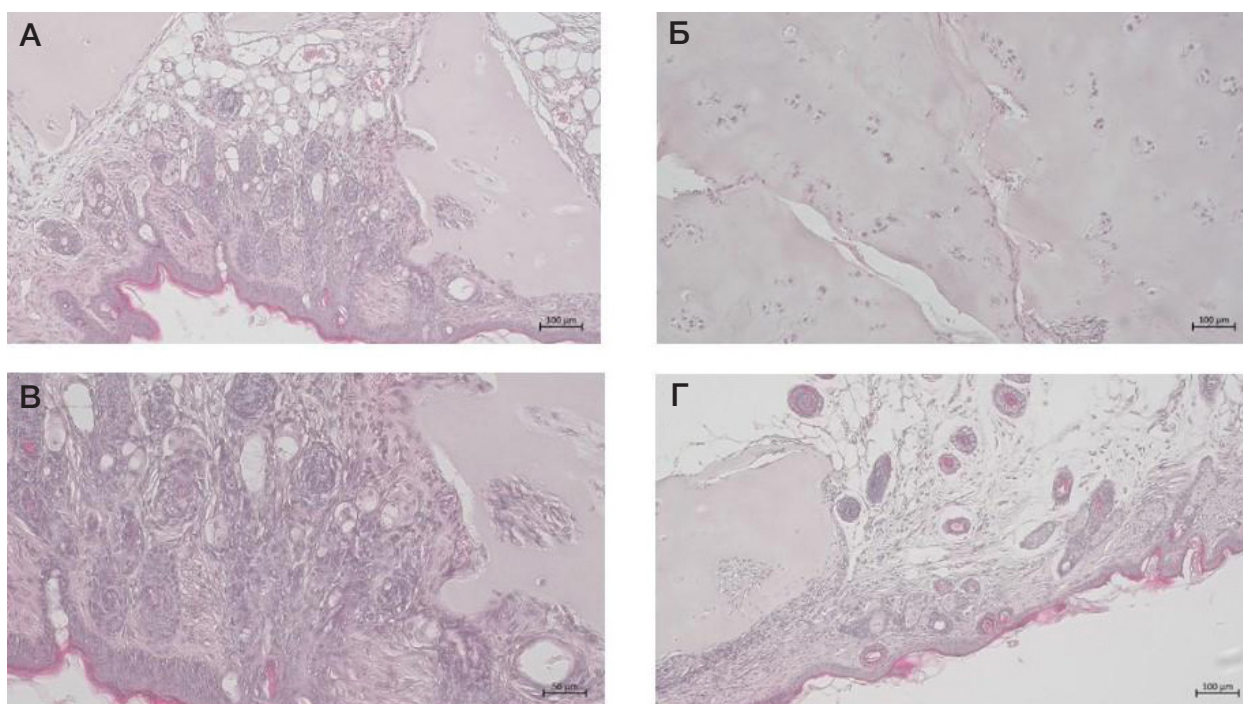


Рис. 2. Хондросферы в тканях мыши через 90 суток после имплантации. Окрашивание гематоксилин-эозином. Увеличение — 10х. Масштабный отрезок — 100 мкм

Таблица 2. Детекция ДНК человека

Орган/ткань	Номер группы (n = 24)			
	1	2	3	4
Лимфатические узлы	-----	-----	-----	-----
Щитовидная железа	-----	-----	-----	-----
Аорта	-----	-----	-----	-----
Сердце	-----	-----	-----	-----
Легкие	-----	-----	-----	-----
Тимус	-----	-----	-----	-----
Пищевод	-----	-----	-----	-----
Желудок	-----	-----	-----	-----
Поджелудочная железа	-----	-----	-----	-----
Тонкий кишечник	-----	-----	-----	-----
Печень	-----	-----	-----	-----
Селезенка	-----	-----	-----	-----
Почки	-----	-----	-----	-----
Мочевой пузырь	-----	-----	-----	-----
Надпочечники	-----	-----	-----	-----
Головной мозг	-----	-----	-----	-----
Семенники	-----	-----	-----	-----
Яичники	-----	-----	-----	-----
Место введения	++++++	++++++	-----	-----
Кровь	-----	-----	-----	-----
Опухоль	-----	-----	-----	-----

Примечание: были получены качественные данные, имеющие положительное значение (наличие человеческой ДНК) для образцов, обозначенных «+»; 1, 2 — группы, получавшие БМКП; 3, 4 — группы, получавшие физиологический раствор.

модифицированной технологии, что требует тестирования безопасности. Согласно существующим нормативам, исследование фармакокинетики БМКП включает анализ биораспределения, которое характеризует миграционный потенциал клеток в составе конструктора [27]. Ранее исследователи продукта Spherox™ в рамках регистрационных мероприятий после консультации с регулятором проводили исследование биораспределения своей разработки при имплантации иммунодефицитным животным [8]. Проведенный с помощью ПЦР анализ показал отсутствие человеческой ДНК в тканях и органах, удаленных от зоны подкожной имплантации. Таким образом, в рамках тестирования безопасности проведение исследования биораспределения БМКП, предназначенного для имплантации человеку, представляется целесообразным с помощью указанного подхода.

Цель нашего исследования состояла в изучении биораспределения разработанного сфероидного БМКП для терапии поражений суставного хряща человека на иммунодефицитных мышах. Насколько нам известно, это первое масштабное доклиническое исследование БМКП на основе аутологических хондроцитов в РФ.

При изучении биораспределения использовали мышей линии Balb/c Nude. Данная линия иммунодефицитных мышей широко используется в исследованиях ксенотрансплантатов, в том числе на основе хондроцитов человека [29–30]. Мы прибегали к подкожной имплантации сфероидов, поскольку эта процедура менее инвазивна, масштабируема и более проста в реализации, например, по сравнению с имплантацией в сустав мелкого грызуна. Дозу однократного введения БМКП рассчитывали, исходя из предполагаемой терапевтической дозы для человека

согласно размеру дефектов хрящевой ткани — 10–70 сфероидов на 1 см² поврежденной ткани [8]. Для мыши эта доза составила пять сфероидов на одно животное.

Для оценки формирования стабильной хрящевой ткани в месте введения БМКП места закола были исследованы с помощью гистологического анализа. Мы наблюдали образование хрящевой ткани через 90 суток после имплантации, что говорит об успешной интеграции сфероидов в тканях мыши. Морфометрические данные не показали значительных изменений массы тела у опытных групп, что говорит об отсутствии системного патологического действия. Кроме того, не наблюдали аномального роста ткани, связанного с онкогенными (на 3-й месяц наблюдения) или опухоленными процессами.

Для проверки распределения биоптаты органов и тканей мыши по прошествии 90 суток после имплантации были качественно оценены путем анализа на наличие экспрессии видоспецифичной для человека последовательности гена, кодирующего цитохром С оксидазу 1 (COI). Согласно полученным нами результатам, при однократном подкожном введении БМКП опытным мышам человеческая ДНК детектируется исключительно в месте введения, но не в остальных проанализированных тканях и органах. Таким образом, ДНК человека относится только к клеткам в составе самих имплантированных сфероидов. Тем не менее, в дальнейшем планируется исследование биораспределения и онкогенности БМКП в организме мыши при более длительном сроке после имплантации для оценки возможных отсроченных эффектов. Полученные на данном этапе результаты свидетельствуют об отсутствии процессов клеточной миграции, что позволяет судить о безопасности разработанного продукта по части биораспределения.

ВЫВОДЫ

В настоящей работе мы провели исследование биораспределения БМКП в виде хондросфер на основе хондроцитов человека путем подкожной имплантации мышам линии Balb/c Nude. В ходе исследования наблюдали образование стабильной, морфологически зрелой хрящевой ткани без признаков аномальной

пролиферации, а также отсутствие клеточной миграции за пределы области имплантации. Данные результаты позволяют сделать вывод о том, что разработанный БМКП характеризуется нормальным биораспределением в пределах зоны введения и хорошо интегрируется в окружающие ткани. Таким образом, данный продукт клеточной инженерии — «Хондросфера» — может быть рекомендован для дальнейших исследований.

Литература

1. Ramezankhani R, Torabi S, Minaei N, Madani H, Rezaeiani S, Hassani SN, et al. Two Decades of Global Progress in Authorized Advanced Therapy Medicinal Products: An Emerging Revolution in Therapeutic Strategies. *Front Cell Dev Biol.* 2020; 8: 547653. DOI:10.3389/fcell.2020.547653.
2. Kim J, Park J, Song SY, Kim E. Advanced Therapy medicinal products for autologous chondrocytes and comparison of regulatory systems in target countries. *Regen Ther.* 2022; 20: 126–37. DOI: 10.1016/j.reth.2022.04.004.
3. Brittberg M, Lindahl A, Nilsson A, Ohlsson C, Isaksson O, Peterson L. Treatment of deep cartilage defects in the knee with ACL. *N Engl J Med.* 1994; 331 (14): 889–95.
4. Fontana A, Bistolfi A, Crova M, Rosso F, Massazza G. Arthroscopic treatment of hip chondral defects: Autologous chondrocyte transplantation versus simple debridement — A pilot study. *Arthrosc — J Arthrosc Relat Surg.* 2012; 28 (3): 322–9. DOI: 10.1016/j.arthro.2011.08.304.
5. Saris D, Price A, Widuchowski W, Bertrand-Marchand M, Caron J, Drogset JO, et al. Matrix-applied characterized autologous cultured chondrocytes versus microfracture: Two-year follow-up of a prospective randomized trial. *Am J Sports Med.* 2014; 42 (6): 1384–94. DOI: 10.1177/0363546514528093.
6. Yoon KH, Yoo JD, Choi CH, Lee J, Lee JY, Kim SG, et al. Costal Chondrocyte-Derived Pellet-Type Autologous Chondrocyte Implantation versus Microfracture for Repair of Articular Cartilage Defects: A Prospective Randomized Trial. *Cartilage.* 2021; 13 (1): 1092S–1104S. DOI: 10.1177/1947603520921448.
7. Hobbie K, Niemeyer P, Laute V, Zinser W, Becher C, Kolombe T, et al. Matrix-Associated Autologous Chondrocyte Implantation with Spheroid Technology Is Superior to Arthroscopic Microfracture at 36 Months Regarding Activities of Daily Living and Sporting Activities after Treatment. *Cartilage.* 2021; 13 (1): 437S–448S. DOI: 10.1177/1947603519897290.
8. Zscharnack M, Krause C, Aust G, Thümmel C, Peinemann F, Keller T, et al. Preclinical good laboratory practice-compliant safety study to evaluate biodistribution and tumorigenicity of a cartilage advanced therapy medicinal product (ATMP). *J Transl Med.* 2015; 13 (1): 1–17. DOI: 10.1186/s12967-015-0517-x.
9. Fickert S, Gerwien P, Helmert B, Schattenberg T, Weckbach S, Kaszkin-Bettag M, et al. One-Year Clinical and Radiological Results of a Prospective, Investigator-Initiated Trial Examining a Novel, Purely Autologous 3-Dimensional Autologous Chondrocyte Transplantation Product in the Knee. *Cartilage.* 2012; 3 (1): 27–42. DOI: 10.1177/1947603511417616.
10. Spherex. European Medicines Agency. [cited 2023 Oct 26]. Available from: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/spherex>.
11. Study Details. The Post-marketing Surveillance to Evaluate the Efficacy of CHONDRON (Autologous Cultured Chondrocyte) by Arthroscopy. *ClinicalTrials.gov.* [cited 2023 Oct 26]. Available from: <https://clinicaltrials.gov/study/NCT02539069?cond=Osteoarthritis&intr=Chondrocytes&page=2&rank=13>.
12. Choi NY, Kim BW, Yeo WJ, Kim HB, Suh DS, Kim JS, et al. Gel-type autologous chondrocyte (Chondron) implantation for treatment of articular cartilage defects of the knee. *BMC Musculoskelet Disord.* 2010; 11. DOI: 10.1186/1471-2474-11-103.
13. Pathak S, Chaudhary D, Reddy KR, Acharya KKV, Desai SM. Efficacy and safety of CARTIGROW® in patients with articular cartilage defects of the knee joint: a four year prospective study. *Int Orthop.* 2022; 46 (6): 1313–21. DOI: 10.1007/s00264-022-05369-2.
14. Crowe R, Willers C, Cheng T, Wang L, Zheng MH. Evaluation of Intraoperative Retention of Autologous Chondrocytes on Type I/III Collagen Scaffold (Ortho-ACITM) for Cartilage Repair. *J Foot Ankle Res.* 2015; 8 (S2): 2015. DOI: 10.1186/1757-1146-8-s2-p10.
15. Riedl M, Vadalà G, Papalia R, Denaro V. Three-dimensional, Scaffold-Free, Autologous Chondrocyte Transplantation: A Systematic Review. *Orthop J Sport Med.* 2020; 8 (9): 1–7. DOI: 10.1177/2325967120951152.
16. Shah SS, Mithoefer K. Scientific Developments and Clinical Applications Utilizing Chondrons and Chondrocytes with Matrix for Cartilage Repair. *Cartilage.* 2021; 13 (1): 1195S–1205S. DOI: 10.1177/1947603520968884.
17. Schubert T, Anders S, Neumann E. Long-term effects of chondrospheres on cartilage lesions in an autologous chondrocyte implantation model as investigated in the SCID mouse model. *Int J Mol Med.* 2009; 23 (4): 455–60. DOI: 10.3892/ijmm.
18. Körsmeier K, Claßen T, Kamminga M, Rekowski J, Jäger M, Landgraeber S. Arthroscopic three-dimensional autologous chondrocyte transplantation using spheroids for the treatment of full-thickness cartilage defects of the hip joint. *Knee Surgery, Sport Traumatol Arthrosc.* 2016; 24 (6): 2032–7. DOI: 10.1007/s00167-014-3293-x.
19. Niemeyer P, Laute V, Zinser W, John T, Becher C, Diehl P, et al. Safety and efficacy of matrix-associated autologous chondrocyte implantation with spheroid technology is independent of spheroid dose after 4 years. *Knee Surgery, Sport Traumatol Arthrosc.* 2020; 28 (4): 1130–43. DOI: 10.1007/s00167-019-05786-8.
20. Bartz C, Meixner M, Giesemann P, Roël G, Bulwin GC, Smink JJ. An ex vivo human cartilage repair model to evaluate the potency of a cartilage cell transplant. *J Transl Med.* 2016; 14 (1): 1–15. DOI: 10.1186/s12967-016-1065-8.
21. Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации от 30 октября 2018 г. 512Н «Об утверждении правил надлежащей практики по работе с биомедицинскими клеточными продуктами». С. 1–71.
22. Satué M, Schüler C, Ginner N, Erben RG. Intra-articularly injected mesenchymal stem cells promote cartilage regeneration, but do not permanently engraft in distant organs. *Sci Rep.* 2019; 9 (1): 1–10. DOI: 10.1038/s41598-019-46554-5.
23. Marquina M, Collado JA, Pérez-Cruz M, Fernández-Pernas P, Fafián-Labora J, Blanco FJ, et al. Biodistribution and immunogenicity of allogeneic mesenchymal stem cells in a rat model of intraarticular chondrocyte xenotransplantation. *Front Immunol.* 2017; 8 (NOV): 1–14. DOI: 10.3389/fimmu.2017.01465.
24. Erben RG, Silva-Lima B, Reischl I, Steinhoff G, Tiedemann G, Dalemans W, et al. White paper on how to go forward with cell-based advanced therapies in Europe. *Tissue Eng — Part A.* 2014; 20 (19–20): 2549–54. DOI: 10.1089/ten.tea.2013.0589.
25. Федеральный закон от 23 июня 2016 г. №180-ФЗ «О биомедицинских клеточных продуктах».
26. ГОСТ 33044-2014. Принципы надлежащей лабораторной практики. Межгосударственный стандарт. Дата введения: 1 августа 2015 г.
27. Миронов А. Н., Бунятян Н. Д. Руководство по проведению

доклинических исследований лекарственных средств. М.: Гриф и К, 2012; 944 с.

28. Eremeev AV, Belikova LD, Ruchko EA, Volovikov EA, Zubkova OA, Emelin AM, et al. Brain Organoid Generation from Induced Pluripotent Stem Cells in Home-Made Mini Bioreactors. *J Vis Exp*. 2021; 2021 (178). DOI: 10.3791/62987.
 29. Chen Y, Ma M, Teng Y, Cao H, Yang Y, Wang Y, et al. Efficient manufacturing of tissue engineered cartilage: In vitro by a multiplexed 3D cultured method. *J Mater Chem B*. 2020; 8 (10): 2082–95. DOI: 10.1039/c9tb01484e.
 30. Apelgren P, Amoroso M, Lindahl A, Brantsing C, Rotter N, Gatenholm P, et al. Chondrocytes and stem cells in 3D-bioprinted structures create human cartilage in vivo. *PLoS One*. 2017; 12 (12): 1–16. DOI: 10.1371/journal.pone.0189428.
- ## References
1. Ramezankhani R, Torabi S, Minaei N, Madani H, Rezaeiani S, Hassani SN, et al. Two Decades of Global Progress in Authorized Advanced Therapy Medicinal Products: An Emerging Revolution in Therapeutic Strategies. *Front Cell Dev Biol*. 2020; 8: 547653. DOI: 10.3389/fcell.2020.547653.
 2. Kim J, Park J, Song SY, Kim E. Advanced Therapy medicinal products for autologous chondrocytes and comparison of regulatory systems in target countries. *Regen Ther*. 2022; 20: 126–37. DOI: 10.1016/j.reth.2022.04.004.
 3. Brittberg M, Lindahl A, Nilsson A, Ohlsson C, Isaksson O, Peterson L. Treatment of deep cartilage defects in the knee with ACL. *N Engl J Med*. 1994; 331 (14): 889–95.
 4. Fontana A, Bistolfi A, Crova M, Rosso F, Massazza G. Arthroscopic treatment of hip chondral defects: Autologous chondrocyte transplantation versus simple debridement —A pilot study. *Arthrosc — J Arthrosc Relat Surg*. 2012; 28 (3): 322–9. DOI: 10.1016/j.arthro.2011.08.304.
 5. Saris D, Price A, Widuchowski W, Bertrand-Marchand M, Caron J, Drogset JO, et al. Matrix-applied characterized autologous cultured chondrocytes versus microfracture: Two-year follow-up of a prospective randomized trial. *Am J Sports Med*. 2014; 42 (6): 1384–94. DOI: 10.1177/0363546514528093.
 6. Yoon KH, Yoo JD, Choi CH, Lee J, Lee JY, Kim SG, et al. Costal Chondrocyte-Derived Pellet-Type Autologous Chondrocyte Implantation versus Microfracture for Repair of Articular Cartilage Defects: A Prospective Randomized Trial. *Cartilage*. 2021; 13 (1): 1092S–1104S. DOI: 10.1177/1947603520921448.
 7. Hoburg A, Niemeyer P, Laute V, Zinser W, Becher C, Kolombe T, et al. Matrix-Associated Autologous Chondrocyte Implantation with Spheroid Technology Is Superior to Arthroscopic Microfracture at 36 Months Regarding Activities of Daily Living and Sporting Activities after Treatment. *Cartilage*. 2021; 13 (1): 437S–448S. DOI: 10.1177/1947603519897290.
 8. Zscharnack M, Krause C, Aust G, Thümmel C, Peinemann F, Keller T, et al. Preclinical good laboratory practice-compliant safety study to evaluate biodistribution and tumorigenicity of a cartilage advanced therapy medicinal product (ATMP). *J Transl Med*. 2015; 13 (1): 1–17. DOI: 10.1186/s12967-015-0517-x.
 9. Fickert S, Gerwien P, Helmert B, Schattenberg T, Weckbach S, Kaszkin-Bettag M, et al. One-Year Clinical and Radiological Results of a Prospective, Investigator-Initiated Trial Examining a Novel, Purely Autologous 3-Dimensional Autologous Chondrocyte Transplantation Product in the Knee. *Cartilage*. 2012; 3 (1): 27–42. DOI: 10.1177/1947603511417616.
 10. Spherex. European Medicines Agency. [cited 2023 Oct 26]. Available from: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/spherex>.
 11. Study Details. The Post-marketing Surveillance to Evaluate the Efficacy of CHONDRON (Autologous Cultured Chondrocyte) by Arthroscopy. *ClinicalTrials.gov*. [cited 2023 Oct 26]. Available from: <https://clinicaltrials.gov/study/NCT02539069?cond=Osteoarthritis&intr=Chondrocytes&page=2&rank=13>.
 12. Choi NY, Kim BW, Yeo WJ, Kim HB, Suh DS, Kim JS, et al. Gel-type autologous chondrocyte (Chondron) implantation for treatment of articular cartilage defects of the knee. *BMC Musculoskelet Disord*. 2010; 11. DOI: 10.1186/1471-2474-11-103.
 13. Pathak S, Chaudhary D, Reddy KR, Acharya KKV, Desai SM. Efficacy and safety of CARTIGROW® in patients with articular cartilage defects of the knee joint: a four year prospective study. *Int Orthop*. 2022; 46 (6): 1313–21. DOI: 10.1007/s00264-022-05369-2.
 14. Crowe R, Willers C, Cheng T, Wang L, Zheng MH. Evaluation of Intraoperative Retention of Autologous Chondrocytes on Type I/III Collagen Scaffold (Ortho-ACITM) for Cartilage Repair. *J Foot Ankle Res*. 2015; 8 (S2): 2015. DOI: 10.1186/1757-1146-8-s2-p10.
 15. Riedl M, Vadalà G, Papalia R, Denaro V. Three-dimensional, Scaffold-Free, Autologous Chondrocyte Transplantation: A Systematic Review. *Orthop J Sport Med*. 2020; 8 (9): 1–7. DOI: 10.1177/2325967120951152.
 16. Shah SS, Mithoefer K. Scientific Developments and Clinical Applications Utilizing Chondrons and Chondrocytes with Matrix for Cartilage Repair. *Cartilage*. 2021; 13 (1): 1195S–1205S. DOI: 10.1177/1947603520968884.
 17. Schubert T, Anders S, Neumann E. Long-term effects of chondrospheres on cartilage lesions in an autologous chondrocyte implantation model as investigated in the SCID mouse model. *Int J Mol Med*. 2009; 23 (4): 455–60. DOI: 10.3892/ijmm.
 18. Körsmeier K, Claßen T, Kamminga M, Rekowski J, Jäger M, Landgraeber S. Arthroscopic three-dimensional autologous chondrocyte transplantation using spheroids for the treatment of full-thickness cartilage defects of the hip joint. *Knee Surgery, Sport Traumatol Arthrosc*. 2016; 24 (6): 2032–7. DOI: 10.1007/s00167-014-3293-x.
 19. Niemeyer P, Laute V, Zinser W, John T, Becher C, Diehl P, et al. Safety and efficacy of matrix-associated autologous chondrocyte implantation with spheroid technology is independent of spheroid dose after 4 years. *Knee Surgery, Sport Traumatol Arthrosc*. 2020; 28 (4): 1130–43. DOI: 10.1007/s00167-019-05786-8.
 20. Bartz C, Meixner M, Giesemann P, Roël G, Bulwin GC, Smink JJ. An ex vivo human cartilage repair model to evaluate the potency of a cartilage cell transplant. *J Transl Med*. 2016; 14 (1): 1–15. DOI: 10.1186/s12967-016-1065-8.
 21. Prikaz Ministerstva zdoravookhraneniya Rossiyskoy Federatsii ot 30 oktyabrya 2018 g. 512N «Ob utverzhdenii pravil nadlezhashchey praktiki po rabote s biomeditsinskimi kletochnymi produktami». P. 1–71. Russian.
 22. Satué M, Schüller C, Ginner N, Erben RG. Intra-articularly injected mesenchymal stem cells promote cartilage regeneration, but do not permanently engraft in distant organs. *Sci Rep*. 2019; 9 (1): 1–10. DOI: 10.1038/s41598-019-46554-5.
 23. Marquina M, Collado JA, Pérez-Cruz M, Fernández-Pernas P, Fafián-Labora J, Blanco FJ, et al. Biodistribution and immunogenicity of allogeneic mesenchymal stem cells in a rat model of intraarticular chondrocyte xenotransplantation. *Front Immunol*. 2017; 8 (NOV): 1–14. DOI: 10.3389/fimmu.2017.01465.
 24. Erben RG, Silva-Lima B, Reischl I, Steinhoff G, Tiedemann G, Dalemans W, et al. White paper on how to go forward with cell-based advanced therapies in Europe. *Tissue Eng — Part A*. 2014; 20 (19–20): 2549–54. DOI: 10.1089/ten.tea.2013.0589.
 25. Federal'nyy zakon ot 23 iyunya 2016 g. №180-FZ «O biomeditsinskikh kletochnykh produktakh». Russian.
 26. GOST 33044-2014. Printsipy nadlezhashchey laboratornoy praktiki. Mezhdgosudarstvennyy standart. Data vvedeniya: 1 avgusta 2015 g. Russian.
 27. Mironov AN, Bunyatyan ND. Rukovodstvo po provedeniyu doklinicheskikh issledovaniy lekarstvennykh sredstv. M.: Grif i K, 2012; 944 p. Russian.
 28. Eremeev AV, Belikova LD, Ruchko EA, Volovikov EA, Zubkova OA, Emelin AM, et al. Brain Organoid Generation from Induced Pluripotent Stem Cells in Home-Made Mini Bioreactors. *J Vis Exp*. 2021; 2021 (178). DOI: 10.3791/62987.

29. Chen Y, Ma M, Teng Y, Cao H, Yang Y, Wang Y, et al. Efficient manufacturing of tissue engineered cartilage: In vitro by a multiplexed 3D cultured method. *J Mater Chem B*. 2020; 8 (10): 2082–95. DOI: 10.1039/c9tb01484e.
30. Apelgren P, Amoroso M, Lindahl A, Brantsing C, Rotter N, Gatenholm P, et al. Chondrocytes and stem cells in 3D-bioprinted structures create human cartilage in vivo. *PLoS One*. 2017; 12 (12): 1–16. DOI: 10.1371/journal.pone.0189428.