

**Министерство здравоохранения Российской Федерации**  
**Государственное бюджетное образовательное учреждение**  
**высшего профессионального образования**  
**Первый Московский государственный медицинский**  
**университет им. И. М. Сеченова**  
**Образовательный департамент**  
**Института фармации и трансляционной медицины**  
**Кафедра фармацевтической технологии**

**НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКАЯ РАБОТА**

**Разработка модели биомедицинского клеточного препарата для**  
**терапии остеоартрита коленного сустава**

*Направление подготовки*

*33.05.01 «Фармация»*

*Квалификация - «Провизор»*

*Специализация – «Трансляционная медицина»*

*Форма обучения: очная*

Выполнил (а):  
студент 5 курса 15 группы  
Магданов Азат Маратович

РАБОТА ВЫПОЛНЕНА НА КАФЕДРАХ:

КАФЕДРА ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЙ ТЕХНОЛОГИИ

Зав. кафедрой, профессор, д.ф.н. – Краснюк И.И.

ИНСТИТУТ РЕГЕНЕРАТИВНОЙ МЕДИЦИНЫ

Директор, д.х.н. – Тимашев П.С.

КАФЕДРА ТРАВМАТОЛОГИИ, ОРТОПЕДИИ И

ХИРУРГИИ КАТАСТРОФ

Зав. кафедрой, профессор, д.м.н. – Лычагин А.В.

НАУЧНЫЙ РУКОВОДИТЕЛЬ:

Доцент, руководитель образовательного департамента, к.ф.н. – Король Л.А.

НАУЧНЫЕ СО-РУКОВОДИТЕЛИ:

Доцент, ведущий научный сотрудник, к.б.н. – Шпичка А.И.

Доцент, врач-травматолог-ортопед, к.м.н. – Липина М.М.

**Допущен(а) к защите**

« \_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2016 г.

\_\_\_\_\_ (подпись)

Руководитель

Доцент, руководитель образовательного департамента, к.ф.н.

Король Л.А.

## Оглавление

АННОТАЦИЯ.....	4
Введение.....	5
Глава 1. Остеоартрит с точки зрения здравоохранения.....	8
1.1 Эпидемиология остеоартрита.....	8
1.2 Структура остеохондральной ткани коленного сустава.....	8
1.3 Патофизиология и клиническая картина.....	12
1.4 Подходы к терапии остеоартрита.....	13
1.4.1 Здоровый образ жизни и физиотерапия.....	14
1.4.2 Медикаментозное неинвазивное лечение.....	14
1.4.3 Медикаментозное инвазивное лечение.....	16
1.4.4 Инновационные медикаментозные терапии.....	17
1.4.5 Хирургическая стимуляция регенерации.....	20
1.4.6 Протезирование.....	21
Глава 2. Особенности нормативно-правовой базы РФ для разработки и регистрации БМКП для терапии остеоартрита.....	27
2.1 Требования к организации производственного процесса.....	27
2.2 Требования к контролю этапов производства БМКП.....	30
2.2.1 Неклеточные компоненты БМКП.....	31
2.2.2 Клеточный компонент БМКП.....	34
2.2.3 Готовый продукт.....	38
Глава 3. Практическая часть – разработка модели БМКП для терапии остеоартрита коленного сустава.....	40
3.1 Выбор клеточной линии.....	40
3.2 Моделирование строения ориентированных волокон хряща.....	43
3.3 Выбор метода пересаживания донорских клеток.....	47
3.4 Изучение требуемых характеристик к биочернилам.....	49
3.5 Дальнейший план экспериментов.....	53
Выводы.....	55
Библиография.....	57

## АННОТАЦИЯ

Тема научно-исследовательской работы (НИР) «Разработка модели биомедицинского клеточного препарата для терапии остеоартрита коленного сустава».

Данная НИР посвящена проблеме развития эффективных регенеративных подходов для лечения остеоартрита коленей. В рамках работы раскрываются предрасположенности и некоторые особенности развития заболевания, а также представлен поиск материалов и методов, которые можно использовать при разработке модели биомедицинского клеточного продукта для терапии поздних стадий остеоартрита. Работа состоит из трех глав.

В первой главе рассматриваются теоретические аспекты выбранной темы. В частности, раскрывается эпидемиология и патогенез заболевания, общее строение сустава, а также основные направления терапии, распространенные на данный момент.

Во второй главе разбирается нормативно-правовая база Российской Федерации в отношении разработки и регистрации биомедицинских клеточных препаратов.

Третья глава посвящена экспериментальной работе по разработке модели биомедицинского препарата, анализу полученных первичных результатов. В частности, представлен пример материалов, разрешенных к использованию на территории РФ для производства БМКП, предложен донорный материал клеток и продемонстрированы результаты первичных экспериментов по структуре коллагеновой матрицы и свойств биочернил на основе гиалуроновой кислоты.

Общий объем работы составляет 67 страниц. Научно-исследовательская работа содержит 9 рисунков. В ходе написания работы было использовано 134 литературных источника, в том числе 116 иностранных.

## Введение

**Актуальность** изучения и разработки ткане-инженерных конструктов состоит в том, что, хотя подходы к лечению остеоартрита активно развиваются последние 50 лет, в целом прогноз качества жизни пациентов всё еще неблагоприятен. [1] Традиционными инвазивными методами усиления регенерации невозможно получить полную реституцию хряща, так как эти методы приводят к восстановлению хряща через фиброзную стадию, а имплантация современных инертных протезов улучшает качество жизни незначительно, и срок их годности не удовлетворяет требованиям. [2] В то же время медикаментозные подходы, которые показывают свою эффективность на ранних этапах развития заболевания, не исправляют первопричину появления остеоартрита и способны лишь замедлить дегенеративные процессы. [3] Помимо этого, активные исследования в области создания биомедицинских клеточных продуктов (БМКП) стимулируются тем, что к отрасли BiotechMed привлечено огромное внимание финансового рынка – на нее приходится порядка трети всех венчурных инвестиций в 2019 году.[4]

Необходимость изучения БМКП на основе мезенхимальных стволовых клеток, помещенных на коллагеново-гиалуроновый матрикс обусловлена тем, что МСК являются одним из наиболее удобных донорских материалов, а гиалуроновая кислота и коллаген присутствуют в нативном хряще, тем самым снимая часть проблем, таких как иммуногенность и биоразлагаемость, которые свойственны имплантатам из других веществ.

На данный момент в мире существует крайне скудное число медицинских препаратов, одобренных для регенеративной терапии остеоартрита. Хотя в Российской Федерации сейчас не зарегистрировано ни одного биомедицинского клеточного продукта или аналогичной технологии, предназначенной для восстановления дефекта сустава, компания «Генериум» проводит

доклинические испытания аутологичного БМКП GNR-079, заявленного как хрящевой имплантат. [5]

**Цель:** предложить модель для разработки нового биомедицинского клеточного продукта, удовлетворяющего нормативно - правовой базе Российской Федерации и актуальным научным тенденциям в области регенерации остеохондральной ткани.

**Для реализации поставленной цели нами решались следующие задачи:**

1. Описать остеоартрит с точки зрения эпидемиологии и патогенеза
2. Описать устройство суставного хряща
3. Представить основные направления терапии, существующие на данный момент
4. Определить основные преимущества использования биомедицинских клеточных продуктов
5. Проанализировать нормативно-правовую базу РФ для определения требований к дизайну разработки и производства БМКП
6. Изучить различные варианты клеточных ресурсов, используемых для регенерации хрящевого дефекта, с целью поиска оптимального источника клеток
7. Исследовать необходимые характеристики биочернил на основе гиалуроновой кислоты для биопечати модели имплантата
8. Исследовать необходимые характеристики для коллагеновой матрицы, выступающей матриксом для имплантата

**Для решения поставленных задач будут использованы следующие методы:**

- Сбор научной литературы
- Анализ нормативно-правовой базы в области регистрации медицинских продуктов, в том числе биомедицинских клеточных препаратов
- Экспериментальная работа с использованием методов культивирования стволовых клеток, определения физико-химических характеристик биочернил,

определение физико-химических характеристик коллагенового матрикса, метаболической активности и цитотоксичности биочернил по отношению к выбранной культуре клеток

# Глава 1. Остеоартрит с точки зрения здравоохранения

## 1.1 Эпидемиология остеоартрита

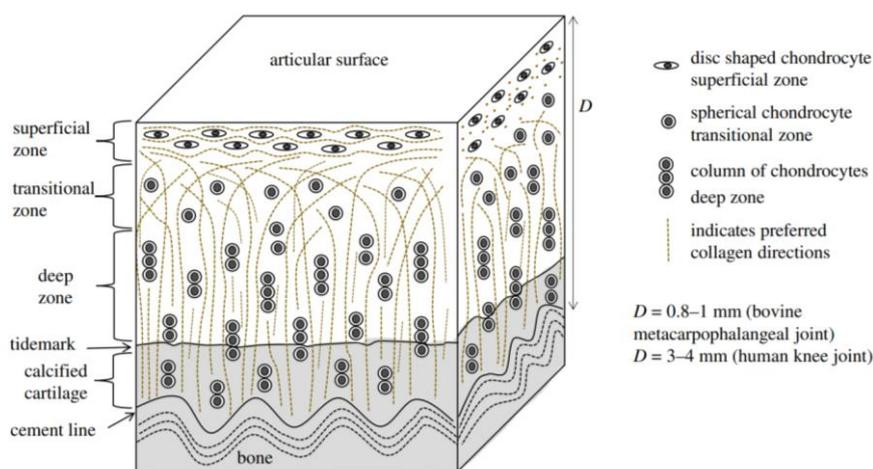
По количеству пациентов, ортопедические заболевания занимают 2 место в мире [6]. Наиболее распространенным можно считать остеоартрит, занимающий 4 строчку [7] в общемировом зачете: от него страдает 9.6% мужчин и 18% женщин старше 60 лет. [8] 80% пациентов обладают ограниченной подвижностью, четверть из которых вынуждены вести неактивный образ жизни. [9] Эпидемиологические исследования показывают, что существует закономерность: частота артрита на 58% выше у женщин, чем у мужчин. У женщин протекание заболевания сопровождается более выраженными болями и, в целом, прогноз течения заболевания менее благоприятный. [10]

В факторы риска развития остеоартрита можно отнести пол, расу/этнос, степень подвижности суставов, ожирение, перенесенные травмы колен и возраст. В пожилом возрасте учащаются случаи повреждения хряща, что признано ранним фактором необратимой дегенерации сустава. [11]

## 1.2 Структура остеохондральной ткани коленного сустава

Суставной хрящ покрывает концы костей и внутреннюю поверхность коленной чашечки в коленном суставе. Он представляет собой резиноподобное вещество, обычно очень гладкое, способствует плавным движениям суставов без трения, а также действует как амортизатор. [12] Ткань состоит из двух частей – субхондриальной кости и суставного хряща. Кость состоит из субхондральной костной пластинкой и кальцифицированной суставной зоны, которая продолжается до перехода непосредственно в хрящевую ткань. Зону перехода между костной и хрящевой тканями принято называть *tidemark*. Хрящ можно разделить на три структуры: радиальная/глубокая зона, которая находится на контакте с *tidemark*, средняя зона и поверхностная зона, находящаяся в контакте с синовиальной жидкостью.

Остеохондральная ткань характеризуется высотой около 3 мм у взрослых, 90% которых состоит из суставного хряща, еще 5% состоит из кальцифицированной суставной зоны (CCZ), а оставшиеся 5% - субхондральная костная пластинка. Субхондральная кость функционирует для поддержания стабильности суставного хряща и в эпифизе имеет характеристики, сравнимые с трабекулярной костью: объемная доля кости в диапазоне от 6% до 36%, толщина трабекулы 100–190 мкм. - трабекулярная концентрация в диапазоне от 0,61 до 2,06 трабекул/мм, а расстояние между ними - в диапазоне 320–1670 мкм. Кальцифицированная зона же выполняет транзитные функции между тканями, а также запасом фосфатов и минералов. В процессе формирования взрослого суставного хряща коллаген 2 типа заменяется на коллаген 10. CCZ придает хорошую адгезию на соединении между костью и хрящом, более того, из субхондриальной кости происходит сосудистая инвазия и поступление новых клеток. В частности, костная ткань содержит крайне малые количества МСК (0.002%) – из них возможна дифференцировка как в остеобласты, так и в хондроциты. [13]



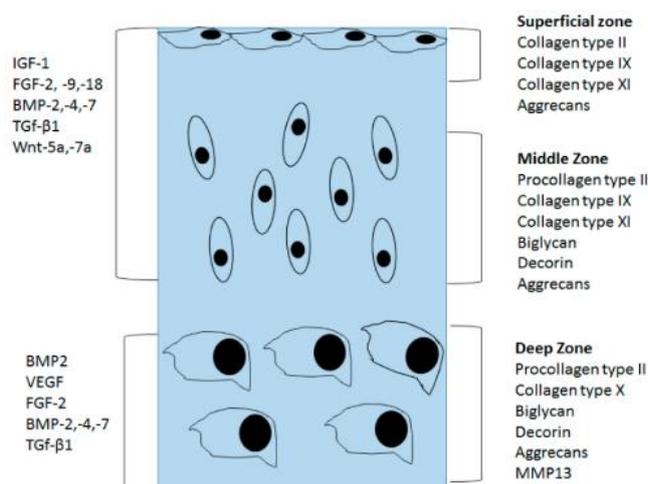
**Схематичное изображение остеохондральной ткани.**

**Источник [14]**

**Рисунок 1.1**

Хрящевая ткань слабо иннервируемая, в основном состоит из хондроцитов и продуцируемого ими внеклеточного матрикса. Хондроциты представляют только 1-2 % объема ткани. 60% сухого веса хряща – это коллаген, еще 5-10% занимает протеогликан. Среди различных типов коллагена 2 тип составляет 80%. Остальные изоформы составляют, включая 9 и 11 (15%). Агрекан, важнейшая часть протеогликана, и коллаген 2 типа определяют свойства сустава, их истощение является важным маркером развития ОА. Коллаген в норме наматывается на цепочки из агрекана в состав которого входят глюкозамины хондроитин и кератин сульфаты. [15]

В нормальном суставном хряще взрослого человека сеть коллагеновых фибрилл состоит из трех отдельных слоев: поверхностной зоны, где фибриллы в основном параллельны поверхности хряща; средняя зона, где фибриллы распределены относительно случайно; и глубокая зона, где фибриллы в основном ориентированы перпендикулярно поверхности хряща. В нормальных суставах эта коллагеновая сеть действует как структурный каркас ткани, обеспечивая основной источник прочности на растяжение и сдвиг. В пораженных суставах организация и расположение коллагеновой сети имеет важное значение для характеристики изменений во внеклеточном матриксе, которые связаны с патогенезом остеоартрита.[16] Коллагеновые фибриллы обычно имеют диаметр 30-200 нм [17] Механические свойства хряща сильно зависят от организации коллагеновых фибрилл. При растягивающей нагрузке хрящ намного жестче в поверхностной зоне по сравнению с глубокой зоной, кроме того, он намного жестче в направлении, параллельном линиям расщепления. [16] Модуль растяжения также варьируется между областями, несущими большую нагрузку, и уменьшается с остеоартритной дегенерацией и возрастом.[17]



### Схематичное распределение клеток и метаболитических маркеров.

Источник[18]

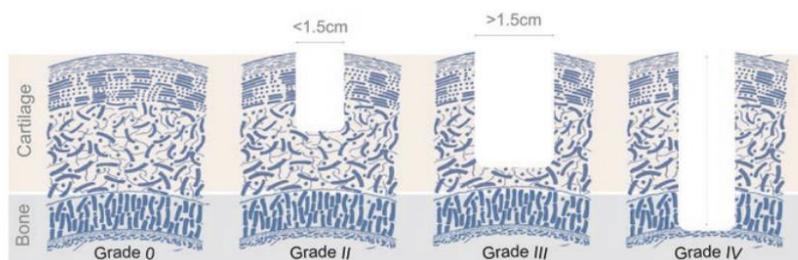
Рисунок 1.2

Хондроциты организованы в капсульные структуры, известные как хондроны, состоящие как из отдельных клеток в поверхностной и переходной так и лакун, содержащих от 5-7 до нескольких десятков хондроцитов. [19] Капсула состоит из протеогликанов, синдианов, глипиканов и коллагена 6 типа, которые «заякоривают» клетки в ЕСМ. Трансмембранные белки также участвуют в прикреплении хондроцита к его перицеллюлярному пространству, включая анхорин-СII, который взаимодействует с клетками, обладающими коллагеном II типа, и интегрин, которые связывают хондроциты с молекулами коллагена. Хондроциты ответственны за поддержание гомеостаза ЕСМ, однако и природа ЕСМ влияет на фенотип клеток. В случае деградации матрикса клетки проходят дедифференцировку или начинают гиперэкспрессию других форм коллагена, превращая суставной хрящ в фиброзный.

Хондроциты не делятся и обладают очень слабой апоптотической активностью. С возрастом активность самих клеток снижается.[15] Питательные вещества, в основном, поступают путем диффузии из субхондриального пространства и синовиальной жидкости, чему способствуют гидрофильные свойства среды. Предполагается, что градиент концентрации кислорода

варьируется в зависимости от слоя от 10 до 1 процента. В таких условиях метаболизм глюкозы идет по анаэробному пути. [20]

### **1.3 Патофизиология и клиническая картина**



#### **Стадии развития остеоартрита по Международной системе оценки повреждения сустава (ICRS)**

**Источник[12]**

#### **Рисунок 1.3**

Остеоартрит начинается с воспалительного процесса. На микроскопическом уровне суставной хрящ теряет агрегацию протеогликана и испытывает отек, что приводит к гипертрофии. Пытаясь регенерировать внеклеточный матрикс, хондроциты гиперпродукуют синтез коллагена типов II, IX, IV и XI, агрекана, что приводит к образованию фибриллов, истощением матрикса, потерей нативных протеогликанов. [21]Этим обуславливается то, что восстановление хряща после травмы и заболевания часто приводит к образованию фибриллярного хряща, а не гиалинового. [22] Разрушение протеогликанов приводит к снижению жесткости ткани при сжатии, что ускоряет скорость потери коллагена. Коллаген типа II, высвобождаемый из поврежденного хряща, стимулирует дальнейшую активацию MMP посредством фосфорилирования взаимодействующего с DDR-2 белка аннексина A2, тем самым инициируя еще один раунд дегенерации хряща. [23]

Когда хондроциты обнаруживают повреждение тканей, то высвобождают медиаторы, которые стимулируют клеточный ответ, состоящий из активации

анаболической и катаболической активности, а также пролиферации хондроцитов. В ответ на этот стресс пролиферирующие хондроциты увеличивают синтез ЕСМ и выделяют химические медиаторы, такие как оксид азота, который диффундирует и может индуцировать выработку IL-1.[9] IL-1 в свою очередь способен индуцировать экспрессию MMPs, агреканызы и других катаболических цитокинов, таких как адизинтегрин и металлопротеиназа тромбоспондина типа 1 ADAMTS-4 и ADAMTS-5. Экспрессия MMP, особенно MMP-13 и MMP-3, запускает деградацию коллагенов II и IX и, в конечном счете, нарушение фибриллярной функции. IL-1 и TNF повышают синтез простагландина E2 через стимуляцию ЦОГ 2, микросомальную PGE2-синтазу-1 и растворимую фосфолипазу A2. Кроме того, IL-1 индуцирует высвобождение IL-6, IL-17, IL-18, IL-8 и лейкоцитарного ингибирующего фактора (ЛИФ). Гиперсекреция оксида азота хондроцитами и гибель хондроцитов способствует образованию остеофицитов - клеток, экспрессирующих проколлаген типа I и типа IIА. [18] Поверхностная зона разрушается, и потеря агрекана из-за ферментативного расщепления увеличивает нагрузку на оставшуюся коллагеновую сеть фибрилл и хондроциты. [21]

Третий этап возникает, когда снижение анаболического и пролиферативного ответа хондроцитов приводит к прогрессирующей потере суставного хряща. В конечном итоге анаболический ответ суставного хряща снижается, а дисбаланс между синтетической активностью хондроцитов и деградационной активностью приводит к прогрессирующему истончению суставного хряща. Постепенно процесс захватывает всё новые ткани, расширяясь как по суставному ложу, так и в глубь сквозь субхондральный слой.

#### ***1.4 Подходы к терапии остеоартрита***

В настоящее время нет общедоступных методов лечения, способных полностью остановить и обратить вспять прогрессирование заболевания. В случае травмы сустава, вмешательства должны быть предприняты как можно

скорее, чтобы ограничить степень повреждения сустава и уменьшить тяжесть ОА. Выбор лечения зависит от интенсивности воздействия. Ниже представлены основные направления терапии и профилактики, которые используются на данный момент.

#### ***1.4.1 Здоровый образ жизни и физиотерапия***

Предохранение от нагрузки на поврежденные суставные поверхности после травмы, чтобы избежать отслоения фрагментов хряща. При этом необходимо избегать длительной жесткой иммобилизации. [24] Причиной такой рекомендации служит особенность функционирования. Передатчиком сигналов механического воздействия в клетку является перицеллюлярный матрикс, содержащий коллаген 6 типа, который передавать механический импульс клетке за счет механотрансдукции ионных каналов клеток. [25] Известно, что умеренная физическая нагрузка индуцирует пролиферацию и экспрессию хондрогенных генов [26], что, в свою очередь, помогает поддерживать нормальную функцию ткани.

Потеря веса и физические упражнения у людей с ожирением и избыточным весом. Эпидемиологические наблюдения утверждают, что люди с индексом массы тела выше нормы в большей степени подвержены риску развития тяжелых форм остеоартрита. Интересно, что данная зависимость в значительной мере ярче выражена среди мужчин.

Также высокую эффективность на ранних этапах развития заболевания показывает криотерапия, которая достоверно уменьшает болевые ощущения и снимает острый воспалительный процесс. [27]

#### ***1.4.2 Медикаментозное неинвазивное лечение***

На ранних стадиях ОА боль и ригидность преобладают над другими симптомами, и поэтому цель лечения состоит в том, чтобы уменьшить боль и физическую нетрудоспособность. [24]

Препараты условно подразделяются на две группы[3]:

-симптоматические препараты медленного действия при остеоартрозе (SYSADOA);

-модифицирующие заболевание препараты от остеоартрита (DMOAD), также известные как хондропротекторы или нутрицевтики;

Препараты SYSADOA являются в основном анальгетиками. Они минимизируют или устраняют боль и снижают рефлекторный мышечный тонус. Они включают два типа веществ: стероидные и нестероидные противовоспалительные препараты (НПВП). Паллиативная помощь с использованием болеутоляющих или противовоспалительных препаратов может только облегчить симптомы суставного хряща, не решая определенно причины, связанные с началом и прогрессированием заболевания. [3], [28]

На рынке сейчас существует большое разнообразие препаратов с самыми разными лекарственными формами. Одним из самых эффективных можно считать внутрисуставную инъекции глюкокортикоидов, которые крайне эффективны при обострениях остеоартрита. Кроме того, изолированная природа суставной сумки повышает эффективность данных процедур за счет исключительно местного воздействия и долгого сохранения терапевтических концентраций. [24]

Вещества, относящиеся к DMOAD, вводятся для того, чтобы помочь восстановлению поврежденного межклеточного вещества в суставном хряще и предотвратить эффекты ферментов, разрушающих матрикс. При этом препараты также уменьшают тяжесть клинических состояний и боли. Трудно определить, в какой степени их действие является чисто симптоматическим и в какой степени они фактически ингибируют процесс заболевания. К подобным препаратам относятся цитрат марганца, полисульфат пентозана, ДМСО, супероксиддисмутаза (СОД), биофлавоноиды, метилсульфонилметан и омега-3 жирные кислоты. Следует отметить, что, по данным Североамериканского

совета по нутрицевтике, хондропротекторы представляют собой немедикаментозные вещества, производимые в очищенной форме или в виде экстрактов, вводимые перорально и содержащие ингредиенты, способствующие структурному и функциональному здоровью организма. Они регулируются менее строгими фармацевтическими правилами по сравнению с лекарственными препаратами и, в основном, продаются без рецепта. [29], [30]

### ***1.4.3 Медикаментозное инвазивное лечение***

Самыми известными препаратами, которые применяются с целью восстановления структуры хряща путем инъекции в суставную сумку, являются сульфат глюкозамина, сульфат хондроитина и гиалуроновая кислота. Исследования глюкозамина показали, что глюкозамина сульфат является эффективным анальгетиком, обезболивающее действие которого длится гораздо дольше, чем у нестероидных лекарств. Кроме того, он помогает ингибировать развитие дегенеративного заболевания, которое измеряется радиологически с точки зрения его эффекта замедления сужения суставного пространства в коленных суставах человека. [31] В то время как комбинированный глюкозамин и хондроитинсульфат не продемонстрировали превосходства над плацебо в снижении боли и нарушения функции, эти препараты вместе с НПВП действительно показали значительное снижение потери хряща в поздних стадиях ОА. Дальнейшие исследования явно необходимы для определения клинической значимости такой комбинированной терапии. [9]

В то же время, гиалуроновая кислота обладает неоднозначной эффективностью при использовании для внутрисуставных инъекций для лечения ОА коленного сустава и ее применение в качестве монотерапии не рекомендовано. [24] Гиалуроновая кислота в синовиальной жидкости отвечает за трибологические качества. [32] Инъекция ее извне предназначена для повышения вязкости синовиальной оболочки, что, в свою очередь, обеспечивает более эффективное распределение питательных веществ в суставном хряще и

улучшает двигательную активность сустава. Однако, в литературе отсутствуют конкретные рекомендации относительно оптимального количества инъекций, дозировки и наиболее эффективного состава вводимого препарата. [33]

Также, в качестве терапии иногда проводят пункции промывание суставов с использованием 0,9% раствора изотонической соли. Было высказано предположение, что лаваж позволяет высвобождать поверхностные протеогликаны, которые могут замедлять репаративные процессы. [34] Многолетнее наблюдение за пациентами после применения вышеперечисленных методов подтвердило их благотворное влияние. Через 14 месяцев наблюдения улучшение наблюдалось у 74% из 78 пациентов. Кроме того, в течение четырехлетнего наблюдения за 109 пациентами, положительные результаты были зарегистрированы у 63%, а плохие результаты у 37% пациентов. [33]

Другие современные методы лечения включают инъекцию фактора роста тромбоцитов в виде плазмы, обогащенной тромбоцитами (PRP). Концентрат тромбоцитов получают и концентрируют путем центрифугирования собственной цельной крови пациента. Фибрин, присутствующий в плазме, и адгезивные частицы, служат носителями для тромбоцитов. Тромбоциты активно участвуют в большинстве процессов заживления в организме. Они особенно богаты факторами роста и цитокинами, которые положительно влияют на пролиферацию и дифференцировку различных типов клеток. [35] Они высвобождаются из  $\alpha$ -гранул тромбоцитов под воздействием тромбина, коллагена или механических факторов. [33] Развитием этой технологии является терапия ортокинами, которую применяют с 1998 года. Используется собственная сыворотка крови пациента. В ходе ее обработки антагонист рецептора провоспалительного интерлейкина 1 (IL-1Ra) и факторы роста разделяются и концентрируются. Такая сыворотка называется аутологичной кондиционированной сывороткой (ACS).

#### ***1.4.4 Инновационные медикаментозные терапии***

На данный момент многочисленные научные группы по всему миру занимаются поиском более эффективных подходов не только к остановке прогрессирования заболевания, но и к полноценной регенерации поврежденной суставной поверхности и восстановлению нативных функций. Для медицинской практики наличие таких исследований, хотя и представляет некоторый интерес, еще недостаточно для того, чтобы с уверенностью сказать о большой перспективе повсеместного применения.

К одним из таких подходов относится ингибирование медиаторов воспаления или прерывание внутриклеточных сигнальных путей моноклональными антителами. Показано, что среди нескольких mAb против ADAMTS-5 наиболее изученные mAb 12F4.1H7 специфически подавляют индуцированное ADAMTS-5 высвобождение ARGS-aggrecan, медленную деградацию хряща и образование остеофитов. [36], [37] Развитие mAb, способных распознавать как ADAMTS-4, так и -5, обладают огромным потенциалом для разработки в будущем целенаправленной терапии. [9]

Активно развивается поиск методами хемоинформатики малых молекул, которые могут выступать ингибиторами метаболических путей, задействованных в патофизиологии остеоартрита. Ингибитор пути NF-κB, BAY11-7082, восстанавливает ингибированный IL-1β хондрогенез стволовых клеток хряща и задерживает прогрессирование остеоартрита в экспериментах на. Ингибиторы передачи сигналов Wnt / β-catenin PKF115-584, PKF118-310 и CGP049090 и ингибитор протеасомы 1 MG132 проявляют потенциал в управлении дегенерацией хряща. Ингибирование передачи сигналов TGFα и CCL2 с помощью AG1478 и RS505393, соответственно, в хондроцитах снижает их кооперативное влияние на повышение уровня MMP-13 и TNFα при посттравматической деградации суставов. [9]

## *Экзосомы и векторы*

Отдельным направлением является использование экзосом и векторов. Перенос гена для IL-1RA использовали при лечении хондральных дефектов у мыши, крысы, кролика, собаки и лошади. Лечение привело к снижению интенсивности клинических симптомов дегенеративного заболевания, а также к снижению деградации хряща. IL-1RA также был испытан в предварительных клинических испытаниях на людях. Ген IL-1RA доставляли с использованием ретровирусного вектора к аутологичным синовиоцитам, собранным из метакарпальных пальцевых суставов пациентов, страдающих ревматоидным артритом. После 1-недельного культивирования трансгенные клетки вводили внутрисуставно. Суставы подверглись анализу, который подтвердил локальную экспрессию IL-1RA и, следовательно, эффективность метода [38], [39]. Очевидным недостатком подобного подхода служит то, что его необходимо регистрировать как генотерапию, что значительно усложняет процесс получения разрешения от любого регулятора в мире.

Экзосомы, полученные из сверхэкспрессирующих miR-140-5p синовиальных мезенхимальных стволовых клеток (SMSC-140) усиливают пролиферативные и миграционные способности суставных хондроцитов (AC) без нарушения секреции внеклеточного матрикса (ECM). Wnt5a и Wnt5b, переносимые экзосомами, активировали YAP через альтернативный путь передачи сигналов Wnt и усиливали пролиферацию и миграцию хондроцитов с побочным эффектом значительного снижения секреции ECM.[40]

## *Инъекции стволовых клеток*

Наиболее интересные, на мой взгляд, исследования были сфокусированы на инъекциях различных типов стволовых клеток в синовиальную сумку. Мезенхимальные стволовые клетки оказывают терапевтически благоприятные эффекты благодаря миграции в область повреждения или воспаления тканей и экспрессии больших количеств биологически активных молекул с выраженной

иммуномодулирующей и трофической активностью [41]. Секретируемые МСК биологически активные молекулы оказывают иммуномодулирующие и трофические действия, ограничивая потенциально токсичную активность иммунных клеток, инициируют ангиогенез, препятствуют апоптозу окружающих клеток, а также стимулируют пролиферацию и дифференцировку резидентных тканеспецифичных клеток-предшественниц. Однако, стволовые клетки из разных источников по разному ведут себя при использовании для лечения остеоартрита. К примеру, мезенхимальные стволовые клетки костного мозга имеют собственную программу дифференцировки, напоминающую образование эндохондральной кости [42]. В связи с этим, после инъекции ученые наблюдали, что некоторые хондроциты, образованные из МСК клеток такой природы подвергаются гипертрофической дифференцировке, что приводит к постепенному образованию новой кости в месте дефекта хрящевой ткани. Использование же индуцированных плюрипотентных клеток сопряжено с крайне сложной процедурой индукции их в хондроциты. Хотя [43] в своей работе смогли разработать эффективную процедуру дифференцировки и доказали терапевтический эффект от имплантации в сустав хондроцитов, полученных подобным образом, они также отметили главную проблему подхода, нацеленного на восстановление только клеточной составляющей хрящевой ткани. Клетки, помещенные в поврежденный ЕСМ, не способны в полной мере восстановить нативную структуру ткани из-за ограниченной способности к экспрессии необходимых строительных молекул. Кроме того, введение суспензии клеток, при попадании их в кровоток пациента, может вызвать немедленную воспалительную реакцию крови (IBMIR), которая обусловлена массивной деструкцией вводимых клеток в результате активации комплемента [41].

#### ***1.4.5 Хирургическая стимуляция регенерации***

Целью данных манипуляций является стимулирование регенерации путем нарушения целостности сосудов губчатой кости. Стимулированный биологический ответ организма производит рубцовую ткань, называемую фиброзно-хрящевой тканью. Такие методы используются при лечении мелких (<2 см<sup>2</sup>) и средних (до 2,5 см<sup>2</sup>) дефектов (Zylińska et al., 2018) К таким артроскопическим обработкам относятся: сверление субхондральной кости (туннелизация), спонгиозизация и микрофрактурирование.

### *Туннелизация*

Туннелизация представляет собой минимально инвазивную процедуру, которая включает удаление поврежденного хряща и последующее сверление в поверхности подлежащей кости, чтобы кровь и костный мозг могли проникнуть к границе между костью и хрящом.[24] Сгусток крови затем покрывает поврежденную область и со временем образует рубцовую ткань, называемую фиброхрящом. Это снимает симптомы, но фиброзно-хрящевая ткань не такая жесткая, как естественный хрящ, и изнашивается через несколько лет.[12]

### *Микрофрактуризация*

Микроразрушающая хирургия создает небольшие трещины в основной кости. Эти переломы вызывают реакцию заживления в поврежденном суставном хряще, высвобождая стволовые клетки костного мозга [44]. Это способствует заживлению суставного хряща с образованием гиалинового и фибробластного хряща. Однако, современное мнение, представленное в некоторых статьях [45], [46], говорит о смешанных результатах в краткосрочной, среднесрочной и долгосрочной перспективе. Без механической жесткости гиалинового хряща регенерированная ткань может разрушаться через 18–24 месяца, кроме того, в 25-50% случаев наблюдается образование вторичных остеофитов из-за нарушения целостности субхондральной кости [46]. Кроме того, этот метод неприменим при крупной площади поражения сустава.

## **1.4.6 Протезирование**

В случае дефектов всей толщины хряща (4 и 5 стадия остеоартрита по ICCR) рекомендуется замещение поврежденного участка хряща или всего сустава целиком. [45]

### *Артропластика*

Классическим примером такого подхода является артропластика коленного сустава. Она обеспечивает уменьшение болевого синдрома и улучшение функциональной подвижности в 65-85 % случаев заболевания в ближайшие сроки после операции. Но в отдаленные периоды наблюдений у пациентов может возникать болевой синдром и тугоподвижность артрозного сустава, что снижает качество жизни. Кроме того, операция может всё равно приводить к формированию фиброзной ткани. [25] Аутологичные трансплантаты предполагают удаление фрагмента здорового хряща пациента и его трансплантацию в область дефекта. Чтобы предотвратить большее повреждение, хрящ удаляют из областей, которые не получают больших нагрузок, таких как боковой край бедренной кости и выемка колена. [45] Однако, этот метод имеет несколько недостатков, таких как ограничение размера трансплантата, повреждения и риск заболевания донорских участков, а также недостаточность трансплантата из-за гибели периферических хондроцитов[3].

### *Матричная аутологичная трансплантация хондроцитов*

Альтернативой аутооттрансплантации хряща является аутологичная трансплантация хондроцитов, размещенных на специально подготовленной матрице (МАСИ). Этот метод включает в себя получение хряща из малонесущей части сустава с помощью пункционной биопсии. Изолированный хрящ ферментативно переваривается для выделения хондроцитов. Эти хондроциты размножаются *in vitro*, после чего высеиваются на заранее подготовленную коллагеновую мембрану типа I или типа III до имплантации. Это позволяет избежать необходимости закрывать дефект водонепроницаемыми швами, а также помогает поддерживать характеристики суставных хондроцитов при

длительном культивировании и предотвращает утечку хондроцитов внутри сустава [47]. МАСІ дала благоприятные клинические и функциональные результаты в долгосрочных исследованиях, продолжавшихся более 10 лет [48]–[50]. Кроме того, поскольку в этом процессе используются собственные клетки пациента, можно избежать потенциальных иммунных осложнений [51]–[53].

МАСІ включают две инвазивные процедуры: сбор хондроцитов и пересадку их обратно пациенту. Эффективность этих процедур ограничена низким количеством хондроцитов в собранном хряще. Хондроциты, культивируемые в виде монослоя, легко дедифференцируются – они теряют свои хондрогенные характеристики и начинают экспрессировать маркеры фибробластов, такие как коллаген типа I. Следовательно, ткань, регенерированная с использованием таких аутологичных хондроцитов, может быть фиброкартилагиновой [46]

Высокая стоимость тканевых трансплантатов, необходимость хирургической точности и риск бактериального загрязнения ограничивают их клиническое применение. Однако, в мире зарегистрировано уже 7 продуктов, которые можно использовать для аутологичной трансплантации. Они отличаются между собой составом матрицы, протоколом культивирования клеток и дополнительными лекарственными препаратами, находящимися в составе. Данный метод считается одним из наиболее перспективных, в том числе с экономической точки зрения. В мета-анализе, проведенном британскими учеными, исследователи сделали вывод о том, что в долгосрочной перспективе применение МАСІ технологии уменьшает нагрузку на систему здравоохранения и повышает качество жизни пациентов по сравнению с консервативными методами, такими как микрофрактурирование и артропластика. [46]

### *Бесклеточные имплантаты*

Более безопасным с точки зрения работы с донорским материалом и более дешевым подходом считается замена поврежденного фрагмента хряща

бесклеточным имплантатом, который может имитировать нормальные функции ткани. Существует около десятка различных продуктов, которые являются бесклеточными имплантатами. Все они находятся на разных этапах жизненного пути: одни уже начали свое коммерческое применение, большая же часть существует на данный момент лишь в форме исследовательских разработок. К первой группе относится MaioRegen - это трехмерная матрица, которая имитирует всю остео-хрящевую ткань: хрящ, «tidemark» и субхондральную кость.



**Внешний вид MaioRegen**

**Источник [54]**

**Рисунок 1.4**

Поверхностный слой состоит в основном из деантигенированного коллагена типа 1. В среднем слое поддерживается соотношение обогащенного магнием гидоксиапатита к коллагену 40% к 60% соответственно, этот слой воспроизводит «зону прилива», тогда как нижний слой состоит из тех же материалов, но в отношении 70 к 30. Такое распределение компонентов обеспечивает биомиметический остеохондральный каркас, который направляет и способствует восстановлению костной и хрящевой ткани путем индукции

селективной дифференцировки собственных клеток-предшественников костного мозга или синовиальной жидкости организма в остеоциты, в субхондральном слое и хондроцитах в хрящевом слое.

Результаты экспериментальных исследований показывают, что после имплантации MaioRegen способен интегрироваться с окружающими тканями. Прилипшие клетки-предшественники пролиферируют, дифференцируют и синтезируют матрицу кости и хряща в соответствии с градиентом органических минералов, обнаруженных внутри каркаса. При имплантации рекомендуется использовать фибриновый клей в клинической практике, чтобы улучшить раннюю послеоперационную стабильность и целостность имплантата и, таким образом, обеспечить более безопасное и быстрое восстановление. [55]

Существует большое количество данных, подтверждающих эффективность MaioRegen с более чем 28 клиническими исследованиями. В целом, две трети пациентов, получавших MaioRegen, показывают статистически значимое преимущество в субъективной оценке IKDC по сравнению с микрофрактурированием. [54]

### *Полное протезирование сустава*

При тяжелых повреждениях суставов суставный хрящ не может быть восстановлен ни одним из описанных выше методов лечения. В этом случае может быть принято решение о полной замене поврежденного сустава, однако это не рекомендуется использовать для молодых пациентов из-за относительно короткого срока службы существующих протезов. [2] Характеристики пациентов при этом подходе крайне важно подробно оценивать. Возраст, индекс массы тела и пол влияют на исход ТКА.

Существует большое количество исследований, которые подтверждают анатомические биокинематические и физиологические отличия в устройстве коленного сустава между мужчиной и женщиной [56]–[59], но устоявшегося мнения о том, какой вклад вносят эти характеристики на течение болезни и

требований к устройству протеза пока нет. Существовала концепция, что имеющиеся на рынке унифицированные протезы коленей могут нести разный уровень комфорта для мужчин и женщин [58], [60]. С другой стороны, серия систематических обзоров выяснила, что на данный момент результаты протезирования довольно [60]–[64]. Коллектив авторов [65] провели интересный эксперимент: группе женщин и мужчин, которым требовалась замена суставов обеих коленей, имплантировали унифицированный протез и протез, разработанный с учетом особенностей анатомии. Статистические сравнения улучшений не показали последовательного преимущества для обоих полов. Взятые в совокупности, значения таких показателей, как выживаемость, оценка уровня боли по Келлгрэну-Лоуренсу, уровень мобильности пациента и кинематическая подвижность сустава после операции показывают в целом одинаковую эффективность этого гендерно-специфичного и унифицированного протеза как у мужчин, так и у женщин. Другие Недавние клинические исследования подтверждают эти результаты, сообщая об отсутствии клинической пользы в краткосрочном наблюдении гендерно-специфического ТКА по сравнению с универсальными системами [66].

## **Глава 2. Особенности нормативно-правовой базы РФ для разработки и регистрации БМКП для терапии остеоартрита**

В нашей стране очень сложная история нормативно-правового регулирования клеточных технологий. С 2004 года до 1 января 2012 года были в силе разрешения на применение «Новой медицинской технологии». Можно было получить «Лицензию на медицинскую деятельность при осуществлении высокотехнологичной медицинской помощи по применению клеточных технологий». Однако, документы, выданные в тот период, более недействительны на основании письма Министерства здравоохранения и социального развития РФ от 23 марта 2012 г. N 12-1/10/2-2744. [67]

В Российской Федерации продукты, аналогичные определению «biologicals» на территории США и ЕС, подпадают под действие ФЗ №180 «О биомедицинских клеточных продуктах». Данный закон дает определение БМКП, определяет порядок регистрации, экспертизы, производства и реализации лекарственных продуктов. Важно, что БМКП в соответствии с этим законом являются отдельной группой препаратов для медицинского применения (а не биологическим лекарственным средством, в соответствии с определением «биологического лекарственного средства», утвержденным в Федеральном законе № 61-ФЗ).[68][69]

Согласно ФЗ-180, основной признак отнесения препарата, содержащего клетки человека к БМКП – накопление (культивирование) клеток, входящих в его состав, или их модификация (ч. 1 ст. 4 ФЗ-180 Приготовление клеточных линий). Клеточная линия, входящая в состав БМКП, - стандартизованная популяция клеток одного типа с воспроизводимым клеточным составом, полученная путем изъятия из организма человека биологического материала с последующим культивированием клеток вне организма человека.

### ***2.1 Требования к организации производственного процесса***

Существует пакет документов, которым должен следовать производитель БМКП при организации производственного процесса:

1. ГОСТ Р 53434-2009 «Принципы надлежащей лабораторной практики». [70]
2. ГОСТ Р ИСО 13022 «Продукты медицинские, содержащие жизнеспособные человеческие клетки. Применение менеджмента риска и требований к методикам обработки» [71]
3. Приказ Минздрава России от 8 августа 2018 года №512н «Правила надлежащей практики по работе с биомедицинскими клеточными продуктами».[72]

Производственный процесс должен обеспечить исключение клеточной, бактериальной и вирусной контаминации, а также возможное перепутывание донорского материала от разных лиц или самого готового препарата при его аутологичном назначении. Кроме того, все этапы производства БМКП и методы контроля на стадиях производства и готового препарата должны быть валидированы. В процессе фармацевтической разработки БМКП разработчик должен провести обоснование выбора методов контроля качества БМКП и определить: методические подходы для валидации процессов производства БМКП содержание спецификаций всех продуктов производства БМКП (промежуточных, нефасованных и готовых) методы внутрипроцессного контроля качества (ВПКК) в ходе критических стадий производства БМКП методы для посерийного контроля качества готового продукта методы контроля клеточных банков (при их необходимости в ходе производства БМКП) в соответствии с рекомендациями ВОЗ. Объем требований к качеству промежуточных продуктов и готового БМКП повышается по мере перехода от небольших объемов к масштабированию производства БМКП, но принципы организации производства и контроля качества продукции для медицинского применения должны соблюдаться на каждом этапе. Для оценки качества БМКП особенно важны принципы управления рисками, которые должны соблюдаться

на всех стадиях производства для минимизации variability процесса и уменьшения возможности контаминации и перекрестной контаминации конечного продукта. Мероприятия и процедуры, необходимые для обеспечения безопасности производственной среды и персонала при производстве БМКП, не должны противоречить мероприятиям и процедурам, необходимым для обеспечения качества продукта. Лабораторные, производственные и складские помещения должны быть спроектированы с учетом класса чистоты, а процессы спланированы таким образом, чтобы предотвратить контаминацию продукции и гарантировать безопасность персонала и производственной (окружающей) среды в целях установления и соблюдения соответствующего уровня биологической безопасности. На все промежуточные продукты и готовые БМКП должна быть разработана нормативная документация, включающая показатели качества, методы и методики проведения испытаний, критерии приемлемости. Критерии приемлемости подразумевают числовые пределы, диапазоны или другие параметры или измеряемые величины, используемые в испытаниях. Выбор методов оценки качества БМКП зависит от этапа производства и стадии технологического процесса, включая выделение и культивирование клеток. Методы оценки качества готового БМКП должны быть научно обоснованы, валидированы и обеспечивать получение достоверных результатов. При изменении методики анализа или включении новой необходима валидация данной методики относительно ранее использованного, показывающая, что новый метод анализа не уступает ранее использованному и пригоден для оценки качества БМКП.

При разработке методов валидированных процедур необходимо опираться на фармакопейные статьи ОФС.1.1.0012.15 «Валидация аналитических методик», математический аппарат ОФС.1.1.0013.15 «Статистическая обработка результатов химического эксперимента» и ОФС.1.1.0014.15 «Статистическая обработка результатов определения специфической фармакологической

активности лекарственных средств биологическими методами», а также другие материалы, рекомендованные ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России.

## ***2.2 Требования к контролю этапов производства БМКП***

Производителю необходимо разработать такой протокол контроля, который в достаточной мере подтверждал качество на всех этапах производства. Действующая Государственная Фармакопея 14 издания [73] редакции не описывает биомедицинские клеточные препараты, однако, существует комплекс фармакопейных статей, которые могут быть применены к подобным продуктам. К примеру, МАСІ, несомненно регулируемое федеральным законом о БМКП, относится к парентеральным лекарственным формам и, соответственно, подпадает под действие ОФС.1.4.1.0007.15 «Лекарственные формы для парентерального применения», так как, согласно определению из «ОФС1.4.1.0026.18 Импланты» представляет собой биodeградируемый имплант, моделирующий структуру нативной ткани, оказывающий терапевтический эффект за счет присутствующих в «составе» клеток хозяина, а также гормонов роста, питательных веществ, необходимых для восстановления дефекта. Требования по работе с донорскими клеточными линиями, в том числе валидированные методики проверки подлинности описаны в ОФС 1.7.1.0010.18 «Биологические лекарственные препараты» и ОФС.1.7.1.0011.18 «Биотехнологические лекарственные препараты», которые описывают матрикс с точки зрения применения донорских клеток.

Одновременно с этим, на БМКП, предназначенные для введения в тело человека действует ГОСТ ISO 10993. [74]

В итоге, перед разработчиком стоит достаточно сложная задача, так как ему необходимо следовать нормативно-правовым актам, разработанным специально для БМКП и, в то же время, не противоречить требованиям к лекарственной форме, валидации, транспортировке, хранению, и методам анализа, которые описаны в ГФ14. Достаточно логично, что при разработке

спецификации имеет смысл использовать те методы, которые уже были валидированы и разрешены к использованию, а не разрабатывать радикально новые требования. Важно помнить, что за выпуск и актуализацию Государственной Фармакопеи отвечает ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России, который и проводит экспертизу спецификации биомедицинского клеточного препарата.

### **2.2.1 Неклеточные компоненты БМКП**

Неклеточные компоненты БМКП должны быть охарактеризованы в контексте их требуемой функции в конечном продукте. Это включает структурные компоненты, предназначенные для поддержания клеточных компонентов, такие как каркасы или мембраны, для которых должны быть определены и описаны химические и физические свойства, такие как пористость, плотность, микроскопическая структура и размер частиц, в соответствии с типом веществ и предполагаемым использованием.

#### *Выбор субстанций*

Базовые требования к лекарственным средствам, медицинским изделиям и вспомогательным веществам, входящим в состав БМКП, описаны в ФЗ-180. В частности, в них указано, что могут применяться только продукты прошедшие государственную регистрацию в соответствии со своей группировкой и при этом иметь разрешения для применения к человеку. Кроме того, в законе указано, что при входном контроле материалов для производства БМКП в стерильных условиях без последующей стерилизации обязательным является проведение контроля стерильности, а при необходимости стерилизации материалов, такая стерилизация должна проводиться термическим методом, газовым методом, радиацией или фильтрацией. Помимо этого, материалы для производства не должны содержать бактериальной и вирусной контаминации, возбудителей трансмиссивной губчатой энцефалопатии. Материалы, имеющие животное происхождение, не должны иметь сторонних примесей, характерных для

данного типа животного, а в идеале все продукты должны быть или человеческого, или рекомбинантного происхождения. Последним пунктом постулируется отсутствие в материалах антибиотиков, если их наличие не является необходимым и обосновано в технологическом регламенте производства. Все эти данные должны быть отражены в спецификации на БМКП.

В то же время, любые фармацевтические субстанции, используемые при производстве лекарственного препарата, обязаны соответствовать как ОФС.1.1.0006.15 «Фармацевтические субстанции», так и частным статьям, если таковые имеются. К примеру, для воды очищенной существует фармакопейная статья ФС.2.2.0020.18.

Для определения показателей, описанных в ФЗ-180 используются методы, описанные в ОФС.1.1.0016.18 «Стерилизация», ОФС.1.2.4.0003.15 «Стерильность», ОФС.1.2.4.0002.18 «Микробиологическая чистота», ОФС.1.1.0024.18 «Уменьшение риска передачи возбудителей губчатой энцефалопатии животных при применении лекарственных средств», а также ОФС.1.7.2.0031.15 «Испытание на присутствие микоплазм» и ОФС.1.2.4.0015.18 «Вирусная безопасность».

### *Производство матрикса*

Разберем на примере коллагеново-гиалуроновой матрицы. При производстве этого неклеточного компонента используются различные вещества:

- Коллаген 2 типа
- Вода очищенная
- Ацетоуксусная кислота
- Гиалуроновая кислота

Для каждой субстанции обязательны комплект документов: наименования лекарственных средств (международные непатентованные, или

группировочные, или химические), наименования производителей, даты и номера регистрационных удостоверений лекарственных препаратов даты включения фармацевтических субстанций в государственный реестр лекарственных средств для медицинского применения, номера нормативных документации, количественное содержание, обоснование включения. Эти документы должны быть приложены к регистрационному досье в момент подачи на регистрацию БМКП и обновляться в процессе жизненного цикла препарата.

В таком случае, для производства БМКП, аналогичного МАСІ, на территории РФ доступен только один тип коллагена производства ОАО «Лужский завод «Белкозин»» с регистрационным номером Р N000835/01-170807 от 2008 года. [75]

После создания подложки из коллагена, ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России обращает внимание на необходимость изучения физико-химических свойств подложки. Здесь на помощь могут прийти ОФС.1.2.1.0004.15 «Ионометрия», ОФС.1.2.1.0011.18 «Температура плавления», ОФС.1.2.1.0012.15 «Температура затвердевания» ОФС.1.2.1.0014.15 «Плотность».

Чистоту получившейся заготовки определяют с помощью ОФС «Хроматография», ОФС «Высокоэффективная жидкостная хроматография», ОФС «Электрофорез в полиакриламидном геле», ОФС «Изоэлектрическое фокусирование», ОФС «Определение подлинности и чистоты биологических лекарственных препаратов методом вестерн-блот».

Для определения примесей следует обратиться к ОФС.1.1.0023.18 «Родственные примеси» для определения пределов контроля и идентификации примесей и продуктов деструкции. Остаточные количества ацетоуксусной кислоты (относящейся к растворителям 3 класса, требующим количественного контроля) необходимо изучить на основании ОФС.1.1.008.15 «Остаточные

органические растворители» или ОФС.1.2.1.0010.15 «Потеря в массе при высушивании» в зависимости от ожидаемого количества примеси.

Затем необходимо использовать методики, описанные в ОФС.1.4.2.0006.15 «Невидимые механические включения ЛФ» и ОФС.1.4.2.0005.18 «Видимые механические включения».

Перед посевом клеток бесклеточную матрицу необходимо заново исследовать на все общие требования для фармацевтических субстанций, а также провести испытания ОФС.1.2.4.005.15 «Пирогенность», ОФС.1.2.4.0006.15 «Бактериальные эндотоксины» который можно заменить на ОФС.1.2.4.0016.18 «Тест на активацию моноцитов».

#### *Подготовка питательной среды*

Аналогичный набор исследований необходимо производить и по отношению вещества, входящих в состав питательной среды для клеток. В частности, в ГФ14 представлен отдельные фармакопейные статьи на оценку качества питательных сред и определения эффективности антимикробных консервантов.

#### **2.2.2 Клеточный компонент БМКП**

Весь технологический процесс, связанный с выбором донора, забором материала, культивированием выбранных клеток и банкированием, регламентируются своим дополнительным комплектом документов:

1. Приказ Минздрава России от 27 марта 2018 г. № 125н «Об утверждении порядка медицинского обследования донора биологического материала и перечня противопоказаний (абсолютных и относительных) для получения биологического материала». [76]
2. Приказ Минздрава России от 28 февраля 2017 г. N 81н «Об утверждении перечня сведений, имеющих значение для обеспечения безопасного донорства биологического материала».[77]

3. Приказ Минздрава России от 28 августа 2017 г. N 569н «Об утверждении правил получения биологического материала для производства биомедицинских клеточных продуктов и порядка передачи его производителю биомедицинских клеточных продуктов». [78]
4. Разъяснения по процедурам получения информированного согласия приведены в международных и национальных документах, в том числе в «Настольной книге пациента по стволовым клеткам Международного общества по исследованию стволовых клеток» - ISSCR Patient Handbook on Stem Cell (Носит рекомендательный характер).[79]
5. ГОСТ Р 52379-2005 «Надлежащая клиническая практика».[80]
6. Приказ Минздрава России от 28 августа 2017 года N 564н «Об утверждении правил транспортировки биологического материала, клеток для приготовления клеточных линий, клеточных линий, предназначенных для производства биомедицинских клеточных продуктов, и биомедицинских клеточных продуктов». [81]
7. Приказ Минздрава России от 20 октября 2017 года N 842н «Об утверждении требований к организации и деятельности биобанков и правил хранения биологического материала, клеток для приготовления клеточных линий, клеточных линий, предназначенных для производства биомедицинских клеточных продуктов, биомедицинских клеточных продуктов».[82]

Общие требования к биологическим материалам можно найти в ФЗ-180. К ним относятся сведения об инфицированности донора, отсутствии контаминации биоматериала, в том числе и микоплазменной и отсутствие противопоказаний по донорству биоматериала. Кроме того, поскольку некоторые БМКП нацелены на локальную продукцию биологически активных веществ, таких как иммуномодуляторы, ферменты, цитокины, то для их культур клеток обязательным становится соблюдение статьи Государственной

фармакопеи 14 ОФС.1.7.2.0011.15 «Требования к клеточным культурам – субстратам производства иммунобиологических лекарственных препаратов».

Наиболее подробно параметры контроля качества клеточного материала описаны с методических рекомендациях по проведению доклинических испытаний [83] в разделе «Критические этапы производства и характеристики качества исходного материала и промежуточных продуктов, определяемые в процессе производства»:

*Забор клеток – производится в аккредитованном медицинском центре*

1. Идентификация (морфологические характеристики, поверхностные маркеры, кариотип, наличие структурных и численных хромосомных аномалий, геномный профиль)
2. Содержание целевых клеток
3. Стерильность
4. Жизнеспособность
5. Бактериальные эндотоксины
6. Отсутствие/содержание (при наличии) инфекционных агентов (микоплазмы, вирусы) и эндогенных вирусов.

Здесь и далее пункт №6 будет повторяться, так как связан с аутологичной природой клеток донора.

*Транспортировка биологического материала*

Требования подробно описаны в Приказе МЗ РФ N 564н. Важно отметить, что при поступлении биологического материала тара (транспортный контейнер), в которой поступил биологический материал, должна быть очищена и маркирована. Способ маркировки тары (транспортного контейнера), в которой поступил биологический материал, включая вносимые при маркировке сведения о поступившем биологическом материале, должны определяться внутренней документацией. Факты повреждения тары (транспортного контейнера) и упаковки, другие отклонения от правил транспортировки, которые могут

неблагоприятно повлиять на качество полученных материалов, должны быть зафиксированы документально и рассмотрены лицами, ответственными за получение материалов для производства БМКП, а информация о таких повреждениях тары (транспортного контейнера) и других отклонениях должна быть доведена до подразделений контроля качества и обеспечения качества.

*Культивирование выбранных клеток – в лабораторно-производственных условиях*

1. Подлинность (подтверждение наличия и сохранения (стабильности) выбранных маркеров; отсутствие изменения кариотипа клеток, структурных и численных хромосомных аномалий; сохранение геномного профиля)
2. Чистота (содержание целевых клеток; содержание клеток с изменившимися маркерами, изменение которых допускается; отсутствие клеток с маркерами, изменение в которых не допускается)
3. Активность
4. Стерильность
5. Жизнеспособность
6. Бактериальные эндотоксины

*Банкирование клеток (если предусмотрено) – в аккредитованном биобанке, который не обязан являться частью производственного цикла компании*

1. Происхождение клеток описание использованных процедур (замораживания и размораживания клеток, условий хранения клеток, указание используемых криопротекторов и количества жизнеспособных клеток)
2. Подлинность клеток: фенотипирование, генотипирование (проверку на подлинность осуществляют, как правило, на клеточном субстрате главного банка с дополнительным контролем на клеточном субстрате рабочего банка)

3. Отсутствие перекрестной контаминации другими клеточными линиями
4. Стерильность
5. Стабильность (в том числе, допустимое количество пассажей)
6. Туморогенность и онкогенность

В случае использования генно-модифицированных клеток необходимо включение дополнительных параметров: анализ дополнительных белков, экспрессируемых вектором, характеристика целостности гена, его экспрессии и стабильности, характеристика остаточного вектора или нуклеиновых кислот.

### ***2.2.3 Готовый продукт***

При комбинировании с неклеточным компонентом необходим анализ наличия или отсутствия изменений основных характеристик и клеточного, и неклеточного компонента. В итоге, согласно работе [84] можно выделить общие показатели для всех групп продуктов:

1. Качественный и количественный состав БМКП: допустимое количественное содержание клеток клеточной линии (клеточных линий), содержание жизнеспособных клеток
2. Идентичность (подлинность) клеточной линии (клеточных линий) (морфологические характеристики, экспрессия специфических маркеров, экспрессия специфических генов, экспрессия специфических белков, маркеры стабильности клеточной линии)
3. Количественное содержание ЛС, медицинских изделий, вспомогательных веществ, входящих в состав БМКП
4. Стерильность
5. Бактериальные эндотоксины
6. Срок годности/хранения/применения

Для определения данных показателей также на помощь приходят методы, описанные в ОФС.1.1.0009.18 «Стабильность и сроки годности лекарственных

средств», ОФС.1.1.0020.18 «Стабильность биологических лекарственных средств», ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственных средств», ОФС.1.1.0010.18 «Хранение лекарственных средств». В частности, из этих документов определяется температурный режим хранения, который, как правило, должен находиться в пределах от 2 до 8С.

## **Глава 3. Практическая часть – разработка модели БМКП для терапии остеоартрита коленного сустава**

Биомедицинский клеточный препарат должен представлять собой имплантат, который замещает участок поврежденной нативной ткани, имитирует ее физические и физиологические свойства. Кроме того, в отличие от инертных протезов, данный продукт должен активировать регенерацию ткани и, желательно, быть биоразлагаемым. Таким образом, в рамках этой работы я рассмотрел материалы и методы, которые могут использоваться для имитации структуры хрящевой ткани.

Необходимо подобрать оптимальный источник донорских клеток, которые будут удобны для культивирования в лабораторных условиях и способны к дифференцировке в хондроциты. Желательно, чтобы эти клетки обладали иммуномодулирующими свойствами.

Материал матрицы должен имитировать волокнистую структуру нативного хряща и быть близким по физико-химическим свойствам.

Клетки, помещенные в скаффолд, должны имитировать компартаментную структуру хондронов хрящевой ткани, а их микроокружение должно поддерживать хондрогенный потенциал клеток.

### ***3.1 Выбор клеточной линии***

Известно, что хондроциты при выращивании их на культуральной подложке склонны к дедифференцировке и изменению экспрессии и склонный к экспрессии маркеров фиброзной ткани(ссылка). Кроме того, их получение от донора сопряжено с высокоинвазивным вмешательством в неповрежденные суставы пациента, страдающего остеоартритом. При этом, по сравнению с монослоями многослойные листы хондроцитов показали более высокий уровень экспрессии генов и белков, которые ассоциированы с гомеостазом нативного хряща, и способны секретировать высокие уровни гуморальных факторов,

которые играют ключевую роль в регенерации [85]. Многослойные листы хондроцитов были способны поддерживать фенотип хряща и как прикрепляться, так и покрывать дефекты хряща для защиты протеогликанов от катаболических факторов в суставе [86]. Это может быть связано с влиянием микроокружения на внутренние процессы хондроцита. Можно сделать вывод, что при высеивании донорских клеток, обладающих хондрогенным потенциалом, необходимо создавать объемные структуры.[87]

В связи с вышеперечисленным, многие исследователи обратили свое внимание на стволовые культуры клеток, которые способны к стабильному делению *ex vivo*. Разные исследовательские группы использовали в своих экспериментах стволовые клетки разных локализаций: мышц, костного мозга, жировой ткани или альвеолярной слизистой оболочки. Исследования проводились на мезенхимальных, эмбриональных, индуцированных плюрипотентных и, собственно, хондрогенных прогениторных стволовых клетках.

Хондрогенные прогениторные клетки представляют собой культуру клеток, которые можно найти в зоне кальцифицированного хряща, однако их популяция крайне мала – они представляют 0,002% от всех клеток этой локализации [13]. Кроме того, их забор у донора представляется крайне трудным, поэтому интерес к ним как к клеточному источнику сейчас невелик.

Индукцированные плюрипотентные стволовые клетки, напротив, активно изучаются научным сообществом. В 2016 году исследователи под руководством ЗНАО [88] опубликовали работу, в которой представили оптимизированный протокол передифференцировки этой культуры в хондроциты. Из минусов этого источника можно выделить высокую трудоемкость процесса последовательного получения iPSC, а затем хондроцитов. Интересным направлением считается концепция HLA-гомозиготного банка hiPSC [89]. Предполагается, что 100 HLA-гомозиготных линий hiPSC из каждой расы будут охватывать большинство населения [90]. Хрящ считается иммунной привилегированной тканью

благодаря своей аваскулярной и лимфатической природе и плотному ECM, окружающему хондроциты [91]. Использование HLA-подобранных hiPSCs может минимизировать иммунное отторжение во время аллогенной трансплантации для инженерии хряща. [46]

Наиболее перспективным, с моей точки зрения, является использование мезенхимальных стволовых клеток. Различные субпопуляции можно обнаружить во многих тканях, их процесс выделения и стандартизации достаточно прост, клетки способны устойчиво поддерживать свою стволовость в течение пассажей. МСК можно вводить в поврежденные сустав без предварительной дифференцировки, так как в норме местная популяция стволовых клеток самостоятельно мигрирует к пораженную область и образует хондроциты под воздействием факторов окружения, таких как гиалуроновая кислота, TGF- $\beta$  и BMP-6. Помимо этого, МСК выделяют в поврежденной ткани иммуномодулирующие вещества, которые уменьшают воспаление. . [92] ] Однако, клетки не всех локализаций при самостоятельной дифференцировки. К примеру, МСК, выделенные из костного мозга, склонны образовывать остеохондральную ткань в хряще, тем самым запуская процесс образования вторичных остеофитов и кальцификации сустава. [42].

Одним из наиболее удобных источников можно считать слизистую оболочку десны благодаря доступности и минимальной инвазивности ее биопсии и способности слизистой оболочки десны заживлять раны без образования рубца [93]. Исследование клеточных культур, выделенных из альвеолярной слизистой оболочки (АМС), показало, что клетки соответствуют общепринятым критериям MMSC. [92] Количество MMSC, способного к мультипотентной дифференцировке, выше в слизистой оболочке десны по сравнению с другими тканями [94]–[96]. По данным проточной цитометрии АМС экспрессировал типичные маркеры MMSC (CD73, CD90, CD105) и белки внутриклеточных фибробластов (коллаген типа I и III, эластин). В то же время отсутствует экспрессия маркеров эпителия, эндотелия и кроветворения,

скелетных и сердечных мышц. Клетки склонны к хондрогенной, остеогенной и адипогенной дифференцировке. Не было обнаружено заметных различий при сравнении разных доноров и/или пассажей. [92] Кроме того, с точки зрения безопасности, морфология и кариотип клеток были стабильными во время культивирования вплоть до 10 пассажа, что очень важно для возможности применения в клеточной терапии. АМС обладают более высоким пролиферативным потенциалом по сравнению с ММСС, полученными из костного мозга. Эти результаты согласуются с исследованиями Tomar et al. это сообщило о том, что временные интервалы удвоения популяции для костного мозга и десны ММСС. [95]

Для индукции хондрогенеза и экспрессии клетками веществ, формирующих ЕСМ рекомендуется использовать трансформирующий фактор роста- $\beta$  (TGF- $\beta$ ), инсулиноподобного фактора роста-1 (IGF-1) и специфических членов семейства факторов роста фибробластов (FGF). Эти факторы роста были использованы для стимуляции хондрогенной дифференцировки стволовых клеток в клеточной культуре. [97] Romanazzo et al. использовали два разных фактора роста в двух разных зонах: TGF- $\beta$ 3, чтобы вызвать синтез коллагена типа II и сульфатированных гликозаминогликанов, [98] в своем исследовании иммобилизовали TGF- $\beta$ 3 на микросферах, что увеличивало эффективность хондрогенеза ткани. В исследовании [99] отмечалось, что абсорбция или инактивация TGF-бета могут различаться в разных составах каркаса.

Для разработки модели БМКП использовались клетки МСК десны человека, предоставленные лабораторией клеточной биологии и патологии развития ФГБНУ НИИ Общей патологии и патофизиологии. Протокол забора был разработан с учетом нормативно-правовой базы и международных стандартов безопасности. Подробно описание культуры клеток представлено в работе. [92]

### ***3.2 Моделирование строения ориентированных волокон хряща***

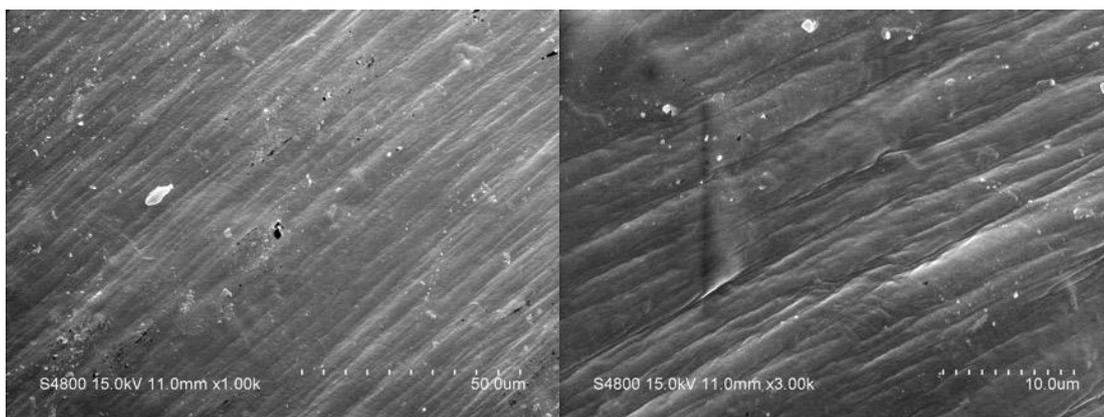
В нормальном суставном хряще взрослого человека сеть коллагеновых фибрилл состоит из трех отдельных слоев: поверхностной зоны, где фибриллы в основном параллельны поверхности хряща; средняя зона, где фибриллы распределены относительно случайно; и глубокая зона, где фибриллы в основном ориентированы перпендикулярно поверхности хряща [100]. В нормальных суставах эта коллагеновая сеть действует как структурный каркас ткани, обеспечивая основной источник прочности на растяжение и сдвиг.[101] Механические свойства хряща сильно зависят от организации коллагеновых фибрилл. При растягивающей нагрузке хрящ намного жестче в поверхностной зоне по сравнению с глубокой зоной[102], [103], кроме того, он намного жестче в направлении, параллельном линиям расщепления. Модуль растяжения также варьируется между областями, несущими большой и меньший вес, и уменьшается с остеоартритной дегенерацией и возрастом. [17], [104]

Зрелое одиночное коллагеновое волокно в хряще имеет диаметр до 200 нм. Расстояние между фибриллами составляет несколько сотен нанометров. [14] Изменения в организации коллагена вблизи хондроцитов, в частности в глубокой зоне, где организация коллагена выглядит относительно более упорядоченной, демонстрирует плоскостную реорганизацию фибрилл вокруг клеток. В столбцах хондроцитов в глубокой зоне коллаген, разделяющий клетки, образует радиальные области. Шаблон выравнивания вокруг групп клеток является более сложным в поверхностной зоне, когда ближайшие коллагеновые волокна огибают хондроны клеток, не образуя радиальных структур. [99]

Выравнивание коллагена играет жизненно важную роль в росте и пролиферации клеток. Например, выровненный коллаген может направлять рост нейрональных клеток в нужном направлении, что может ускорить скорость регенерации аксона после его повреждения. В исследовании [105] выяснили, что на распределение клеток и их фенотип влияет плотность волокон в коленных имплантатах, особенно это заметно в структурах, в которых размер межволоконного пространства меньше 100 микрометров.

Первая попытка получения выровненного коллагенового материала с использованием метода электрического осаждения была сделана Cheng et al [106]. После этого команда Zhuang et al [107] сделали выровненную коллагеновую пленку, используя наночастицы оксида металла, магнитное поле и метод электрического осаждения. Однако, такие наночастицы оксида могут быть токсичными *in vivo*, и они могут влиять на рост и пролиферацию клеток; такой процесс производства коллагеновой пленки слишком сложен. Еще один метод был изобретен командой Wilson [108], который сделал коллагеновую пленку со случайной ориентацией, но улучшил ее совмещением с механическим растяжением. Однако этот метод требует очень осторожного отслоения коллагеновой пленки от катода, особой формы каркаса, чтобы с ним можно было легко обращаться, и, возможно, он не выравнивает коллагеновые пучки по всему объему каркаса.

Метод электроосаждения, разработанный в Институте регенеративной медицины Сеченовского университета представляют собой двухэлектродную систему, где в качестве электродов выступают две иглы из титана. Рабочее расстояние между двумя электродами составляло 4 см. Для формирования фибрилл был использован кислый раствор (2%) бычьего коллагена типа I (0,5 мг/мл), который зарегистрирован в России как фармакологическая субстанция (номер регистрационного удостоверения Р N000835/01-170807 от 2008 года) и одобрен для клинического применения. Перед процессом электроосаждения раствор коллагена подвергали диализу против ультрачистой воды в течение ночи. После диализа коллаген помещали в другой диализный мешок и герметично упаковывали.



**Фотография методом сканирующей электронной микроскопии  
электроосажденного коллагена**

**Рис. 3.1**

Процесс электроосаждения раствора коллагена привел к образованию выровненной коллагеновой пленки (рис. 3.1).

Многочисленными измерениями были определены физические показатели полученной пленки:

Ширина отдельных волокон 2.5-4 мкм

Ориентация волокон – однонаправленная

Толщина – 37-49 мкм

Модуль Юнга - 1 кПа

Максимальное удлинение в направлении волокон 52+- 7 %

Методика определения толщины и мех. характеристик – образцы выдерживались в этаноле 1 час для вывода воды из пленок, после этого измерялась толщина пленки. Перед измерением механики пленки выдерживались в дистиллированной воде 10 при 37°C. Измерения механических свойств производились также в водной среде при физиологической температуре.

По итогу данного эксперимента была получена пленка, имитирующая ориентацию поверхностной зоны сустава. При этом не было использовано никаких дополнительных включений, которые бы могли повлиять на

токсичность данной мембраны для клеток. Однако, данная пленка не обладает требуемыми механическими свойствами, так как волокна коллагена не сшиты. Эту функцию в хряще выполняют протеогликаны и глюкозамин. Также, нужный уровень упругости придает коллагеновая кислота, которая в данном случае не использовалась. В дальнейшем планируется исследование методов сшивки коллагеновых волокон физическими методами.

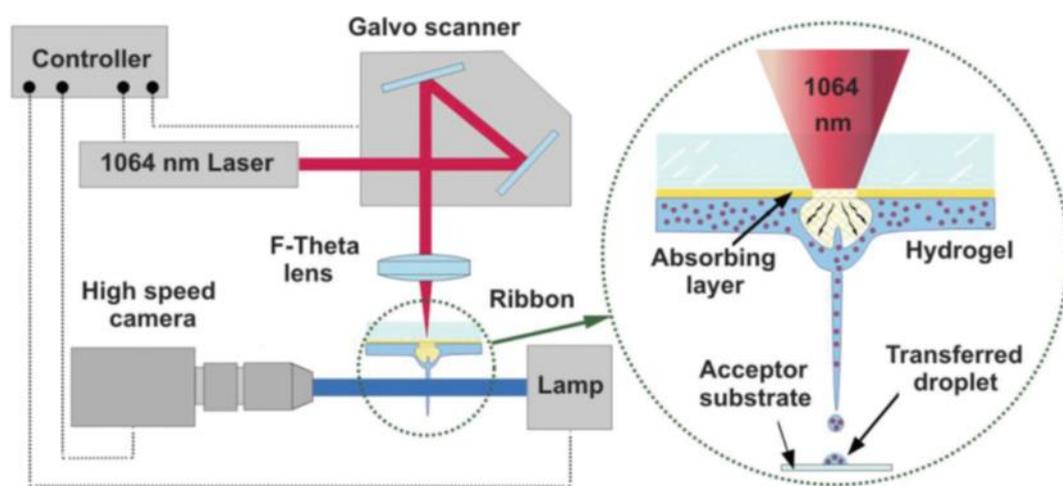
### ***3.3 Выбор метода пересаживания донорских клеток***

В нативном хряще хондроциты образуют изолированные компартменты, окруженные перицеллюлярной мембраной из коллагена 6 и 10 типов. (ссылка). Такая лакуна носит название хондрон. В составе одного хондрона могут находиться от 5-7 до нескольких десятков хондроцитов. Важно отметить, что хондроны равномерно распределены в рамках каждого из слоев хряща, однако их количество невелико, так как известно, что хондроциты составляют лишь 1-2% объема хряща. При этом, наибольшее число клеток приходится на поверхностный и глубокий слой.

В связи с этим необходимо использовать такой метод пересаживания клеток, при котором можно формировать точечные колонии с небольшим количеством клеток в них. При этом в микроокружении должны находиться питательные вещества и факторы, стимулирующие хондрогенез.

Интересным подходом для решения такой задачи может являться метод Laser-induced Forward Transfer (LIFT) - это технология цифровой печати, которая позволяет осуществлять прямой перенос материала без сопел. Эта технология была использована для печати широкого спектра биологических материалов, таких как белки [109], [110] и ДНК [111], [112]; для отделения микроорганизмов [113]; печати различными типами клеток для создания трехмерных (3D) биоэквивалентов природных тканей [114]–[118]; и для передачи стимулирующих факторов для дифференцировки клеток.

Для процесса печати следует подготовить донорскую «ленту». Лента обычно состоит из стеклянного предметного стекла, на который наносится нанослой из поглощающего лазер материала (Au, Ti) [116], [119], [120], который затем покрывается содержащими гидрогель переносимыми объектами. Лазерные импульсы проходят сквозь прозрачную сторону ленты без покрытия, а затем фокусируются на слое, поглощающем лазерное излучение. Частичное поглощение энергии лазерного импульса поглощающим слоем приводит к быстрому нагреву его локальной области и прилегающего тонкого слоя гидрогеля, что приводит к образованию пузырьков пара высокого давления и высокой температуры. [121] Быстрое расширение этой паровой области приводит к образованию струй различных типов [122] с последующим отрывом одной или нескольких капель и их переносом на поверхность акцептора [123]. Метод позволяет программировать размер капли, тем самым точно определять количество клеток, которые будут перенесены одной каплей. [124]



**Схема устройства биопринтера LIFT**

**Источник:** [124]

**Рисунок 3.2**

Для печати необходима разработка гидрогеля, вязкость которого должна находиться в районе 200-250 мПа\*сек. Оптимальным вариантом может являться

гиалуроновая кислота, которая уже используется как основа гидрогеля для LIFT в экспериментах. [124]

### ***3.4 Изучение требуемых характеристик к биочернилам***

Несколько рабочих групп показали, что ГК стимулирует хондрогенез МСК *in vitro* [125], [126], главным образом, посредством взаимодействия с клеточными рецепторами, экспрессируемыми МСК, включая CD 44 и CD168 [127]. Гиалуроновая кислота может привлекать мезенхимальные клетки-предшественники и способствовать их дифференцировке в хондрогенный фенотип [128].

Исследование [92] показало, что гиалуроновая кислота оказывает влияние на уровень кислорода в гидрогелях и тем самым на хондрогенную дифференцировку и продукцию матрикса. Они предположили, что низкий уровень кислорода в гелях из коллагена и гиалуроновой кислоты может быть результатом плохой диффузии кислорода из-за более высокой жесткости этих гелей. [129] описали, что клетки, культивируемые в гелях с добавкой 1% НА, показали самые низкие уровни кислорода и самые высокие значения осаждения GAG.

Добавление гиалуроновой кислоты к коллагеновым скаффолдам повышает модуль Юнга. В зависимости от используемых условий культивирования коллаген с добавлением 1% ГА приводил к улучшению механических свойств. Уже показано, что жесткость и эластичность микроокружения важны для дифференцировки стволовых клеток [130] и формы ткани, сформированной клетками. [95], [131] В нескольких исследованиях, посвященных коллагеново-гиалуроновым гелям концентрация гиалуроновой кислоты колеблется 0,1 до 65%. [132], [133]

Концентрации гиалуроновой кислоты в 5% считаются субоптимальными с точки зрения хондрогенеза и адекватных механических свойств. Однако, в исследованиях [92] самая высокая концентрация ГА (5%) привела к самой

низкой экспрессии коллагена типа X (Col10) для большинства групп клеточных культур. Неожиданно культивирование в этих гелях также было связано со снижением экспрессии SOX9 и коллагена типа II (Col2), в то время как экспрессия коллагена типа III (Col3) и металлопротеиназы 13 (MMP-13) заметно увеличилась.

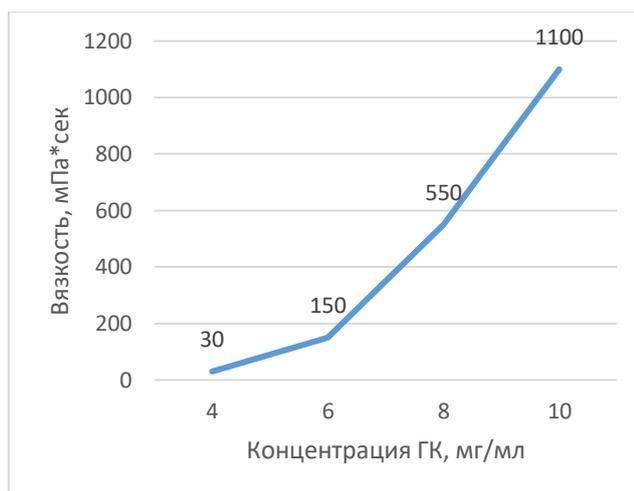
Исследования, в которых изучалась оптимизированная плотность посева в гидрогелях ГК, показали, что гидрогели, засеянные с клетками в концентрации  $60 \times 10^6$  клеток / мл, достигли биомеханических и биохимических свойств нативного хряща [134]. Однако, при этом образование ЕСМ можно было наблюдать только на периферии гидрогеля, что, возможно, связано с недостаточным количеством питательных вещества в глубине среды.

В рамках практической части были проведены исследования вязкости гиалуроновой кислоты производства «Contipro a.s.» с целью определения оптимальной концентрации, при которой будет возможно пересаживание MSC, выделенных из биопсии десны, на коллагеновую пленку, полученную методом электроосаждения.

#### *Исследование вязкости*

Так как данный коллаген не является стерильным, предварительно он был подвергнут автоклавированию.

Для определения вязкостей растворов гиалуроновой кислоты использовался вискозиметр Kyoto Electronics Manufacturing EMS-1000. Измерения производились при температуре 20° C на 500 оборотах в минуту.



### **Соотношение вязкостей растворов автоклавированной высокомолекулярной гиалуроновой кислоты с их концентрациями**

**Рисунок 3.3**

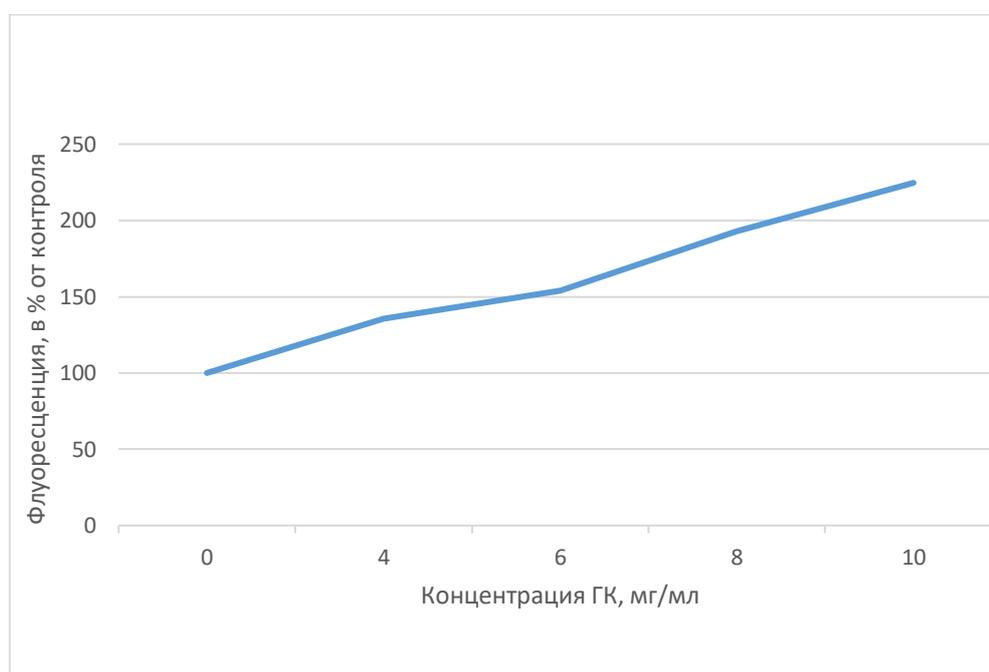
Как видно из Рис.3.3 значение вязкостей гиалуроновой кислоты возрастает экспоненциально при увеличении ее концентрации. При этом целевым диапазоном вязкости чернил, в котором возможна работа с лазерным принтером, является диапазон 150-250 мПа\*сек, что соответствует концентрациям гиалуроновой кислоты 6-8 мг/мл.

#### *Исследование цитотоксичности*

Для определения цитотоксичности разных концентраций гиалуроновой кислоты использовался тест с Аламаровым синим и Пикогрином на линии MSC (из десны человека, 6 пассаж), выращиваемых в 24-луночной планшете (40000 клеток в одной лунке). После достижения монослоя клеток в лунках, к клеткам были добавлены различные концентрации гиалуроновой кислоты (экспериментальная группа), или же питательная среда (контрольная группа) по 500 мкл.

Метаболическая активность клеток измерялась через 24 часа после культивирования клеток с различными концентрациями гиалуроновой кислоты при помощи теста с аламаровым синим (ресазурин содержащий).

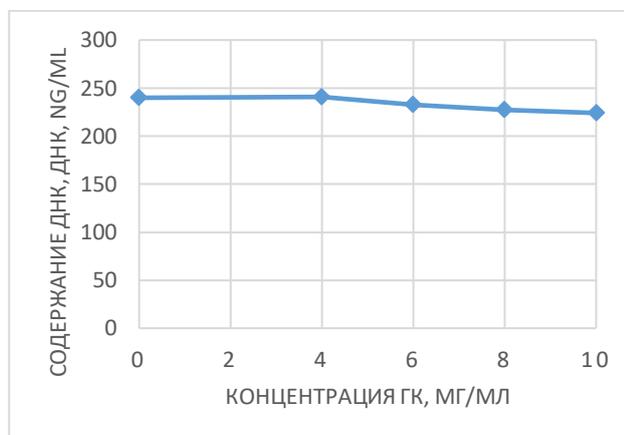
Восстановление красителя живыми клетками уменьшает количество его окисленной формы (синего цвета) и одновременно приводит к образованию флуоресцентного промежуточного продукта (красного цвета), количество которого может быть связано с метаболической активностью клеток. При помощи пипетки были выделены их жидкие среды для множественных изменений. 50 мкл раствора красителя аламарового синего добавляли к 500 мкл среды для культивирования клеток на образцах, предварительно засеянных клетками, и инкубировали в течение 2 ч при 37 ° С. Через 2 ч интенсивность флуоресценции измеряли с использованием флуоресцентного ридера Victor для считывания при длине волны возбуждения 530 нм и длине волны излучения 580 нм. Среду для культивирования клеток (без клеток) с ресазуриновым красителем с концентрацией, аналогичной указанной выше, использовали в качестве контроля. Аламаровый синий показал, что с ростом концентрации гиалуроновой в растворе, метаболическая активность клеток увеличивается.



**Тест с аламаровым синим. Флуоресценция образцов с повышающейся концентрацией ГК в клеточной среде в % от контрольной группы (чистая клеточная среда).**

**Рисунок 3.4**

Это означает, что возрастающие концентрации ГК не только не оказали токсического действия на клетки, но и наоборот увеличили их метаболическую активность.



**Количество ДНК клеток в зависимости от концентрации ГК в питательном растворе.**

**Рисунок 3.5**

Тест на содержание ДНК клеток (Рис. 3.5) показал, что при увеличении концентрации гиалуроновой кислоты в питательном растворе количество клеток (и, соответственно, их ДНК) снизилось незначительно, и снижение могло попадать в пределы погрешности. Таким образом, повышение концентрации гиалуроновой практически не влияет на способность клеток к пролиферации.

По итогу данных исследований было выяснено, что используемая нами гиалуроновая кислота не обладает токсическими свойствами после автоклавирования в промежутке концентраций, которые требуются для использования в качестве биочернил для LIFT, и повышает метаболическую активность помещенных в нее стволовых клеток, что коррелирует с известными нам научными работами.

**3.5 Дальнейший план экспериментов**

Планируется проведение серии экспериментов по пересаживанию клеток МСК в составе биочернил на основе коллагеновой кислоты в концентрации 5-

8% на пленку, состоящую из ориентированных коллагеновых волокон с целью изучения хондрогенного потенциала и выживаемости мезенхимальных стволовых клеток на модели поверхностного слоя хряща. Также, необходимы дополнительные исследования по методам сшивки коллагеновых волокон, которые не будут токсичны для клеток.

## **Выводы.**

Существующие БМКП для терапии остеоартрита дают надежду пациентам на высокое качество жизни в течение большего промежутка времени, нежели любые другие существующие терапии. Широкая распространенность заболевания в популяции, высокая эффективность и безопасность применения аутологичных клеток являются стимулами для развития данных технологий как в России, так и зарубежом.

Разработка биомедицинских клеточных продуктов на данный момент представляет из себя один из наиболее комплексных и технологически сложных процессов в медицинской отрасли. По оценкам экспертов, БМКП может выйти на рынок лишь спустя 9-11 лет доклинических и клинических испытаний, а также успешного масштабирования процесса производства. В этот срок не входит непосредственно исследования и разработка, создание экосистемы для применения сложного в реализации и дорогого продукта в условиях российского здравоохранения.

Важно отметить нормативную базу, которая была создана в последние годы в Российской Федерации. Она обеспечивает высокий уровень безопасности для конечного пользователя, но при этом накладывает на производителя множество ограничений и требований. Для регистрации продукта необходимо пройти очень долгий путь, начав его с создания производственного комплекса, соответствующего высоким международным стандартам GMP, наладить взаимоотношения с агломерациями больниц, сертифицированными по стандартам GCP, разработать логистическую цепочку для получения высокоспециализированных фармацевтических и вспомогательных субстанций, многие из которых не зарегистрированы на территории страны. После этого необходимо провести доклинические и клинические испытания, которые во многом принципиально отличаются от проводимых для «классических» лекарственных препаратов, что ограничивает количество клинических центров и специалистов. Всё это делает вывод продуктов, подобных MASI

нерентабельным для абсолютного большинства игроков фармацевтического и биотехнологического рынка России. Оптимизм внушают примеры Великобритании и США, где первые биомедицинские продукты для лечения остеоартрита широко применяются, а также скорость развития научной составляющей биомедицины. Новые работы с клетками и более глубокое понимание патофизиологии постепенно удешевляют и упрощают многие технологические процессы.

Задачи работы были выполнены. Был рассмотрен патогенез заболевания и его влияние на нормальную структуру ткани. Были рассмотрены основные подходы к терапии остеоартрита, в том числе и инновационные направления. Я рассмотрел как предпосылки к развитию биомедицинских клеточных технологий для лечения остеоартрита, так и нормативно-правовая база Российской Федерации, на которую следует опираться при исследованиях и разработках нового БМКП. Описаны требования как к составляющим частям продукта, так и к изделию в целом, а также описаны требования для производственной линии. В практической части были рассмотрены методы и материалы, которые можно использовать для создания новой модели биомедицинского продукта. Проведены первичные исследования, показывающие принципиальную возможность создания подобной модели.

## Библиография

- [1] A. C. Scibetta *и др.*, «Characterization of the chondrogenic and osteogenic potential of male and female human muscle-derived stem cells: Implication for stem cell therapy», *J. Orthop. Res.*, вып. January, 2019, doi: 10.1002/jor.24231.
- [2] J. A. McClelland, J. A. Feller, и К. E. Webster, «Sex Differences in Gait After Total Knee Arthroplasty», *J. Arthroplasty*, т. 33, вып. 3, сс. 897–902, 2018, doi: 10.1016/j.arth.2017.09.061.
- [3] L. Roseti *и др.*, «Three-Dimensional Bioprinting of Cartilage by the Use of Stem Cells: A Strategy to Improve Regeneration», *Materials (Basel)*, т. 11, вып. 9, с. 1749, 2018, doi: 10.3390/ma11091749.
- [4] А. Соловьев, «StartUp Barometer 2019», 2019. doi: 10.1109/MTAS.2004.1371634.
- [5] «<http://www.generium.ru/pipeline/>», 2020. .
- [6] J. Dinoro *и др.*, «Sulfated polysaccharide-based scaffolds for orthopaedic tissue engineering», *Biomaterials*, 2019, doi: 10.1016/j.biomaterials.2019.05.025.
- [7] J. Y. Mimpfen и S. J. B. Snelling, «Chondroprotective Factors in Osteoarthritis: a Joint Affair», *Curr. Rheumatol. Rep.*, т. 21, вып. 8, 2019, doi: 10.1007/s11926-019-0840-y.
- [8] A. C. Daly, F. E. Freeman, T. Gonzalez-Fernandez, S. E. Critchley, J. Nulty, и D. J. Kelly, «3D Bioprinting for Cartilage and Osteochondral Tissue Engineering», *Adv. Healthc. Mater.*, т. 6, вып. 22, сс. 1–20, 2017, doi: 10.1002/adhm.201700298.
- [9] M. H. Li, R. Xiao, J. B. Li, и Q. Zhu, «Regenerative approaches for cartilage repair in the treatment of osteoarthritis», *Osteoarthr. Cartil.*, т. 25, вып. 10, сс. 1577–1587, 2017, doi: 10.1016/j.joca.2017.07.004.
- [10] Q. Pan *и др.*, «Characterization of osteoarthritic human knees indicates potential sex differences», *Biol. Sex Differ.*, т. 7, вып. 1, сс. 1–15, 2016, doi: 10.1186/s13293-016-0080-z.
- [11] C. Xia *и др.*, «Decellularized cartilage as a prospective scaffold for cartilage repair», *Mater. Sci. Eng. C*, т. 101, сс. 588–595, 2019, doi: 10.1016/j.msec.2019.04.002.
- [12] H. Mistry *и др.*, «Autologous chondrocyte implantation in the knee: Systematic review and economic evaluation», *Health Technol. Assess. (Rockv)*, т. 21, вып. 6, сс. V–160, 2017, doi: 10.3310/hta21060.
- [13] R. Longley, A. M. Ferreira, и P. Gentile, «Recent approaches to the manufacturing of biomimetic multi-phasic scaffolds for osteochondral regeneration», *Int. J. Mol. Sci.*, т. 19, вып. 6, 2018, doi: 10.3390/ijms19061755.

- [14] H. J. Bigam, T. E. Flaxman, A. J. J. Smith, и D. L. Benoit, «Neuromuscular adaptations in older males and females with knee osteoarthritis during weight-bearing force control», *Knee*, т. 25, вып. 1, сс. 40–50, 2018, doi: 10.1016/j.knee.2017.06.004.
- [15] M. Demoor *u dp.*, «Biochimica et Biophysica Acta Cartilage tissue engineering : Molecular control of chondrocyte differentiation for proper cartilage matrix reconstruction ☆», *BBA - Gen. Subj.*, 2014, doi: 10.1016/j.bbagen.2014.02.030.
- [16] J. C. Mansfield, V. Mandalia, A. Toms, C. Peter Winlove, и S. Brasselet, «Collagen reorganization in cartilage under strain probed by polarization sensitive second harmonic generation microscopy», *J. R. Soc. Interface*, т. 16, вып. 150, 2019, doi: 10.1098/rsif.2018.0611.
- [17] A. V. Perruccio *u dp.*, «The effects of depression, low back pain and comorbidities on pain after total knee arthroplasty for osteoarthritis are modified by sex», *Arthritis Care Res. (Hoboken)*, сс. 0–2, 2019, doi: 10.1002/acr.24002.
- [18] H. Akkiraju и A. Nohe, «Role of Chondrocytes in Cartilage Formation, Progression of Osteoarthritis and Cartilage Regeneration», *J Dev Biol.*, 2015, doi: 10.3390/jdb3040177.
- [19] S. S. Chi, J. B. Rattner, и J. R. Matyas, «Communication between paired chondrocytes in the superficial zone of articular cartilage», *J. Anat.*, т. 205, вып. 5, сс. 363–370, 2004, doi: 10.1111/j.0021-8782.2004.00350.x.
- [20] B. J. M. J.M. Lane, C.T. Brighton, «Anaerobic and aerobic metabolism in articular cartilage», *J. Rheumatol.* 4, т. 334–342, 1977.
- [21] R. J. Garfinkel, M. F. Dilisio, и D. K. Agrawal, «Vitamin D and Its Effects on Articular Cartilage and Osteoarthritis», *Orthop. J. Sport. Med.*, т. 5, вып. 6, сс. 1–8, 2017, doi: 10.1177/2325967117711376.
- [22] Z. Deng *u dp.*, «Characterization of articular cartilage homeostasis and the mechanism of superior cartilage regeneration of MRL/MpJ mice», *FASEB J.*, вып. 10, с. fj.201802132RR, 2019, doi: 10.1096/fj.201802132rr.
- [23] S. C. Gilliver, J. P. D. Ruckshanthi, M. J. Hardman, T. Nakayama, и G. S. Ashcroft, «Sex dimorphism in wound healing: The roles of sex steroids and macrophage migration inhibitory factor», *Endocrinology*, т. 149, вып. 11, сс. 5747–5757, 2008, doi: 10.1210/en.2008-0355.
- [24] M. Tamaddon, L. Wang, Z. Liu, и C. Liu, «Osteochondral tissue repair in osteoarthritic joints: clinical challenges and opportunities in tissue engineering», *Bio-Design Manuf.*, т. 1, вып. 2, сс. 101–114, 2018, doi: 10.1007/s42242-018-0015-0.
- [25] M. Y. Yezhov, I. Y. Yezhov, A. K. Kashko, A. Y. Kayumov, A. A. Zykin, и S.

A. Gerasimov, «НЕРЕШЁННЫЕ ВОПРОСЫ РЕГЕНЕРАЦИИ ХРЯЩЕВОЙ И КОСТНОЙ», сс. 126–131, 2015.

- [26] A. M. McDermott *и др.*, «Recapitulating bone development for tissue regeneration through engineered mesenchymal condensations and mechanical cues», *bioRxiv*, т. 7756, вып. June, с. 157362, 2018, doi: 10.1101/157362.
- [27] K. Walker-Bone, «Regular review: Medical management of osteoarthritis», *Bmj*, т. 321, вып. 7266, сс. 936–940, 2000, doi: 10.1136/bmj.321.7266.936.
- [28] C. J. Moran *и др.*, «Restoration of articular cartilage», *J. Bone Jt. Surg. - Ser. A*, т. 96, вып. 4, сс. 336–344, 2014, doi: 10.2106/JBJS.L.01329.
- [29] I. T. Ozbolat, «Scaffold-Based or Scaffold-Free Bioprinting: Competing or Complementing Approaches?», *J. Nanotechnol. Eng. Med.*, т. 6, вып. 2, 2015, doi: 10.1115/1.4030414.
- [30] P. Rocky S. Tuan, M. Antonia F. Chen, MD, и M. Brian A. Klatt, «Cartilage regeneration», *Indian J. Orthop.*, т. 40, вып. 4, с. 203, 2006, doi: 10.4103/0019-5413.34495.
- [31] H. H. Lu, S. D. Subramony, M. K. Boushell, и X. Zhang, «Tissue engineering strategies for the regeneration of orthopedic interfaces», *Ann. Biomed. Eng.*, т. 38, вып. 6, сс. 2142–2154, 2010, doi: 10.1007/s10439-010-0046-y.
- [32] P. A. and S. R. Zeyland J, Lipiński D, Juzwa W, «Structure and application of select glycosaminoglycans», *Med Wet*, т. 139–144, 2006.
- [33] B. Zylińska, P. Silmanowicz, A. Sobczyńska-Rak, Ł. Jarosz, и T. Szponder, «Treatment of articular cartilage defects: Focus on tissue engineering», *In Vivo*, т. 32, вып. 6. 2018, doi: 10.21873/invivo.11379.
- [34] F. SM, *Multimodal management of canine osteoarthritis*. 2017.
- [35] R. H. and V. G. M. Hildner F, Albrecht C, Gabriel C, «No TitleState of the art and future perspectives of articular cartilage regeneration: a focus on adipose-derived stem cells and platelet- derived products», *Tissue Eng Regen Med*, т. 5, сс. 36–51, 2011.
- [36] M. A. Miller RE, Tran PB, Ishihara S, Larkin J, «Therapeutic effects of an anti-ADAMTS-5 antibody on joint damage and mechanical allodynia in a murine model of osteoarthritis», *Osteoarthr. Cartil.*, вып. 24, сс. 299–306, 2016.
- [37] et al. Larkin J, Lohr TA, Elefante L, Shearin J, Matico R, Su JL, «Translational development of an ADAMTS-5 antibody for osteoarthritis disease modification», *Osteoarthr. Cartil.*, вып. 23, сс. 1254–1266, 2015.
- [38] S. S. and W. C. Trippel S, Cucchiari M, Madry H, «Gene therapy for articular cartilage repair», *Proc Inst Mech Eng*, т. 221, сс. 451–459, 2007.
- [39] G. S. and N. A. Trippel SB, «Gene-based approaches for the repair of articular

- cartilage», *Gene Ther*, т. 11, сс. 351–359, 2004.
- [40] S. C. Tao, T. Yuan, Y. L. Zhang, W. J. Yin, S. C. Guo, и С. Q. Zhang, «Exosomes derived from miR-140-5p-overexpressing human synovial mesenchymal stem cells enhance cartilage tissue regeneration and prevent osteoarthritis of the knee in a rat model», *Theranostics*, т. 7, вып. 1, сс. 180–195, 2017, doi: 10.7150/thno.17133.
- [41] В. С. Сергеев, Т. И. Тихоненко, Д. С. Буклаев, А. Г. Баиндурашвили, и Б. В. Афанасьев, «Клеточная терапия несовершенного остеогенеза», сс. 22–33, 2016.
- [42] C. A. Somoza RA, Welter JF, Correa D, «Chondrogenic differentiation of Mesenchymal Stem Cells: challenges and unfulfilled expectations.», *Tissue Eng Part B Rev.*, 2014.
- [43] Y. Zhu и др., «Repair of cartilage defects in osteoarthritis rats with induced pluripotent stem cell derived chondrocytes», *BMC Biotechnol.*, т. 16, вып. 1, сс. 1–11, 2016, doi: 10.1186/s12896-016-0306-5.
- [44] and C. H. C. J. J. Lee, S. J. Lee, T. J. Lee, T. H. Yoon, «Results of microfracture in the osteoarthritic knee with focal full-thickness articular cartilage defects and concomitant medial meniscal tears», *Knee Surg. Relat. Res.*, т. 25, вып. 2, сс. 71–76, 2013.
- [45] L. Andriolo, D. Reale, A. Di Martino, A. Boffa, S. Zaffagnini, и G. Filardo, «Cell-Free Scaffolds in Cartilage Knee Surgery: A Systematic Review and Meta-Analysis of Clinical Evidence», *Cartilage*, с. 194760351985240, 2019, doi: 10.1177/1947603519852406.
- [46] Y. Nam, Y. A. Rim, J. Lee, и J. H. Ju, «Current Therapeutic Strategies for Stem Cell-Based Cartilage Regeneration», *Stem Cells Int.*, т. 2018, сс. 1–20, 2018, doi: 10.1155/2018/8490489.
- [47] and M. R. P. Cherubino, F. A. Grassi, P. Bulgheroni, «Autologous chondrocyte implantation using a bilayer collagen membrane: a preliminary report», *J. Orthop. Surg.*, т. 11, вып. 1, сс. 10–15, 2003.
- [48] and A. L. L. Peterson, H. S. Vasiliadis, M. Brittberg, «Autologous chondrocyte implantation: a long-term follow-up», *Am. J. Sports Med.*, т. 38, вып. 6, сс. 1117–1124, 2010.
- [49] and A. H. G. T. Minas, A. von Keudell, T. Bryant, «The John Insall award: a minimum 10-year outcome study of autologous chondrocyte implantation», *Clin. Orthop. Relat. Res.*, т. 472, вып. 1, сс. 41–51, 2014.
- [50] and D. C. F. O. A. Behery, J. D. Harris, J. M. Karnes, R. A. Siston, «Factors influencing the outcome of autologous chondrocyte implantation: a systematic review», *J. Knee Surg.*, т. 26, вып. 3, сс. 203–211, 2013.

- [51] J. V. et al. B. F. Saris, J. Vanlauwe, «Characterized chondrocyte implantation results in better structural repair when treating symptomatic cartilage defects of the knee in a randomized controlled trial versus microfracture», *Am. J. Sports Med.*, т. 36, вып. 2, сс. 235–246, 2008.
- [52] J. V. et al. D. B. F. Saris, J. Vanlauwe, «Treatment of symptomatic cartilage defects of the knee: characterized chondrocyte implantation results in better clinical outcome at 36 months in a randomized trial compared to microfracture», *Am. J. Sports Med.*, т. 37, вып. 1, сс. 10–19, 2009.
- [53] Y. G. Koh, J. H. Nam, H. S. Chung, H. J. Kim, H. Y. Lee, и К. Т. Kang, «Gender differences exist in rotational anatomy of the distal femur in osteoarthritic knees using MRI», *Knee Surgery, Sport. Traumatol. Arthrosc.*, вып. 0123456789, 2019, doi: 10.1007/s00167-019-05730-w.
- [54] S. Prime, «MAIOREGEN brochure», 2015.
- [55] E. Kon, G. Filardo, F. Perdisa, G. Venieri, и М. Marcacci, «Clinical results of multilayered biomaterials for osteochondral regeneration», *J. Exp. Orthop.*, т. 1, вып. 1, сс. 1–8, 2014, doi: 10.1186/s40634-014-0010-0.
- [56] and J. K. J. Dargel, J. W. P. Michael, J. Feiser, R. Ivo, «Anatomy revisited: morphometry in the light of sex-specific total knee arthroplasty», *J. Arthroplasty*, т. 26, вып. 3, сс. 346–353, 2011.
- [57] K. A. Greene, «Gender-specific design in total knee arthroplasty», *J. Arthroplast.*, т. 22, вып. 7, сс. 27–31, 2007.
- [58] and R. C. S. Conley, A. Rosenberg, «The female knee: anatomic variations», *J. Am. Acad. Orthop. Surg.*, т. 15, вып. 1, сс. 31–36, 2007.
- [59] and N. J. L. S. P. Guy, M. A. Farndon, S. Sidhom, M. Al-Lami, C. Bennett, «Gender differences in distal femoral morphology and the role of gender specific implants in total knee replacement: a prospective clinical study», *Knee*, т. 19, вып. 1, сс. 28–31, 2012.
- [60] and Q. L. X. Xie, L. Lin, B. Zhu, Y. Lu, Z. Lin, «Will gender-specific total knee arthroplasty be a better choice for women? A systematic review and meta-analysis», *Eur. J. Orthop. Surg. Traumatol.*, т. 24, вып. 8, сс. 1341–1349, 2013.
- [61] S. F. D. et al. A. C. Merchant, E. A. Arendt, «The female knee: anatomic variations and the female-specific total knee design», *Clin. Orthop. Relat. Res.*, т. 466, вып. 12, сс. 3059–3065, 2008.
- [62] and M. J. A. D. F. Dalury, J. B. Mason, J. A. Murphy, «Analysis of the outcome in male and female patients using a unisex total knee replacement system», *J. Bone Jt. Surgery—British Vol.*, т. 91, вып. 3, сс. 357–360, 2009.
- [63] M. Muenzberg, C. Stretz, W. Baur, R. Stangl, and D. Mersch, «Gender

- influence on the outcome of an unisex total knee arthroplasty system», *Technol. Heal. Care*, т. 22, вып. 1, сс. 129–136, 2014.
- [64] M. A. Ritter, J. T. Wing, M. E. Berend, K. E. Davis, and J. B. Meding, «The clinical effect of gender on outcome of total knee arthroplasty», *J. Arthroplasty*, т. 23, вып. 3, сс. 331–336, 2008.
- [65] N. J. M. и P. W. S., «Clinical Outcomes in Men and Women following Total Knee Arthroplasty with a High-Flex Knee: No Clinical Effect of Gender», *Sci. World J.*, т. 2015, сс. 10–13, 2015, doi: 10.1155/2015/285919 LK - [http://oneresearch.unifi.it/openurl/39UFI/39UFI\\_Services?&sid=EMBASE&issn=1537744X&id=doi:10.1155/2015/285919&atitle=Clinical+Outcomes+in+Men+and+Women+following+Total+Knee+Arthroplasty+with+a+High-Flex+Knee%3A+No+Clinical+Effect+of+Gender&stitle=Sci.+World+J.&title=Scientific+World+Journal&volume=2015&issue=&spage=&epage=&aulast=Nassif&aufirst=Jeffrey+M.&aunit=J.M.&aufull=Nassif+J.M.&coden=&isbn=&pages=-&date=2015&aunit1=J&aunitm=M](http://oneresearch.unifi.it/openurl/39UFI/39UFI_Services?&sid=EMBASE&issn=1537744X&id=doi:10.1155%2F2015%2F285919&atitle=Clinical+Outcomes+in+Men+and+Women+following+Total+Knee+Arthroplasty+with+a+High-Flex+Knee%3A+No+Clinical+Effect+of+Gender&stitle=Sci.+World+J.&title=Scientific+World+Journal&volume=2015&issue=&spage=&epage=&aulast=Nassif&aufirst=Jeffrey+M.&aunit=J.M.&aufull=Nassif+J.M.&coden=&isbn=&pages=-&date=2015&aunit1=J&aunitm=M).
- [66] M. Asseln, C. Hänisch, F. Schick, и K. Radermacher, «Gender differences in knee morphology and the prospects for implant design in total knee replacement», *Knee*, т. 25, вып. 4, сс. 545–558, 2018, doi: 10.1016/j.knee.2018.04.005.
- [67] «<http://base.garant.ru/70167586/>». .
- [68] *Федеральный закон от 23 июня 2016 г. № 180-ФЗ «О биомедицинских клеточных продуктах»*, вып. October. 2018, сс. 1–3.
- [69] *Федеральный закон от 12.04.2010 N 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств»*. 2010.
- [70] «<http://docs.cntd.ru/document/1200075972>». .
- [71] «<http://docs.cntd.ru/document/1200132461>». .
- [72] «<https://rulaws.ru/acts/Prikaz-Minzdrava-Rossii-ot-08.08.2018-N-512n/>». .
- [73] «<http://femb.ru/femb/pharmacopea.php>». .
- [74] ГОСТ ISO 10993-2011, *МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ ИЗДЕЛИЯ МЕДИЦИНСКИЕ*, т. 84. 2013.
- [75] «<https://grls.rosminzdrav.ru/GRLS.aspx>». .
- [76] «<https://www.garant.ru/products/ipo/prime/doc/71855142/>». .
- [77] «<http://base.garant.ru/71642590/>». .
- [78] «<http://base.garant.ru/71769436/>». .
- [79] International Society for Stem Cell Research, «Patient Handbook on Stem Cell Therapies Appendix I of the Guidelines for the Clinical Translation of Stem

- Cells Patient Handbook on Stem Cell Therapies», 2008. [Онлайн]. Доступно на: [www.isscr.org](http://www.isscr.org).
- [80] ГОСТ Р 52379-2005, *НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ НАДЛЕЖАЩАЯ КЛИНИЧЕСКАЯ ПРАКТИКА*. 2006.
- [81] «<http://docs.cntd.ru/document/542606283>». .
- [82] «<http://docs.cntd.ru/document/542610424>». .
- [83] В. . Ткачук, *Методические рекомендации по проведению доклинических исследований биомедицинских клеточных продуктов*. 2017.
- [84] М. В. Супотницкий *и др.*, «ПЕРСПЕКТИВНЫЕ МЕТОДИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ К ДОКЛИНИЧЕСКОМУ ИССЛЕДОВАНИЮ БИОМЕДИЦИНСКИХ КЛЕТОЧНЫХ ПРОДУКТОВ И ВОЗМОЖНЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ ИХ КАЧЕСТВА», сс. 36–44, 2015.
- [85] К. et al. Hamahashi, «Studies of the humoral factors produced by layered chondrocyte sheets.», *J. Tissue Eng. Regen. Med.*, т. 9, сс. 24–30, 2015.
- [86] N. et al. Kaneshiro, «Bioengineered chondrocyte sheets may be potentially useful for the treatment of partial thickness defects of articular cartilage.», *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, т. 349, сс. 723–731, 2006.
- [87] Y. Lu *и др.*, «Recent advances in cell sheet technology for bone and cartilage regeneration: from preparation to application», *Int. J. Oral Sci.*, т. 11, вып. 2, 2019, doi: 10.1038/s41368-019-0050-5.
- [88] et al. Zhao W, Zhang C, Shi M, Zhang J, Li M, Xue X, «The discoidin domain receptor 2/annexin A2/matrix metalloproteinase 13 loop promotes joint destruction in arthritis through promoting migration and invasion of fibroblast-like synoviocytes. *Arthritis Rheumatol*», т. 66, сс. 2355–2367, 2014.
- [89] Y. N. et al. Y. A. Rim, N. Park, «Recent progress of national banking project on homozygous HLA-typed induced pluripotent stem cells in South Korea», *J. of Tissue Eng. ing Regen. Med.*, сс. 1–6, 2017.
- [90] and M. P. P. A. Gourraud, L. Gilson, M. Girard, «The role of human leukocyte antigen matching in the development of multiethnic “haplobank” of induced pluripotent stem cell lines», *Stem Cells*, т. 30, вып. 2, сс. 180–186, 2012.
- [91] and A. Y. N. Tsumaki, M. Okada, «iPS cell technologies and cartilage regeneration», *Bone*, т. 70, сс. 48–54, 2015.
- [92] P. B. K. Vadim L. Zorin<sup>1, 2</sup>, Andrey A. Pulin<sup>1</sup>, Ilya I. Eremin<sup>1</sup>, Ivan N. Korsakov<sup>1</sup>, Alla I. Zorina<sup>2</sup>, Natalia V. Khromova<sup>3</sup>, Olga I. Sokova<sup>3</sup>, Konstantin V. Kotenko<sup>4</sup>, «Myogenic potential of human alveolar mucosa derived cells», *J. Chem. Inf. Model.*, т. 53, вып. 9, сс. 1689–1699, 2019, doi: 10.1017/CBO9781107415324.004.

- [93] Q. A. Mitrano TI, Grob MS, Carrión F, Nova-Lamperti E, Luz PA, Fierro FS и S. A. Chaparro A, «Culture and characterization of mesenchymal stem cells from human gingival tissue.», *J Periodontol*, т. 81, вып. 6, сс. 917–25, 2010.
- [94] S. S. Huang GT, Gronthos S, «Mesenchymal stem cells derived from dental tissues vs. those from other sources: their biology and role in regenerative medicine.», *J Dent Res.*, т. 88, вып. 9, сс. 792–06, 2009.
- [95] J. H. Tomar GB, Srivastava RK, Gupta N, Barhanpurkar AP, Pote ST и W. M. Mishra GC, «Human gingiva-derived mesenchymal stem cells are superior to bone marrow-derived mesenchymal stem cells for cell therapy in regenerative medicine.», *Biochem Biophys Res Commun.*, т. 393, вып. 3, сс. 377–83, 2010.
- [96] V. A. Treves-Manusevitz S, Hoz L, Rachima H, Montoya G, Tzur E и P. S. Narayanan AS, Amar S, Arzate H, «Stem cells of the lamina propria of human oral mucosa and gingiva develop into mineralized tissues in vivo», *J Clin Periodontol.*, т. 40, вып. 1, сс. 73–81, 2013.
- [97] K. L. Caldwell и J. Wang, «Cell-based articular cartilage repair: The link between development and regeneration», *Osteoarthr. Cartil.*, т. 23, вып. 3, сс. 351–362, 2015, doi: 10.1016/j.joca.2014.11.004.
- [98] D. J. Romanazzo, S.; Vedicherla, S.; Moran, C.; Kelly, «Meniscus ECM-functionalised hydrogels containing infrapatellar fat pad-derived stem cells for bioprinting of regionally defined meniscal tissue Med.», *J. Tissue Eng. Regen.*, т. 12, сс. e1826–e1835, 2018.
- [99] C. G. Pfeifer *u dp.*, «Higher ratios of hyaluronic acid enhance chondrogenic differentiation of human MSCs in a hyaluronic acid-gelatin composite scaffold», *Materials (Basel).*, т. 9, вып. 5, 2016, doi: 10.3390/ma9050381.
- [100] H. H.-J. Hunziker E, Quinn T, «Quantitative structural organization of normal adult human articular cartilage», *Osteoarthr Cart.*, т. 10, сс. 564–572, 2002.
- [101] H. Wei *u dp.*, «Susceptibility tensor imaging and tractography of collagen fibrils in the articular cartilage», *Magn. Reson. Med.*, т. 78, вып. 5, сс. 1683–1690, 2017, doi: 10.1002/mrm.26882.
- [102] V. den B. W. Pritzker K, Gay S, Jimenez S, Ostergaard K, Pelletier J-P, Revell P, Salter D, «Osteoarthritis cartilage histopathology: grading and staging», *Osteoarthr Cart.*, т. 14, сс. 13–29, 2006.
- [103] G. S. Goldring MB, «Articular cartilage and subchondral bone in the pathogenesis of osteoarthritis», *Ann N Y Acad Sci*, т. 1192, сс. 230–237, 2010.
- [104] G. G. Jordan CD, Saranathan M, Bangerter NK, Hargreaves BA, «Musculoskeletal MRI at 3.0T and 7.0 T: a comparison of relaxation times and image contrast», *Eur J Radiol*, т. 82, сс. 734–739, 2013.
- [105] S. Nuernberger, S.; Cyran, N.; Albrecht, C.; Redl, H.; Vecsei, V.; Marlovits,

- «The influence of scaffold architecture on chondrocyte distribution and behavior in matrix-associated chondrocyte transplantation grafts», *Biomaterials*, т. 32, cc. 1032–1040, 2011.
- [106] S. G. J. and A. O. Cheng X, Gurkan U A, Dehen C J, Tate M P, Hillhouse H W, «An electrochemical fabrication process for the assembly of anisotropically oriented collagen bundles», *Biomaterials*, т. 29, cc. 3278–88, 2008.
- [107] C. K. and W. W. Zhuang J, Lin S, Dong L, «Magnetically Assisted Electrodeposition of Aligned Collagen Coatings ACS», *Biomater. Sci. Eng.*, т. 4, cc. 1528–35, 2018.
- [108] E. T. J. P. and G. R. Wilson S P, Verschure P F M J, *Living Machines 2015: Biomimetic and Biohybrid Systems*. 2015.
- [109] et al Serra P, Fernández-Pradas JM, Berthet FX, «Laser Direct Writing of Biomolecule Microarrays», *Appl Phys A Mater Sci Process*, т. 79, cc. 949–952, 2004.
- [110] et al. Zergioti I, Karaiskou A, Papazoglou DG, «Femtosecond Laser Microprinting of Biomaterials», *Appl Phys Lett*, т. 83, cc. 1–3, 2005.
- [111] F.-P. J. Serra P, Colina M, «Preparation of Functional DNA Microarrays through Laserinduced Forward Transfer», *Appl Phys Lett*, т. 85, cc. 1639–1641, 2004.
- [112] et al Colina M, Serra P, Fernández-Pradas JM, «DNA Deposition through Laser Induced Forward Transfer», *Biosens. Bioelectron*, т. 20, вып. 8, cc. 1638–1642, 2005.
- [113] Cheptsov VS, Tsykina SI, Minaev NV, «New Microorganism Isolation Techniques with Emphasis on Laser Printing.», *Int J Bioprinting*, т. 5, cc. 1–12, 2019.
- [114] et al. Koch L, Deiwick A, Schlie S, «Skin Tissue Generation by Laser Cell Printing.», *Biotechnol. Bioeng*, т. 109, cc. 1855–1863, 2012.
- [115] Gaebel R, Liu J, Koch, L, et al., «Patterning Human Stem Cells and Endothelial Cells with Laser Printing for Cardiac Regeneration», *Biomaterials*, т. 32, cc. 9218–9230, 2011.
- [116] Gaebel R, Kuhn S, Sorg H, et al., «Laser printing of skin cells and human stem cells.», *Tissue Eng Part C Methods*, т. 16, cc. 847–854, 2009.
- [117] Mandrycky C, Wang Z, Kim K, et al., «3D Bioprinting for Engineering Complex Tissues», *Biotechnol. Adv*, т. 34, cc. 422–434, 2016.
- [118] Koch L, Kuhn S, Sorg H, et al., «Laser Printing of Skin Cells and Human Stem Cells», *Tissue Eng Part C Methods*, т. 16, cc. 847–854, 2010.
- [119] Catros S, Fricain JC, Guillotin B, et al., «Laser-assisted Bioprinting for

Creating on-demand Patterns of Human Osteoprogenitor Cells and Nano-hydroxyapatite», *Biofabrication*, т. 3, 2011.

- [120] Hopp B, Smausz T, Antal Z, et al., «Absorbing Film Assisted Laser Induced Forward Transfer of Fungi (*Trichoderma conidia*).», *J Appl Phys*, т. 96, сс. 3478–3481, 2004.
- [121] et al. Yusupov VI, Zhigarkov VS, Churbanova ES, «Laser-induced Transfer of Gel Microdroplets for Cell Printing», *Quantum Electron*, т. 47, сс. 1158–1165, 2017.
- [122] Zhang Z, Xiong R, Mei R, et al, «Time-Resolved Imaging Study of Jetting Dynamics during Laser Printing of Viscoelastic Alginate Solutions», *Langmuir*, т. 31, сс. 6447–6456, 2015.
- [123] et al. Zhang Z, Xiong R, Corr DT, «Study of Impingement Types and Printing Quality during Laser Printing of Viscoelastic Alginate Solutions.», *Langmuir*, т. 32, сс. 3004–3014, 2016.
- [124] V. Yusupov *и др.*, «Laser-induced Forward Transfer Hydrogel Printing: A Defined Route for Highly Controlled Process», *Int. J. Bioprinting*, т. 6, вып. 3, сс. 1–16, 2020, doi: 10.18063/ijb.v6i3.271.
- [125] S. P. Bianco P, Robey PG, «Mesenchymal stem cells: revisiting history, concepts, and assays.», *Cell Stem Cell*, т. 2, вып. 4, сс. 313–9, 2008.
- [126] C. AI, «Mesenchymal stem cells», *J Orthop Res.*, т. 9, сс. 641–50, 1991.
- [127] H. P, «Mesenchymal stromal cells and fibroblasts: a case of mistaken identity?», *Cytotherapy*, т. 14, вып. 5, сс. 516–21, 2012.
- [128] H. L. Fournier BP, Larjava H, «Gingiva as a source of stem cells with therapeutic potential.», *Stem Cells Dev*, т. 22, вып. 24, сс. 3157–77, 2013.
- [129] E. Amann, P. Wolff, E. Breel, M. van Griensven, и E. R. Balmayor, «Hyaluronic acid facilitates chondrogenesis and matrix deposition of human adipose derived mesenchymal stem cells and human chondrocytes co-cultures», *Acta Biomater.*, т. 52, сс. 130–144, 2017, doi: 10.1016/j.actbio.2017.01.064.
- [130] K. D. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F и H. E. Deans R, Keating A, Prockop Dj, «Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement.», *Cytotherapy*, т. 8, вып. 4, сс. 315–31, 2006.
- [131] C. F. Yang H, Gao LN, An Y, Hu CH, Jin F, Zhou J, Jin Y, «Comparison of mesenchymal stem cells derived from gingival tissue and periodontal ligament in different incubation conditions», *Biomaterials.*, т. 34, вып. 29, сс. 7033–47, 2013.
- [132] I. A. Zorin V, Zorina A, Cherkasov V, Deev R, Kopnin P, «Clinical-instrumental and morphological evaluation of the effect of autologous dermal

- fibroblasts administration.», *J Tissue Eng Regen Med*, 2014.
- [133] M. J. Petrof G, Martinez-Queipo M, Mellerio JE, Kemp P, «Fibroblast cell therapy enhances initial healing in recessive dystrophic epidermolysis bullosa wounds: results of a randomized, vehicle-controlled trial.», *Br J Dermatol*, т. 169, вып. 5, сс. 1025–33, 2013.
- [134] R. . Erickson, I.E.; Kestle, S.R.; Zellars, K.H.; Farrell, M.J.; Kim, M.; Burdick, J.A.; Mauck, «High mesenchymal stem cell seeding densities in hyaluronic acid hydrogels produce engineered cartilage with native tissue properties», *Acta Biomater*, т. 8, сс. 3027–3034, 2012.