

DOI: <https://doi.org/10.17816/gc623960>

Влияние условий хранения на жизнеспособность сфероидов, полученных из первичных культур хондроцитов человека

П.А. Голубинская¹, А.С. Пикина¹, Е.С. Ручко², А.В. Еремеев^{1, 2}¹ Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины имени академика Ю.М. Лопухина Федерального медико-биологического агентства, Москва, Россия;² Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, Москва, Россия

АННОТАЦИЯ

Обоснование. Создание тканеинженерных препаратов для терапии повреждений гиалинового хряща в настоящее время является перспективным направлением регенеративной медицины. Исследование условий хранения и транспортировки таких препаратов — важный этап в разработке, поскольку определяет жизнеспособность и функциональную активность клеточного компонента, составляющего препарат. Кроме того, такая работа должна проводиться, согласно требованиям законодательства Российской Федерации, перед использованием разработанного лекарственного препарата в клинических исследованиях.

Цель исследования — подбор условий хранения прототипа препарата тканевой инженерии в виде хондросфер.

Методы. Хондросферы формировали на основе первичных культур хондроцитов человека, полученных из биопсийного материала хряща коленного сустава пациентов с диагнозом, соответствующим кодам M15–M19 по международной классификации болезней 10-го пересмотра. После формирования хондросфер изучали клеточную жизнеспособность с помощью метаболического красителя PrestoBlue и сохранность экспрессии хондрогенных маркёров (SOX9, агрекана, коллагена I и II типа) с помощью ПЦР в режиме реального времени при различных условиях транспортировки: сроках хранения, составе среды и температуре.

Результаты. Изучение экспрессии хондроцитарных маркёров подтвердило, что клетки в хондросферах сохраняют хондроцитарный фенотип. Исследование жизнеспособности клеток в составе хондросфер при различных условиях хранения показало, что наиболее благоприятной средой для сохранения жизнеспособности клеток в препарате являлись фосфатно-солевой буфер и 0,9% раствор хлорида натрия ($p < 0,05$). Метаболическая активность клеток, составляющих хондросферы, сохранялась в процессе хранения при температуре +4 °C до трёх суток ($p < 0,05$).

Заключение. Показано, что для хранения и транспортировки прототипа хрящевого имплантата в виде хондросфер наиболее предпочтительной средой является изотонический раствор, а условием для сохранения жизнеспособности — температурный режим +4 °C в течение не более двух суток.

Ключевые слова: тканевая инженерия; хондроциты; хранение препарата.

Как цитировать:

Голубинская П.А., Пикина А.С., Ручко Е.С., Еремеев А.В. Влияние условий хранения на жизнеспособность сфероидов, полученных из первичных культур хондроцитов человека // Гены и клетки. 2024. Т. 19, № 2. С. 255–264. DOI: <https://doi.org/10.17816/gc623960>

DOI: <https://doi.org/10.17816/gc623960>

Influence of storage conditions on the viability of spheroids from human chondrocytes

Polina A. Golubinskaya¹, Arina S. Pikina¹, Evgenii S. Ruchko², Artem V. Ereemeev^{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

ABSTRACT

BACKGROUND: The use of tissue-engineered products for treating hyaline cartilage injuries is currently a promising direction for regenerative medicine. The study of storage and transportation conditions of such preparations is essential in product development because it determines the viability and functional activity of the cellular component of the product. In addition, such work should be performed following the requirements of Russian legislation before using the developed drug product in clinical trials.

AIM: To characterize the storage conditions for tissue-engineered preparations such as chondrospheres.

METHODS: Chondrospheres were formed from human chondrocytes obtained from the biopsy material of the knee joint cartilage of patients diagnosed according to ICD-10 codes M15–M19. After the formation of chondrospheres, cell viability was examined using the metabolic dye PrestoBlue, and the expression of chondrogenic markers (SOX9, aggrecan, collagen type 1 and type 2) was preserved using real-time polymerase chain reaction under various transportation conditions, i.e., at different storage times, medium composition, and temperature.

RESULTS: The analysis of the expression of chondrocyte markers confirmed that cells in chondrospheres retain a chondrocyte phenotype. In the cell viability study of tissue-engineered products under various conditions (temperature, solution, and time), the most favorable environment for storing the product was phosphate buffer saline and 0.9% sodium chloride solution ($p < 0.05$). The metabolic activity of the cells that make up the tissue-engineered product was maintained when stored at +4 °C for up to 3 days ($p < 0.05$).

CONCLUSION: Isotonic solution and temperature regime +4 °C for not more than 2 days showed the preferable medium and conditions for storing and transporting the prototype cartilage implant as chondrospheres.

Keywords: tissue engineering; chondrocytes; drug storage.

To cite this article:

Golubinskaya PA, Pikina AS, Ruchko ES, Ereemeev AV. Influence of storage conditions on the viability of spheroids from human chondrocytes. *Genes & cells*. 2024;19(2):255–264. DOI: <https://doi.org/10.17816/gc623960>

Received: 28.11.2023

Accepted: 19.03.2024

Published online: 05.06.2024

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время в России практически отсутствуют технологии, направленные на восстановление гиалинового хряща, повреждения которого нарушают функцию сустава, вызывают боль и снижение его подвижности. Помимо использования симптоматических противовоспалительных лекарственных средств, основными терапевтическими агентами в настоящее время являются препараты на основе гиалуроновой кислоты и аутологичной тромбоцитарной массы, которые дают лишь кратковременный эффект в виде облегчения симптоматики и небольшую отсрочку операции по протезированию сустава. В свою очередь эндопротезирование суставов сопряжено с большими рисками и часто сопровождается многочисленными побочными эффектами в виде инфекций, тромбозов, нарушения подвижности сустава и изменения длины конечности [1–3].

В связи с этим в Федеральном научно-клиническом центре физико-химической медицины имени академика Ю.М. Лопухина Федерального медико-биологического агентства разработана технология получения хондросфер, посредством применения которых возможно прервать цепь развития патологии: травматическое повреждение суставного хряща — воспаление — дегенерация хрящевой ткани. Получение 3D-хрящеподобных конструкций на основе аутологичных хондроцитов является перспективным направлением для коррекции объёмных дефектов суставного хряща. Предлагаемая к использованию в клинике органоидная технология 3D-культивирования [4] позволяет сохранить зрелое дифференцированное состояние клеток, способных к выработке внеклеточного матрикса, что приближает хондросферы по характеристикам к нативной ткани.

За рубежом подобные технологии уже успешно внедрены в клиническую практику. Аналог предлагаемого к исследованию препарата применяется компанией CoDon (Германия) [5]. Кроме того, в РФ компания «Генериум» производит биомедицинский клеточный продукт Spherohx по лицензии упомянутой выше компании.

Нами ранее разработана технология получения трёхмерных структур, которая была значительно оптимизирована для производства хрящевых имплантатов [6]. Для дальнейшего применения данной разработки в клинических исследованиях необходимо определить условия хранения и транспортировки, при которых бы сохранялись важнейшие показатели качества, например жизнеспособность клеток. Однако данные по стабильности сложнокомпонентных биологических препаратов, в том числе 3D-сфероидов на основе хондроцитов, часто являются коммерческой тайной компаний-производителей и поэтому практически не публикуются в открытых источниках.

Клеточные препараты — дорогие в производстве и сложные биологические объекты, которые обладают множеством различных свойств. Поэтому необходимо

всесторонне оценить влияние на клетки внешних факторов, таких как условия хранения, состав среды, температура и сроки хранения. К ключевым характеристикам клеточных сфероидов можно отнести жизнеспособность, которая определяется входящими в их состав клетками. В настоящее время не существует отработанных протоколов длительного хранения путём заморозки подобных 3D-структур, которые помимо клеток содержат в своём составе компоненты внеклеточного матрикса, разрушающиеся при традиционных условиях криоконсервации [7]. Снижение жизнеспособности клеток, входящих в состав хондросфер, под воздействием неблагоприятных факторов окружающей среды несомненно окажет влияние на результаты дальнейших исследований. Таким образом, необходимо определить условия хранения и транспортировки 3D-конструкций из хондроцитов до начала клинических исследований, снизив вероятность получения недостоверных результатов.

Выбор подхода к оценке жизнеспособности клеток, входящих в состав хондросфер, представляющих собой 3D-структуры, зависит от целей исследования и используемой в производстве клеточной линии. Кроме того, необходим метод, который не потребует больших временных и финансовых ресурсов и позволит использовать минимальное количество образцов препарата. Метаболические красители, такие как ХТТ, МТТ, PrestoBlue и другие, представляются наиболее удобными и дешёвыми для использования в качестве реагентов в методиках по анализу жизнеспособности клеток в составе сложнокомпонентных клеточных препаратов [8].

Цель исследования — оценка жизнеспособности и стабильности прототипа препарата тканевой инженерии в виде хондросфер, созданных на основе культур хондроцитов человека, под влиянием различных условий хранения.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Использованные линии клеток

В работе использовали полученные ранее первичные культуры хондроцитов человека, выделенные из биопсийного материала хряща коленного сустава пациентов с диагнозом, соответствующим кодам М15–М19 по международной классификации болезней 10-го пересмотра.

Исследование одобрено локальным этическим комитетом ФГБУ ФНКЦ ФХМ им. Ю.М. Лопухина ФМБА России (протокол № 2019/02 от 9 апреля 2019 г.).

Замороженные клетки первичных культур хондроцитов хранятся в криобанке ФГБУ ФНКЦ ФХМ им. Ю.М. Лопухина ФМБА России. Для размораживания клеток криовиалу нагревали на водяной бане при 37 °C до полного исчезновения льда, после чего клетки отмывали от DMSO в 10 мл предварительно нагретой до 37 °C среды DMEM/F12 («ПанЭко», Россия) путём центрифугирования в пробирке

15 мл (Servicebio, Китай) при 200 g в течение 5 мин. Клеточный осадок ресуспендировали для последующего культивирования в среде DMEM/F12 с добавлением 15% FBS (Servicebio) и высевали на пластиковые чашки Петри с адгезивной поверхностью (Servicebio). Смену среды проводили раз в четверо суток. Индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (ИПСК) линии iPSRG4S использовали в качестве контроля. ИПСК культивировали в среде ГибриС-8 («ПанЭко») в чашках Петри диаметром 35 мм (Servicebio), предварительно покрытых Матригелем (Corning, США).

Получение 3D-сфероидов в мини-биореакторах

Получение трёхмерных структур из первичных культур хондроцитов и линии ИПСК проводили с помощью оптимизированного протокола, описанного ранее [9]. Для культивирования 3D-культур использовали базовую среду Advanced DMEM/F12 с добавлением 10 нг/мл bFGF (ФГБУ ФНКЦ ФХМ им. Ю.М. Лопухина ФМБА, Россия), 100x GlutaMAX (Gibco, Thermo Fisher Scientific, США), 50x B27 (Gibco, Thermo Fisher Scientific), 1% инсулин-трансферин-селенита («ПанЭко»), 50 мкг/мл аскорбиновой кислоты (Sigma-Aldrich, США), 50 мкМ β-меркаптоэтанола, 40 мкг/мл гентамицина («ПанЭко»). К среде добавляли 10% собственной сыворотки пациента (*англ.* serum of patient, SP). Культивирование сфероидов проводили в течение 35 сут. Смену среды осуществляли раз в четверо суток. Каждые 7 сут оценивали морфологию сфероидов с помощью микроскопа с фазовым контрастом Olympus IX53F (Olympus, Япония) и программного обеспечения для морфометрии CellSens Standart.

Получены хондросферы от четырёх пациентов и эмбриональные тельца из ИПСК линии iPSRG4S в качестве контроля. С ними проведены эксперименты по влиянию на жизнеспособность клеток различных условий хранения и транспортировки: +4–8 °C (условия холодильника); 22–24 °C (комнатная температура) и 37 °C (CO₂-инкубатор без подачи углекислого газа) в течение четырёх суток в различных жидкостях: питательная среда DMEM/F12, 0,9% раствор хлорида натрия (физиологический раствор) и фосфатно-солевой буфер (PBS).

Жизнеспособность хондроцитов оценивали с помощью метаболического красителя PrestoBlue (Thermo Fisher Scientific) согласно протоколу производителя. Для этого хондросферы поштучно размещали в лунки, в которые предварительно добавляли 100 мкл физиологического раствора, PBS или DMEM/F12. Далее образцы культивировали в течение 1–3 сут. В качестве отрицательного контроля использовали лунки с клетками и хондросферы, обработанные тритоном X-100. Затем добавляли 10 мкл реактива PrestoBlue и инкубировали в CO₂-инкубаторе при 37 °C и 5% CO₂ в течение 2 ч. По окончании инкубации определяли оптическую плотность при длине волны возбуждения 560 нм, эмиссию — при 590 нм на приборе

Infinite M200 Pro (TECAN, Швейцария). Полученные значения после нормирования (вычитания) показаний отрицательного контроля сопоставляли с калибровочным графиком [10], что позволяло определить остаточное количество жизнеспособных клеток в хондросфере.

Анализ экспрессии ключевых маркёров хондроцитов методом количественной ОТ-ПЦР

Тотальную РНК выделяли с помощью набора RNeasy Mini Kit (QIAGEN, Германия) согласно инструкции производителя. Концентрацию РНК измеряли на спектрофотометре Infinite 200 PRO (TECAN) с помощью микролуночного планшета. Синтезировали кДНК на матрице РНК, используя набор реагентов M-MLV RT kit («Евроген», Россия) согласно инструкции. Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) проводили с готовым набором для количественной ПЦР qPCRmix-HS SYBR («Евроген»). Для проведения ПЦР используются праймеры, перечисленные в табл. 1. Концентрация каждого из праймеров составляла 10 мкМ, объём реакции — 20 мкл. 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 повторялись 40 раз. Количественную ПЦР выполняли в амплификаторе Real-Time CFX96 (Bio-Rad, США). Результаты анализировали в программе Microsoft Excel по методу ΔΔCt.

Таблица 1. Последовательности праймеров
Table 1. Primer sequences

Название гена	Последовательность 5'–3'	Длина фрагмента, нуклеотиды
ACAN	AGGAGTCCCTGACCTGGTTT	167
ACAN	CCTGACAGATCTGCCTCTCC	
COL1A	AGGGTGAGACAGGCGAACA	184
COL1A	CCGTTGAGTCCATCTTTGC	
COL2A1	TGGACGCCATGAAGGTTTCT	142
COL2A1	CCATTGATGGTTTCTCCAAACC	
YWHAZ	ACTTTTGGTACATTGTGGCTTCAA	94
YWHAZ	CCGCCAGGACAAACCAGTAT	

Статистическая обработка данных

Результаты измерений обрабатывали с помощью пакетов прикладных программ Microsoft Excel (Microsoft, США) и SPSS Statistics 17.0 (IBM, США). Для проверки нормальности распределения признака применяли тест Шапиро–Уилка. Распределение не подчинялось нормальному закону. В качестве метода сравнения использован непараметрический U-тест Манна–Уитни (Mann–Whitney U-test) с поправкой Бонферрони. Различия между группами считали статистически значимыми при *p* < 0,05.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Оценка экспрессии хондроцитарных маркёров

Оценка экспрессии генов методом количественной ПЦР с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) в 2D-культурах, которые используются для получения 3D-структур, показала в клетках от различных пациентов схожий уровень экспрессии генов, кодирующих агрекан, коллаген I и II типов и транскрипционный фактор SOX9 (рис. 1).

Сравнительный анализ уровня экспрессии хондроцитарных маркёров в хондросферах, полученных

из хондроцитов различных пациентов, показал отсутствие статистически значимых различий между культурами ($p > 0,05$) на 35-й день культивирования (рис. 2).

Поскольку одной из ключевых характеристик клеток является жизнеспособность, этот показатель был исследован с целью определения оптимальной температуры и сроков хранения хондросфер. Для этого образцы хондросфер помещали в различные изотонические растворы, которые планировались к использованию в качестве транспортных сред. В качестве растворов для хранения и транспортировки использовали PBS, 0,9% раствор хлорида натрия (физиологический раствор) и питательную

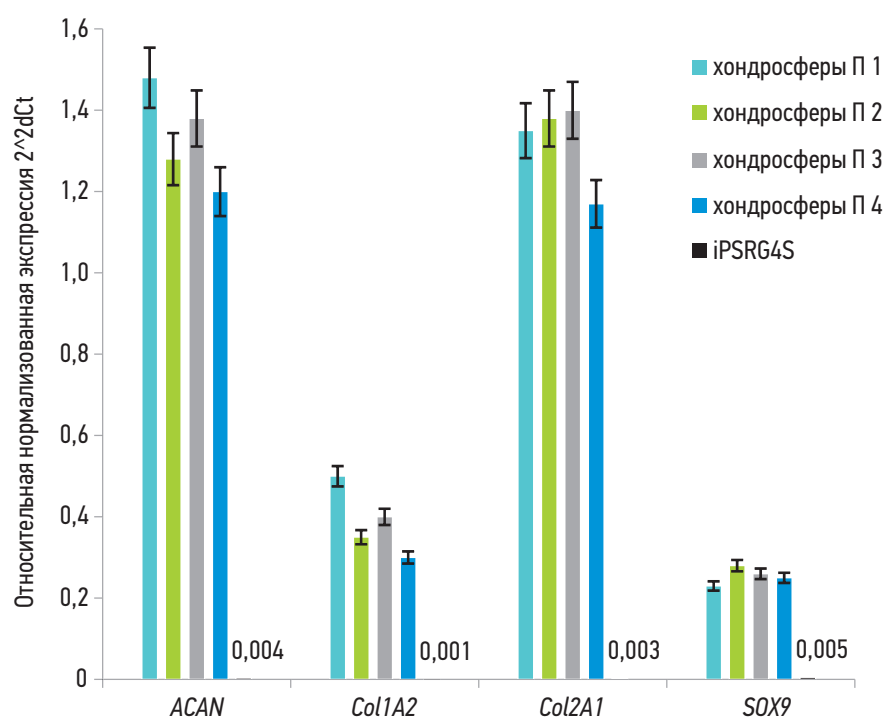


Рис. 1. Относительная экспрессия генов хондроцитарных маркёров в линиях хондроцитов человека, полученных от разных пациентов (П). iPSRG4S — культура индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (негативный контроль). Экспрессия генов клетками iPSRG4S показана на графике цифрами справа.

Fig. 1. Relative expression of chondrocyte markers in human chondrocyte lines obtained from different patients (П). iPSRG4S — induced pluripotent stem cells culture (negative control). Gene expression by iPSRG4S cells is shown by numbers in the graph on the right.

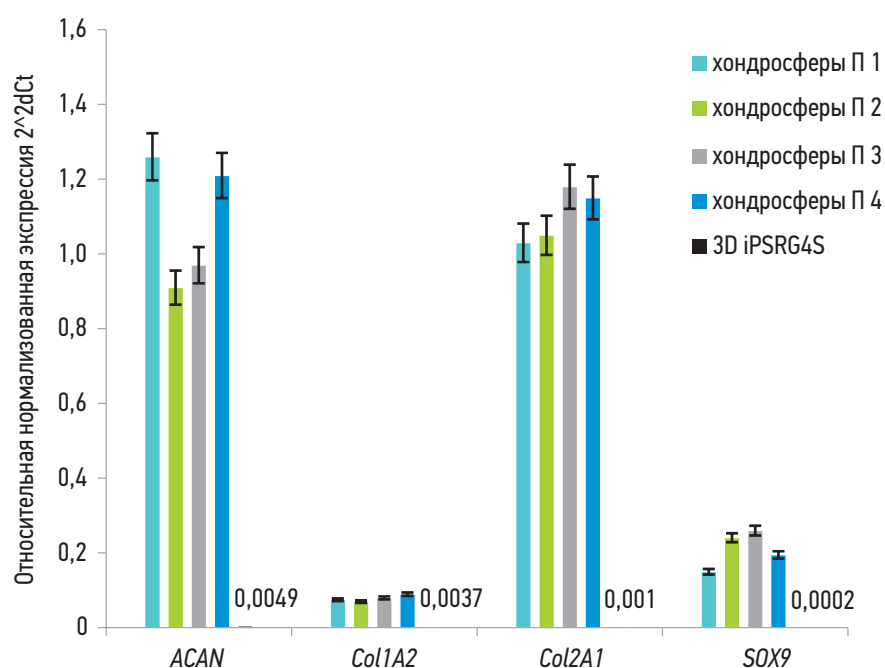


Рис. 2. Относительная нормализованная экспрессия генов хондрогенных маркёров в трёхмерных культурах хондроцитов (хондросферах), полученных из хондроцитов пациентов (П). 3D iPSRG4S — эмбриональные тельца, полученные из культуры индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (негативный контроль). Экспрессия генов клетками iPSRG4S показана на графике цифрами справа.

Fig. 2. Relative normalized gene expression of chondrogenic markers in three-dimensional chondrocyte cultures (chondrospheres) derived from patient chondrocytes (П). 3D iPSRG4S — embryoid bodies obtained from induced pluripotent stem cells culture (negative control). Gene expression by iPSRG4S cells is shown by numbers in the graph on the right.

среду DMEM/F12 без специальных добавок и сыворотки. Далее хондросферы инкубировали в условиях термостата при 37 °C, холодильника (4 °C) или при комнатной температуре (22 °C) в течение 1–4 сут.

Результаты оценки стабильности препарата по показателю жизнеспособности клеток, определённой с использованием реагента PrestoBlue, представлены на рис. 3. Данные на графиках показывают, что статистически

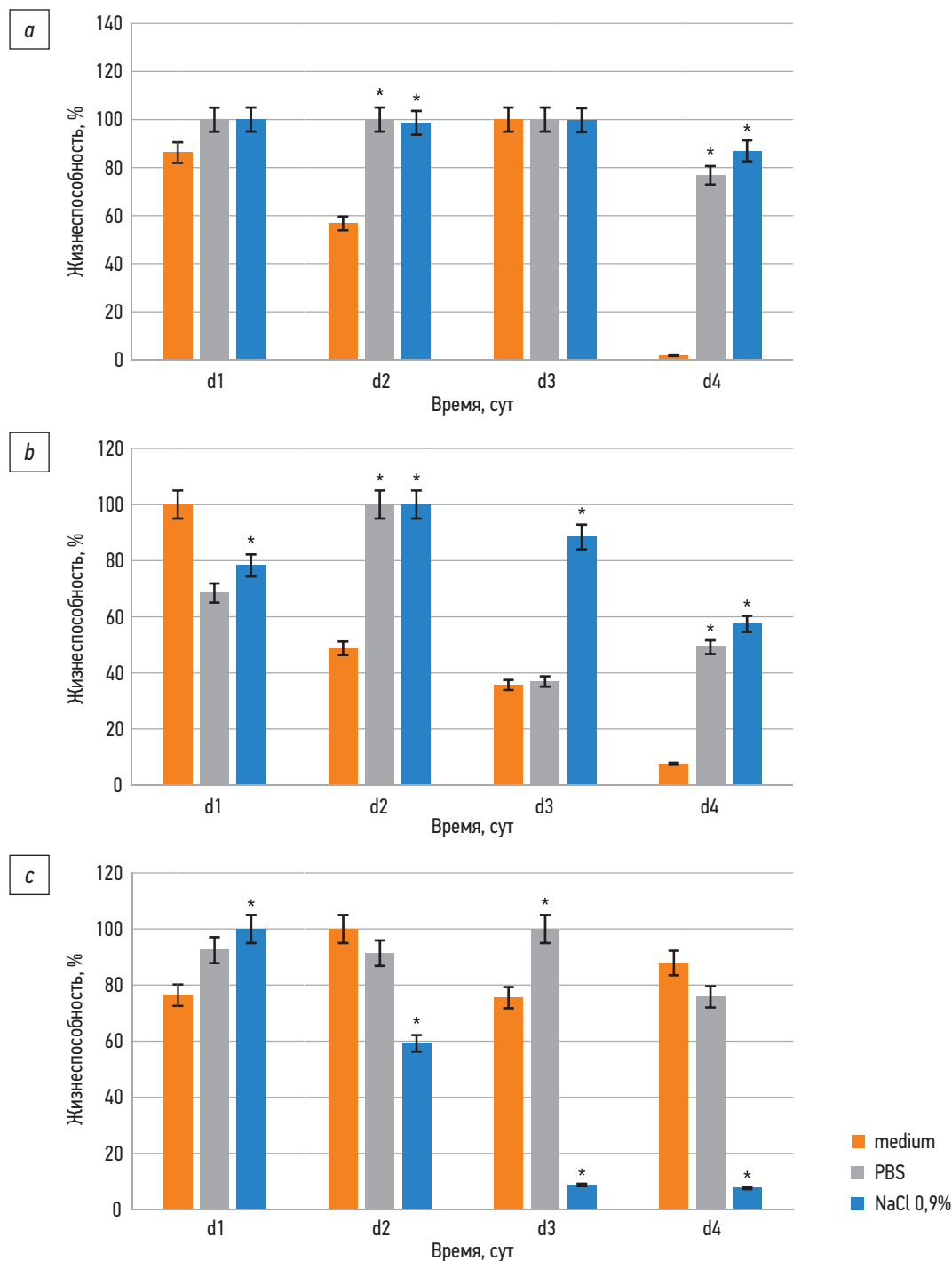


Рис. 3. Жизнеспособность образцов 3D хрящевого имплантата в динамике по времени в зависимости от температуры хранения и сред, % жизнеспособных клеток: *a* — при температуре +4 °C; *b* — при температуре +22 °C; *c* — при температуре +37 °C; d1 — первые сутки, d2 — вторые сутки, d3 — третьи сутки, d4 — четвёртые сутки; medium — питательная среда DMEM/F12, PBS — фосфатно-солевой буфер, 0,9% NaCl — физиологический раствор; * статистически значимые различия по сравнению с использованием среды medium, $p < 0,05$.

Fig. 3. Viability of 3D cartilage implant samples over time depending on storage temperature and media: *a* — at a temperature of +4 °C; *b* — at a temperature of +22 °C; *c* — at a temperature of +37 °C; d1 — first day, d2 — second day, d3 — third day, d4 — fourth day; medium — nutrient medium DMEM/F12, PBS — phosphate-buffered saline, 0.9% NaCl — physiological solution; * statistically significant differences compared to using the medium (medium), $p < 0.05$.

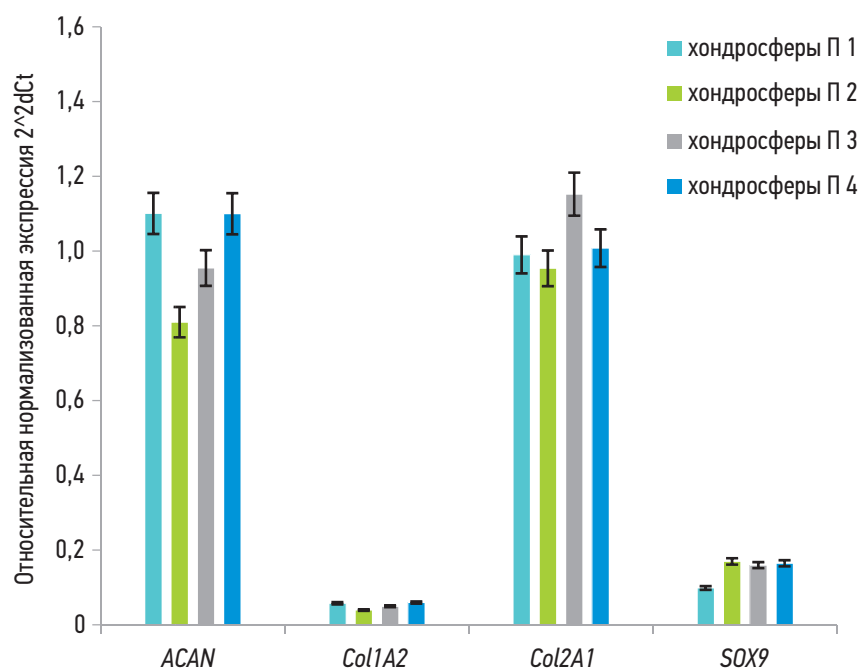


Рис. 4. Относительная нормализованная экспрессия хондрогенных маркеров в трёхмерных культурах хондроцитов (хондросферах), полученных из хондроцитов пациентов (П), после хранения в течение 4 сут в физиологическом растворе при температуре +4 °С.

Fig. 4. Relative normalized expression of chondrogenic markers in three-dimensional cultures of chondrocytes (chondrospheres) obtained from patient chondrocytes (П) after storage for 4 days in saline conditions at a temperature of +4 °С.

значимо выше жизнеспособность клеток при использовании PBS и физиологического раствора по сравнению с применением в качестве среды хранения питательной среды DMEM/F12. Причём данный эффект наблюдается как при +4 °С, так и при +22 °С.

Обнаружено, что образцы хондросфер лучше всего сохраняют жизнеспособность при +4 °С в физиологическом растворе. В указанных условиях препарат возможно хранить до четырёх суток. Однако при несоблюдении данного температурного режима наблюдается тенденция к снижению жизнеспособности через двое суток хранения (рис. 3, с). Данного периода времени вполне достаточно для транспортировки препарата до исследовательских центров, а также для проведения ряда контрольных исследований в рамках контроля качества.

Хранение образцов хондросфер при выбранном режиме (+4 °С в течение четырёх суток в физиологическом растворе) с последующим анализом с помощью ПЦР в режиме реального времени выявило сохранение экспрессии хондрогенных маркеров (рис. 4). Выявленное снижение экспрессии генов, кодирующих агрекан, коллаген I и II типов и SOX9, было статистически незначимо ($p > 0,05$).

ОБСУЖДЕНИЕ

Ранее показано [11], что культуры хондроцитов, полученные от доноров с различной степенью поражения суставного хряща, обладают разным хондрогенным потенциалом. В нашем случае клетки были получены от пациентов со схожей симптоматикой и сопоставимой тяжестью заболевания. Оценка экспрессии хондрогенных маркеров клетками показала, что культуры хондроцитов пациентов, формирующие сфероиды, обладают схожими характеристиками.

В работе [12] установлено, что суставные хондроциты, полученные от пациентов с остеоартрозом, демонстрируют «фенотипическую пластичность», сравнимую с мезенхимальными стволовыми клетками при дифференцировке в хондрогенном направлении. В исследовании [13] выявлено, что при развитии остеоартроза в хряще наблюдается увеличение количества клеток, экспрессирующих маркеры мезенхимальных клеток-предшественниц. Кроме того, при остеоартрозе наблюдается увеличение экспрессии генов, кодирующих такие компоненты внеклеточного матрикса, как коллаген I типа, что характерно в норме для волокнистого хряща [13]. В связи с этим клетки, полученные от пациентов для дальнейшего производства тканеинженерного препарата, должны подвергаться анализу синтетической активности и экспрессии основных хондроцитарных маркеров с целью подтверждения их фенотипа. Данные, полученные после проведения ПЦР, позволяют заключить, что такие характерные для хондроцитов маркеры, как агрекан, коллаген I и II типов, а также SOX9, стабильно экспрессируются культурами клеток. Кроме того, после перевода клеток в 3D-структуру экспрессия изучаемых маркеров сохраняется, что дополнительно подтверждает стабильность ключевых фенотипических показателей хондроцитов, из которых состоят 3D-конструкции.

Оценка жизнеспособности с помощью метаболического красителя PrestoBlue показала, что образцы хондросфер лучше всего сохраняют жизнеспособность при +4 °С до четырёх суток. Выявлено, что культуральная среда хуже подходит для хранения и транспортировки 3D-конструкций из хондроцитов. Следовательно, сфероиды следует транспортировать к месту применения в PBS или физиологическом растворе в течение ограниченного, но достаточного для доставки

в исследовательский или клинический центр периода времени — 2 сут (48 ч). Вероятно, следует ограничиться двумя сутками хранения клеточного препарата, поскольку во время транспортировки может наблюдаться длительное воздействие температуры на клетки, например при аварийных ситуациях. Согласно литературным данным, фактический срок годности многих лекарственных препаратов может быть продлён, однако этот показатель зависит от партии производства [14]. Кроме того, к настоящему моменту для препаратов на основе клеток проведено недостаточно исследований стабильности. Приведённые нами результаты будут использованы в дальнейших исследованиях данной клеточной технологии.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Оценка жизнеспособности сложнокомпонентных (в том числе тканеинженерных) клеточных препаратов при проведении анализа стабильности в различных условиях хранения может быть использована в будущих исследованиях подобных разработок. Подтверждение экспрессии хондрогенных маркёров является неотъемлемой частью контроля качества подобных тканеинженерных конструкций. Это важно, например, в доклинических/клинических исследованиях, когда запланирована длительная транспортировка хондросфер в другой город. В нашем случае приведённые данные позволяют говорить о стабильной жизнеспособности и функциональной активности, достаточной для транспортировки препарата тканевой инженерии на основе хондроцитов человека в течение не менее 2 сут.

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Благодарности. Авторы выражают свою признательность заведующей лабораторией клеточной биологии А.Н. Богомазовой (ФГБУ ФНКЦ ФХМ им. Ю.М. Лопухина ФМБА России) за критические замечания в отношении финальной версии рукописи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Мионов С.П., Омельяненко Н.П., Кон Е., и др. Классификация и методы лечения хрящевых дефектов // Вестник травматологии и ортопедии им. Н.Н. Приорова. 2008. № 3. С. 81–86. EDN: JTGGMH
2. Новоселов К.А., Куляба Т.А., Корнилов Н.Н., и др. Диагностика и лечение локальных повреждений хряща коленного сустава: пособие для врачей. Санкт-Петербург, 2004.
3. Kerzner B., Fortier L.M., Swindell H.W., et al. An update on the use of orthobiologics combined with corrective osteotomies for osteoarthritis: osteotomy site and intra-articular efficacy // Operative Techniques in Sports Medicine. 2022. Vol. 30, N 3. P. 150933. EDN: KEHCWP doi: 10.1016/j.jotsm.2022.150933
4. Ereemeev A., Belikova L., Ruchko E., et al. Brain organoid

Источник финансирования. Данная публикация выполнена в рамках государственного задания «Опора-2», номер государственного учёта НИОКТР 121101500075-7.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства международным критериям ICMJE (все авторы внесли существенный вклад в разработку концепции, проведение исследования и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию перед публикацией). Наибольший вклад распределён следующим образом: П.А. Голубинская — обзор литературы, сбор и анализ литературных источников, редактирование статьи; А.С. Пикина — выполнение культуральных работ; Е.С. Ручко — проведение лабораторных работ; А.В. Еремеев — финальное редактирование текста статьи, выполнение культуральных работ.

ADDITIONAL INFORMATION

Acknowledgments. We thank to the head of the laboratory of cell biology A.N. Bogomazova (Lopukhin Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine of Federal Medical Biological Agency) for critical comments on the final version of the manuscript.

Funding source. This publication was carried out within the framework of the state task “OPORA-2”, the state registration number of R&D 121101500075-7.

Competing interests. The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contribution. All authors confirm that their authorship meets the international ICMJE criteria (all authors have made a significant contribution to the development of the concept, research and preparation of the article, read and approved the final version before publication). The greatest contribution is distributed as follows: P.A. Golubinskaya — literature review, collection and analysis of literary sources, editing of the article; A.S. Pikina — performing cultural work; E.S. Ruchko — carrying out laboratory work; A.V. Ereemeev — final editing, performing cultural work.

- generation from induced pluripotent stem cells in home-made mini bioreactors // J Vis Exp. 2021. N 178. P. e62987. doi: 10.3791/62987
5. <https://www.ema.europa.eu/> [Internet]. CHMP assessment report. Spherex Common name: spheroids of human autologous matrix-associated chondrocytes Procedure No. EMEA/H/C/002736/0000 2017. Режим доступа: https://www.ema.europa.eu/en/documents/assessment-report/spherex-epar-public-assessment-report_en.pdf Дата обращения: 28.11.2023.
6. Еремеев А.В., Пикина А.С., Ручко Е.С., и др. Получение хрящеподобных структур из стволовых клеток с индуцированной плюрипотентностью // Медицина экстремальных ситуаций. 2022. № 4. С. 31–42. EDN: WKQYHL doi: 10.47183/mes.2022.037

7. Shajib M.S., Futrega K., Franco R.A.G., et al. Method for manufacture and cryopreservation of cartilage microtissues // *J Tissue Eng.* 2023. Vol. 14. P. 20417314231176901. doi: 10.1177/20417314231176901
8. Еремеев А.В., Пикина А.С., Владимирова Т.В., Богомазова А.Н. Методы оценки жизнеспособности клеток, культивируемых in vitro в 2D- и 3D-структурах // *Гены и Клетки.* 2023. Т. 18, № 1. С. 5–21. EDN: XDGEIA doi: 10.23868/gc312198
9. Еремеев А.В., Воловиков Е.А., Шувалова Л.Д., и др. «Голь на выдумки хитра», или дешевый, надежный и воспроизводимый способ получения органоидов // *Биохимия.* 2019. Т. 84, № 3. С. 448–456. EDN: YZLVEL doi: 10.1134/S032097251903014X
10. <https://assets.thermofisher.com/> [Internet]. PrestoBlue® Cell Viability Reagent Documentation. Режим доступа: <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/PrestoBlueFAQ.pdf> Дата обращения: 27.11.2023.
11. Bekkers J.E., Saris D.B., Tsuchida A.I., et al. Chondrogenic potential of articular chondrocytes depends on their original location // *Tissue Eng Part A.* 2014. Vol. 20, N 3-4. P. 663–671. doi: 10.1089/ten.TEA.2012.0673
12. Tchetina E.V., Squires G., Poole A.R. Increased type II collagen degradation and very early focal cartilage degeneration is associated with upregulation of chondrocyte differentiation related genes in early human articular cartilage lesions // *J Rheumatol.* 2005. Vol. 32, N 5. P. 876–886.
13. Grogan S.P., Miyaki S., Asahara H., et al. Mesenchymal progenitor cell markers in human articular cartilage: normal distribution and changes in osteoarthritis // *Arthritis Res Ther.* 2009. Vol. 11, N 3. P. R85. doi: 10.1186/ar2719
14. Lyon R.C., Taylor J.S., Porter D.A., et al. Stability profiles of drug products extended beyond labeled expiration dates // *J Pharm Sci.* 2006. Vol. 95, N 7. P. 1549–1560. doi: 10.1002/jps.20636

REFERENCES

1. Mironov SP, Omel'yanenko NP, Kon E, et al. Classification and methods of treatment of cartilage defects. *N.N. Priorov Journal of Traumatology and Orthopedics.* 2008;(3):81–86. EDN: JTGGMH
2. Novoselov KA, Kulyaba TA, Kornilov NN, et al. *Diagnosis and treatment of local damage to the cartilage of the knee joint: a manual for doctors.* Saint Petersburg; 2004. (In Russ).
3. Kerzner B, Fortier LM, Swindell HW, et al. An update on the use of orthobiologics combined with corrective osteotomies for osteoarthritis: osteotomy site and intra-articular efficacy. *Operative Techniques in Sports Medicine.* 2022;30(3):150933. EDN: KEHCWP doi: 10.1016/j.otsm.2022.150933
4. Eremeev A, Belikova L, Ruchko E, et al. Brain organoid generation from induced pluripotent stem cells in home-made mini bioreactors. *J Vis Exp.* 2021;(178):e62987. doi: 10.3791/62987
5. <https://www.ema.europa.eu/> [Internet]. CHMP assessment report. Spherex Common name: spheroids of human autologous matrix-associated chondrocytes Procedure No. EMEA/H/C/002736/0000 2017 [cited: 2023 Nov 11]. Available from: https://www.ema.europa.eu/en/documents/assessment-report/spherex-epar-public-assessment-report_en.pdf
6. Eremeev AV, Pikina AS, Ruchko ES, et al. Fabrication of cartilage tissue substitutes from cells with induced pluripotency. *Medicine of Extreme Situations.* 2022;(4):31–42. EDN: WKQYHL doi: 10.47183/mes.2022.037
7. Shajib MS, Futrega K, Franco RAG, et al. Method for manufacture and cryopreservation of cartilage microtissues. *J Tissue Eng.* 2023;14:20417314231176901. doi: 10.1177/20417314231176901
8. Eremeev AV, Pikina AS, Vladimirova TV, Bogomazova AN. Methods for assessing the viability of cells cultured in vitro in 2D and 3D structures // *Genes & cells.* 2023;18(1):5–21. EDN: XDGEIA doi: 10.23868/gc312198
9. Eremeev AV, Volovikov EA, Shuvalova LD, et al. "Necessity is the mother of invention" or inexpensive, reliable, and reproducible protocol for generating organoids. *Biokhimiya.* 2019;84(3):448–456. EDN: YZLVEL doi: 10.1134/S032097251903014X
10. <https://assets.thermofisher.com/> [Internet]. PrestoBlue® Cell Viability Reagent Documentation [cited: 2023 Nov 11]. Available from: <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/PrestoBlueFAQ.pdf>
11. Bekkers JE, Saris DB, Tsuchida AI, et al. Chondrogenic potential of articular chondrocytes depends on their original location. *Tissue Eng Part A.* 2014;20(3-4):663–671. doi: 10.1089/ten.TEA.2012.0673
12. Tchetina EV, Squires G, Poole AR. Increased type II collagen degradation and very early focal cartilage degeneration is associated with upregulation of chondrocyte differentiation related genes in early human articular cartilage lesions. *J Rheumatol.* 2005;32(5):876–886.
13. Grogan SP, Miyaki S, Asahara H, et al. Mesenchymal progenitor cell markers in human articular cartilage: normal distribution and changes in osteoarthritis. *Arthritis Res Ther.* 2009;11(3):R85. doi: 10.1186/ar2719
14. Lyon RC, Taylor JS, Porter DA, et al. Stability profiles of drug products extended beyond labeled expiration dates. *J Pharm Sci.* 2006;95(7):1549–1560. doi: 10.1002/jps.20636

ОБ АВТОРАХ

* **Голубинская Полина Александровна**, канд. мед. наук;
адрес: Россия, 119435, Москва, ул. Малая Пироговская, д. 1а;
ORCID: 0000-0002-1765-9042;
eLibrary SPIN: 5299-9693;
e-mail: polinapigeon@gmail.com

AUTHORS' INFO

* **Polina A. Golubinskaya**, MD, Cand. Sci. (Medicine);
address: 1a Malaya Pirogovskaya street, 119435 Moscow, Russia;
ORCID: 0000-0002-1765-9042;
eLibrary SPIN: 5299-9693;
e-mail: polinapigeon@gmail.com

Пикина Арина Сергеевна;

ORCID: 0000-0002-8967-2318;

eLibrary SPIN: 8654-7318;

e-mail: arina.pikina@yandex.ru

Ручко Евгений Сергеевич;

ORCID: 0000-0002-1361-666X;

eLibrary SPIN: 7220-6031;

e-mail: ruchkoevgeny@yandex.ru

Еремеев Артём Валерьевич, канд. биол. наук;

ORCID: 0000-0002-3428-7586;

eLibrary SPIN: 4825-5440;

e-mail: art-eremeev@yandex.ru

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author

Arina S. Pikina;

ORCID: 0000-0002-8967-2318;

eLibrary SPIN: 8654-7318;

e-mail: arina.pikina@yandex.ru

Evgenii S. Ruchko;

ORCID: 0000-0002-1361-666X;

eLibrary SPIN: 7220-6031;

e-mail: ruchkoevgeny@yandex.ru

Artem V. Eremeev, Cand. Sci. (Biology);

ORCID: 0000-0002-3428-7586;

eLibrary SPIN: 4825-5440;

e-mail: art-eremeev@yandex.ru