

УДК 576.3/.7

КЛЕТОЧНЫЕ ТЕХНОЛОГИИ ДЛЯ РЕГЕНЕРАЦИИ ХРЯЩЕВОЙ ТКАНИ

© 2020 г. В. Н. Александров^{1, 2, *}, М. О. Соколова¹, А. В. Комаров³, Е. В. Михайлова^{2, 4},
А. А. Кокорина¹, А. В. Кривенцов¹

¹Лаборатория тканевой инженерии Военно-медицинской академии им. С.М. Кирова МО РФ,
Санкт-Петербург, 194044 Россия

²Лаборатория экспериментальной хирургии Санкт-Петербургского государственного педиатрического
университета МЗ РФ, Санкт-Петербург, 194100 Россия

³Филиал № 2 Военного госпиталя 425 Минобороны России, Красноярск, 660017 Россия

⁴Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, 194064 Россия

*E-mail: vntaleks9@yandex.ru

Поступила в редакцию 21.08.2019 г.

После доработки 15.11.2019 г.

Принята к публикации 18.11.2019 г.

Приобретенные дефекты хрящевой ткани (ХТ) остаются важной клинической проблемой, характеризующейся снижением качества жизни, выраженным болевым синдромом, ограничением функций и, в случае обширных поражений, подвижности и глубокой инвалидности. Микрофактурирование и абразивная хондропластика, как приемы активизации репаративной регенерации ХТ, в случае повреждений большой площади приводят к формированию ткани, уступающей по свойствам нативной. В связи с этим разработка персонифицированных тканеинженерных конструкций (ТИК), включающих клетки и носитель, специально выбранные для замещения разных по тяжести и клиническому проявлению дефектов ХТ, представляется весьма актуальной. В настоящем обзоре обсуждаются различные виды клеток и носители для ТИК в контексте представлений о биохимических и механических факторах, способных стимулировать хондрогенез *in vivo*. Рассмотрены достоинства и недостатки носителей биологического и синтетического происхождения по критериям биосовместимости, иммуногенности, механической прочности, устойчивости, адгезивности. Показано, что наиболее перспективными носителями в настоящее время являются композитные носители, сочетающие материалы биологического и синтетического происхождения, предпочтительно заселяемые аутологичными клетками.

Ключевые слова: хрящевая ткань, хондрогенез, мультипотентные мезенхимные стромальные клетки, тканевая инженерия, носитель, внеклеточный матрикс, биореактор

DOI: 10.31857/S0041377120030025

Хрящевая ткань (ХТ) – тип соединительной ткани, состоящий из прочного, гибкого внеклеточного матрикса (ВКМ) – густой сети волокон коллагена II типа или эластина, скрепленных хондроитинсульфатами (желеобразным компонентом основного вещества) и хондроцитов, занимающих всего 2–5% объема (Stockwell, 1978). ХТ, включая гиалиновый хрящ, самый распространенный и самый слабый из трех типов ХТ, не имеет нервных окончаний, в ней благодаря антиangiогенным факторам нет кровоснабжения, а в трофикие участвуют капилляры сино-

виальной оболочки сустава и субхондрального участка кости – необходимые вещества поступают посредством диффузии и имеющей место компрессионной нагрузки (Макушин и др., 2012; Patra, Sandell, 2012).

Вследствие столь низкой метаболитной активности собственный репаративный потенциал ХТ низок – чаще всего в результате естественной регенерации при локальном глубоком повреждении ХТ формируется *de novo* волокнистый хрящ с патологическими коллагеновыми волокнами в объеме, недостаточном для восполнения дефекта, но провоцирующем гипертрофию смежных участков ХТ. Это ведет к деформации гладкой поверхности сустава, снижающей устойчивость ХТ к нагрузкам и обуславливающей риск повторных повреждений и прогрессирование патологии (Советников и др., 2013; Zhang et al., 2014; Li et al., 2015; Vinatier, Guicheux, 2016).

Принятые сокращения: ВКМ – внеклеточный матрикс; ГХ – гиалиновый хрящ; ДЦТ – децеллюляризованная ткань; КМ – костный мозг; ММСК – мультипотентные мезенхимные стромальные клетки; СО – синовиальная оболочка; ТИК – тканеинженерная конструкция; ХТ – хрящевая ткань; АСТ – трансплантация аутологичных хондроцитов; MACI – иммобилизация хондроцитов на плоских или объемных носителях.

Для предотвращения подобных процессов ткань, формируемая в месте повреждения, должна максимально соответствовать нативной по структуре, механическим и биохимическим характеристикам. Сегодня есть потребность с одной стороны в препаратах, способных ускорить процесс репаративной регенерации в патофизиологических условиях, а с другой – в трансплантатах, позволяющих компенсировать утраченную часть ХТ с полным восстановлением ее функций. Многочисленные экспериментальные данные и клинические испытания продемонстрировали реализуемость, безопасность и эффективность использования клеточной терапии для решения этих задач в клинике. Тем не менее, все еще есть сомнения относительно реальных возможностей и эффективности применения в хондропластике тканеинженерных конструкций (ТИК), подразумевающих иммобилизацию клеток на полимерном носителе. При этом для получения персонифицированных ТИК выбор как вида клеток, так и материала носителя должны обуславливаться видом повреждения, а также состоянием и сопутствующими заболеваниями пациента – например, использование ТИК в условиях воспаления и окислительного стресса в местах повреждения ограничено из-за низкой выживаемости клеток и требует дополнительных стимулирующих факторов или увеличения числа иммобилизованных клеток.

Настоящий обзор посвящен обсуждению экспериментальных и уже прошедших доклинические исследования вариантов ТИК для хондропластики, обсуждаются основные преимущества и проблемы при использовании разных типов ТИК, как плоских мембранных, так и имеющих трехмерную структуру. Обобщены последние достижения терапии с различными видами клеток для восстановления ХТ, а также подходы к улучшению их функциональности при трансплантации в место повреждения. Мы обращаем особое внимание на характеристики носителей природного и синтетического происхождения, обеспечивающих после трансплантации образование структур со свойствами, приближенными к нативной ХТ. Кроме того, в общих чертах мы обрисовываем и анализируем методологии прекондиционирования ТИК в условиях биореакторов, направленного на улучшение адаптации и, соответственно, функционирования ТИК после трансплантации.

ПОДХОДЫ К ВОССТАНОВЛЕНИЮ ХТ В КЛИНИЧЕСКОЙ ПРАКТИКЕ

Сегодня в клинике подходы к восстановлению инвалидной ХТ в зависимости от характера и степени повреждения условно разделяют на 3 группы. Первую составляют приемы, нацеленные на инициацию миграции в зону дефекта клеток костного мозга, вторую – технологии замещения дефекта аутологичной ХТ и третью – клеточные технологии, в частности, имплантация в пораженный участок аутологичных

или донорских хондроцитов в составе носителя или без него (Советников и др., 2013; Божокин и др., 2016).

В общем случае ХТ разрушается с образованием отложений из клеточных мембран, коллагенов и протеогликанов ВКМ, попадание которых во внутрисуставную жидкость стимулирует мигрировавшие из капилляров синовиальной оболочки макрофаги и лейкоциты к секреции провоспалительных цитокинов – интерлейкина-1 (IL-1), фактора некроза опухоли- α (TNF- α), стимулирующих и привлекающих многие типы лейкоцитов в зону повреждения (Hu et al., 2015). Одновременно с формированием зон первичной и вторичной альтерации в неповрежденных хондроцитах экспрессируется ядерный фактор каппа-би (NF- κ B, nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells), активно участвующий в транскрипции генов провоспалительных цитокинов, регуляторов апоптоза и клеточного цикла (Li et al., 2015). Секретируются также катаболические ферменты: матричные металлопротеазы (MMP) и дезинтегрин-тромбоспондин-металлопротеазы (ADAMTS), непосредственно участвующие в дальнейшей деградации молекул ВКМ (коллагена типа II и агрекана) (Wang et al., 2015). Интактные хондроциты, стимулированные к пролиферации цитокинами, часто меняют фенотип, подвергаются гипертрофическим изменениям и нередко секретируют патологические формы коллагена (типа X), что считается важным этапом эндохондральной оссификации (Zhang et al., 2014).

Когда альтерация захватывает субхондральный участок, провоцируя вторичный выброс активированных воспалительных факторов IL-1, TNF- α , интерферона-гамма, экссудацию с миграцией моноцитов и лимфоцитов, секретирующих фактор роста фибробластов 2 (FGF-2, fibroblast growth factor), в место повреждения привлекаются фибробласты, провоцирующие скорейшее закрытие дефекта соединительно-тканным рубцом. Метаболическая ситуация в данном случае такова, что процесс фиброзирования дефекта идет быстрее, чем синтез нового тканеспецифического ВКМ. Секреция активированными макрофагами трансформирующего фактора роста бета-2 (TGF- β , transforming growth factor) совместно с секрецией хондроцитами и остеобластами костных морфогенетических белков стимулирует миграцию к месту регенерации клеток костного мозга, преимущественно мезенхимных мультипотентных стromальных клеток (ММСК) (Советников и др., 2013; Li et al., 2015).

Широко используемые с 1980 г методы стимуляции миграции клеток костного мозга в инвалидный хрящ посредством микрофрактурирования и абразивной хондропластики в долгосрочном периоде показывают неудовлетворительные результаты (Morgan et al., 2014; Божокин и др., 2016; Айрапетов и др., 2017). Дифференциация ММСК в хондрогенном направлении, сопровождающаяся синтезом коллаге-

на, преимущественно типа I, и связыванием поверхностного фибрина при возникающих кровоизлияниях в травмированную область, предопределяет формирование ткани, отличающейся от исходной ХТ по морфологии и механическим свойствам и функционально абсолютно недостаточной (Li et al., 2015).

Использование аутологичных костно-хрящевых блоков для закрытия дефектов ХТ (мозаичная хондропластика) более эффективно, но эта процедура может применяться при площади дефектов не более 2–3 см² при сохраненном субхондральном ложе и наличии аутогенного трансплантата (Gudas et al., 2005).

Использование аутологичных хондроцитов. Самым перспективным подходом для компенсации небольших (3–4 см²) поражений, окруженных здоровой ХТ, ранее считали трансплантацию в место дефекта аутологичных хондроцитов (ACT, autologous chondrocytes transplantation), впервые проведенную в 1994 г. В дальнейшем, чтобы избежать элиминации трансплантированных хондроцитов, их дедифференцировки в фибробластоподобные клетки, а также для стимуляции синтеза и секреции компонентов ВКМ, стали закрывать дефект фрагментом надкостницы или биорезорбируемой мембранны. Иммобилизация хондроцитов на плоских или объемных носителях (MACI, matrix-assosiated autologous chondrocytes implantation), то есть переход к ТИК, позволил увеличить размер закрываемого дефекта до 4–10 см² (Awad et al., 2004; Rai et al., 2017).

Однако результаты 15-летнего опыта хондропластики с использованием ACT и MACI позволили сделать далеко не утешительные выводы. Сегодня убедительно показано, что в долгосрочном периоде наблюдения технологии ACT и MACI не обеспечивают ожидаемых различий с технологией микрофрактурирования (Browne et al., 2005; Wondrasch et al., 2015; Rai et al., 2017; Cengiz et al., 2018). Например, трансплантаты MACI в 3–6% случаев отторгаются, а в 12% случаев, согласно результатам пятилетнего наблюдения, подвергаются гипертрофическим изменениям (Flanigan et al., 2018).

При пластике дефектов площадью до 6 см² ACT, как отдельная процедура, либо в сочетании с мозаичной хондропластикой, через 3 г. обеспечили лишь неполную репартивную регенерацию. Сформированный хрящевой регенерат, хотя и заполнил дефект и был интегрирован с тканями, но лишь в 22% биопсий он был преимущественно гиалиновым, в 30% – фиброзным и в 48% – смешанным, что дало основание высказать предположение о последовательном морфогенезе ХТ (Roberts et al., 2003).

Последние результаты, полученные спустя 15 лет с момента выполнения ACT или АСТ в комбинации с микрофрактурированием по поводу очаговых дегенеративно-дистрофических изменений хряща мышцелков бедренной кости, показали значительное и сохраняющееся на протяжении всего исследования

улучшение клинических показателей лишь у части пациентов, а 57% пациентов, перенесших АСТ, и 48% пациентов в группе, получавшей комбинированное лечение, имели признаки раннего остеоартроза (Knutsen et al., 2016). Нельзя исключить, что столь неутешительные результаты были предопределены неудовлетворительным состоянием хондроцитов после трансплантации в условиях воспаления (Awad et al., 2004; Angele et al., 2015; Tang et al., 2015; Bianchi et al., 2017). В этом контексте понятен интерес к иным клеткам, отвечающим требованиям биологической безопасности и характеризующимся высокими пролиферативным потенциалом, пластичностью, реактивностью на действие биохимических факторов, стимулирующих образование ВКМ.

ММСК в терапии дефектов ХТ. Значительное внимание исследователей и медиков привлекают культивируемые ММСК из различных источников – они хорошо пролиферируют, поддерживают стабильность генома в ходе культивирования, способны к дифференцировке в хондрогенном направлении и сохраняют эти качества в ходе криохранения (De Bari et al., 2001; Dominici et al., 2006). Этими обстоятельствами объясняется тот факт, что более чем в 18 клинических исследованиях по хондропластике использованы именно ММСК (данные на сентябрь 2019 г. См.: <http://www.clinicaltrials.gov>) из костного мозга, жировой ткани, синовиальной оболочки (De Bari et al., 2001; Xie et al., 2012; O'Conor et al., 2013; Qomi et al., 2015; Lee, Wang, 2017).

Последние, то есть ММСК из синовиальной оболочки, сегодня можно считать оптимальным тканеспецифичным клеточным материалом для хондропластики суставного хряща (Shimomura et al., 2015). Так, успешно завершено пилотное клиническое исследование терапии глубоких дефектов ХТ коленного сустава площадью более 2 см² с использованием именно этих клеток (Akgun et al., 2015). Возможно, наблюдаемое положительное хондрозащитное действие обусловлено, прежде всего, паракринным влиянием клеток, так как в результате 12-недельного курса внутрисуставных инъекций ММСК из синовиальной оболочки у крыс отмечали замедление прогрессии остеоартроза и наличие в синовиальной полости жизнеспособных ММСК (Ozeki et al., 2016).

Не менее перспективной, судя по результатам, выглядит и хондропластика с использованием ММСК из костного мозга. По результатам ограниченного клинического исследования через 95 нед. после введения этих клеток, иммобилизованных в коллагеновом геле, поврежденные участки ХТ были покрыты плотной белесоватой тканью, а пациенты отмечали снижение или отсутствие болевых ощущений (Wakitani et al., 2011). Через 75 мес. обследование не показало отклонений со стороны ранее инвалидных суставов ($n = 41$), подтвердив безопасность применения ММСК костномозгового происхождения в клинике (Lee, Wang, 2017). Однако наблюдения па-

циентов с остеоартрозом коленных суставов, получивших аутологичные ММСК из костного мозга на фибриновом клее, показали, что улучшение, наступающее через 6 мес. после процедуры, затем постепенно ослабевает. На конечном пятилетнем сроке наблюдения суставы всех испытуемых были на терминальной стадии остеоартроза, хотя и в лучшем состоянии по сравнению с исходным (Davatchi et al., 2016).

ММСК из жировой ткани, доступные в больших количествах после малоинвазивной операции липосакции, не могли не пройти оценку для использования в терапии инвалидных суставов. В эксперименте показано, что при индукции хондрогенной дифференцировки эти клетки, в отличие от ММСК из костного мозга, не склонны приобретать гипертрофический фенотип с последующей кальцификацией и апоптозом (Qomi et al., 2015). Тем не менее, клинические исследования применения ММСК из жировой ткани для пластики крупных дефектов ХТ сегодня отсутствуют (Di Matteo et al., 2019).

В немногочисленных исследованиях терапевтического действия этих клеток в основном оценивают перспективы лечения генерализованной потери ХТ при остеоартрозе и безопасность их внутрисуставного введения. Так, результаты рентгенологического, артроскопического и гистологического исследований через 6 мес. после процедуры подтвердили уменьшение размера дефекта ХТ медиальных мыщелков бедренной кости, гладкость поверхности регенерированного хряща и положительную иммуногистохимическую реакцию на коллаген типа II (Jo et al., 2016). При однократной инъекции ММСК жировой ткани третьего пассажа в коленный сустав при остеоартрозе авторы другого исследования не наблюдали значимой регенерации, однако площадь дефекта не увеличивалась в течение последующих 6 мес. исследования в отличие от контрольной группы при адекватном сохранении функциональности и снижении болевого синдрома (Lee et al., 2019). Оценивая результаты хондропластики с применением ММСК жировой ткани на экспериментальных моделях остеоартроза и в клинике, ряд исследователей отмечают положительное влияние, сравнимое с таковым при микрофрактурировании и, как правило, состоящее в стабилизации патологического процесса, обусловленной паракринным влиянием трансплантированных ММСК (Kuroda et al., 2015; Ceylan et al., 2016; Hashimoto et al., 2019).

Таким образом, в целом, несмотря на противоречивость результатов использования определенных видов клеток при хондропатиях различного генеза, можно считать доказанными безопасность и эффективность клеточной терапии при малых дефектах ХТ, а противоречия принять как следствие различий в пролиферативном и дифференцировочном потенциале ММСК из разных источников и у пациентов разных возрастных групп (Roobrouck et al., 2008).

Тем не менее, восстановление крупных хондральных и остеохондральных дефектов без потери функциональности сегодня все еще невозможно. В свете описанных выше работ перспективы развития хондропластики будут сопряжены, очевидно, с использованием ТИК, достаточных для долговременного функционирования *in vivo* за счет сочетания клеточного компонента и носителя, в комбинации, оптимальной для жизнедеятельности клеток (Новочадов, 2013; Lo Monaco et al., 2018; Zhu et al., 2018). Кроме того, в рамках персонифицированного подхода врачу необходимо предоставить выбор как клеточного материала, так и носителя для его иммобилизации с учетом характера, локализации и площади дефекта.

Сегодня для пластики ХТ предложено множество носителей с разными механическими свойствами и структурой, сочетание которых с разными видами клеток, возможно, позволит решить эту задачу.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ТИК ДЛЯ ПЛАСТИКИ ХТ

В связи с большим разнообразием дефектов в хондропластике используют как гелеобразные, так и плотные ТИК, плоские и объемные. В общем случае они должны быть биосовместимы и биорезорбируемые, причем скорость резорбции должна быть сопоставима со скоростью формирования новой ХТ, а продукты распада не влиять на жизнедеятельность клеток. Эти свойства ТИК определяются материалом, выбранным для иммобилизации клеток, который в составе ТИК получает название носителя. Сегодня в клинической практике и в доклинических испытаниях уже прошли оценку большое количество носителей, которые удобно разделить, исходя из источника полимерного материала для их формирования на носители биологического или синтетического происхождения.

Носители природного происхождения. Сегодня в клиниках для хондропластики наиболее активно используются носители из белков ВКМ, самым распространенным из которых и полностью достаточным для адгезии и поддержания активности хондроцитов и ММСК, является коллаген типа I, хотя его способность стимулировать хондрогенез по сравнению с коллагеном типа II явно ниже (Irawan et al., 2018). Так, спустя 16 нед. после имплантации под кожу иммунокомпетентным мышам бесклеточного носителя из коллагена типа I, в клетках, его инфильтрирующих, отмечали нарастание экспрессии специфичных для хондроцитов генов *COL2A1* и *COL1A1*. Однако через 32 нед. пребывания ТИК *in vivo* хрящеподобная ткань в ней отсутствовала (Calabrese et al., 2017). Таким образом, авторы наблюдали отрицательный при среднесрочном периоде наблюдения результат (Petri et al., 2013), подобный таковому при применении объемных носителей из коллагена типа I для закрытия дефектов площадью 5–6 см².

В настоящее время коллаген типа I сочетают с другими полимерами, стремясь приблизится к составу нативной ХТ. Единственным носителем для клинического применения в MACI и других подходах клеточной терапии, одобренным в США, является биорезорбируемая мембрана на основе коллагенов типов I и III. В экспериментальной хондропластике комбинация из коллагена I и фибрлина инициировала дифференцировку ММСК костномозгового происхождения *in vitro* в хондроциты с формированием хрящеподобной ткани в течение 3 нед. (Deponti et al., 2013). Носители, совмещающие коллагены типов I и II и заселенные ММСК из КМ, через 2 мес. культивирования *in vitro* приобретали морфологические признаки ХТ (Sanjurjo-Rodríguez et al., 2017).

Сочетание коллагена и с другими белками ВКМ в характерном для гиалинового хряща соотношении обеспечивают носители, изготовленные из децеллюляризованной нативной ХТ (ДЦТ), т.е. неиммуногенного ВКМ. Подтверждено, что после децеллюляризации структура ВКМ остается практически неизменной, а реакция на коллаген II и протеогликаны – положительной (Mohammadie et al., 2017). В этой связи есть основания считать, что ДЦТ сохраняет сигнальные молекулы, способные инициировать рецеллюляризацию ткани органотканеспецифическими клетками, их адгезию, дифференцировку, пролиферацию и, в конечном итоге, формирование естественного ВКМ и ХТ в целом (Александров и др., 2017; Cheng et al., 2019). Кроме того, носители из ДЦТ препятствуют прорастанию сосудов в новообразованную ткань, тем самым замедляя развитие воспалительного ответа с сопутствующей минерализацией очага (Choi et al., 2012).

Для получения ДЦТ используют ферментно-дегидратную обработку, выщелачивание, глубокую заморозку и другие приемы. По растяжимости такие носители сопоставимы с синтетическими, хотя и уступают по показателю предела прочности на разрыв, а содержание тканеспецифичных белков сопоставимо с ВКМ той же ткани после лиофилизации (Oh et al., 2018; Jiang et al., 2018). Однако для клинического исследования подобный продукт должен быть не только эффективным в использовании, но и стандартизован по критериям безопасности, особенно учитывая возможность его алло- и даже ксеногенного происхождения, что значительно затрудняет развитие технологий с его применением (Pei et al., 2011; Шехтер и др., 2015; Chen, Liu, 2016; Cheng et al., 2019).

Применение для хондропластики технологий MACI, рассматривавшееся как очень перспективное направление, стимулировало исследования по использованию в качестве носителей большого количества других полимеров природного происхождения. Сегодня к клиническому применению в Европе и Азии уже разрешены более 10 носителей на основе полимеров гиалуроновой кислоты, фибрлина, желе-

тина, хитозана, фиброна шелка и т.д. Получая композитные материалы, сочетающие несколько полимеров, удается не только нивелировать отрицательные свойства отдельных составляющих, но и задать новые, обеспечивающие успешное формирование ткани *de novo*.

Так, хитозан, катионный полисахарид, получаемый из хитина, прочен, но не обеспечивает хорошей адгезии клеток и при введении в гладкую мышечную ткань вызывает асептическое воспаление и выраженный спаечный процесс (Попрядухин и др., 2016). Однако носитель, сочетающий в себе хитозан и фибрин, обладает достаточными механическими и за счет фибрина адгезивными свойствами (Moutos, Guilak, 2008), а носитель на основе хитозана и желатина обеспечивает активную пролиферацию хондроцитов и высокую степень секреции тканеспецифичных белков ВКМ (Whu et al., 2013).

Носители из желатина отвечают требованиям механической достаточности, обладают хорошими адгезивными свойствами, но ВКМ, формируемый *in vivo* иммобилизованными ММСК, не соответствует таковому ХТ (Awad et al., 2004). Тем не менее, высокая гигроскопичность материала, способствующая увеличению объема *in vivo*, предопределила уместность его использования при решении проблемы недостаточной интеграции имплантированных хондроцитов с тканью реципиента. Так, через 6 мес. после пластики цилиндрического остеохондрального дефекта мыщелка бедра кролика желатиновым носителем с аутологичными хондроцитами отмечали равномерное распределение клеток в носителе, сохранение ими нормального фенотипа, а также секрецию функциональных компонентов ВКМ, а морфометрический анализ выявил выраженную интеграцию имплантатов с тканью реципиента (Wang et al., 2016).

Помимо желатиновых, высокой гигроскопичностью обладают носители из обогащенной тромбоцитами плазмы, содержащие ростовые факторы, хемоаттрактанты и др., значимые для адаптации и стабилизации фенотипа клеток соединения. Так, удалось получить положительный результат замещения дефекта (12 mm^2) ХТ коленного сустава кролика, не захватывающего субхондральный участок кости, используя носитель из обогащенных тромбоцитами плазмы, заселенный аутологичными ММСК КМ (Xie et al., 2012). Через 12 мес. после имплантации дефект был выполнен сформированной *de novo* ХТ, вследствие, по мнению авторов, стимуляции хондрогенеза эндогенными факторами роста TGF- β , IGF, VEGF и FGF, содержащимися в плазме. Конечно, очень привлекательной стороной ТИК, предложенной исследователями, является использование доступного и при этом безопасного аутогенного материала.

Ши с соавторами для иммобилизации ММСК костномозгового происхождения предложили изготовленный методом трехмерной печати длительно

резорбируемый носитель из фиброна шелка и желатина, полагая, что такое сочетание обеспечит оптимальную для пролиферации, дифференцировки и производства ВКМ трехмерную структуру (Shi et al., 2017). Существенно, что фиброн шелка может не только выполнять роль собственно носителя, но и барьера, препятствующего проникновению в полость дефекта сгустков крови – индукторов формирования и прорастания капилляров (Нащекина и др., 2016).

Интерес для хондропластики представляют и носители из фиброна и полимеров гиалуроновой кислоты. ТИК, включающая ММСК из костного мозга, иммобилизованные на таком носителе, оказалась достаточной при замещении дефекта медиально-латерального мышцелка бедренной кости у собак (Li et al., 2018) и показала эффективность в III фазе клинических испытаний в среднесрочном, до 3 лет, периоде. Носитель на основе фиброна, обеспечивающий минимально инвазивный – инъекционный – способ лечения дефектов ХТ, производят в Южной Корее (Solouk et al., 2014). Он рекомендован для пластики остеохондральных дефектов глубиной до 1 см, способствуя формированию у 80% его реципиентов гиалиноподобного хряща в течение 1 г. в случае применения в АСТ (Kim et al., 2010). Однако использование его для иммобилизации ММСК жировой ткани или клеток аутогенной мононуклеарной фракции костного мозга не показало ожидаемого результата вследствие, как предположили авторы, недостаточной продолжительности исследования (Kim et al., 2010).

Таким образом, носители из материалов природного происхождения достаточны для замещения глубоких очаговых дефектов ХТ. В этой связи очень перспективным выглядит использование материалов гелевой консистенции в сочетании с технологиями трехмерной печати, поскольку оно позволяет напрямую формировать зоны нативной ткани, варьируя плотность клеток, иммобилизуемых в гомогенной среде и высвобождение стимулирующих факторов (Bhat et al., 2011; Recha-Sancho, Semino, 2016; Пелешок и др., 2018). Однако при площади дефекта более 5 см² использование гелей и плоских мембран проблематично – на раннем этапе регенерации формируется неустойчивая к нагрузкам хрящеподобная фиброзная ткань (Айрапетов и др., 2017), а в дальнейшем деформированная шероховатая поверхность, провоцирующая хронизацию патологического процесса (Kim et al., 2015). Также вполне очевидно, что применение таких носителей возможно при наличии плотной окружающей ткани и, конечно, неуместно при отсутствии таковой, например, при септопластике (Fulco et al., 2014).

Синтетические полимеры для хондропластики. В ряде случаев требуется каркас, выдерживающий нагрузку на трансплантат в период формирования собственного ВКМ. Эту роль могут выполнять только синтетические волокна, способность которых противостоять механическому сдавливанию и растяже-

нию делает их привлекательными для придания жесткости композитным носителям ТИК. Кроме того, синтетические полимеры пластичны и могут быть получены с учетом заданных физических и биохимических свойств носителя (Tang et al., 2015).

В этой связи нельзя не отметить предположение о гетерогенности расположения хондроцитов, предопределенной зональной биохимической и biomeханической неоднородностью ХТ и обоснованности учета этого положения при получении объемных носителей для хондропластики, отличающихся по размеру пор, диаметру фибрилл полимера и иным характеристикам (Pan et al., 2015; Moutos et al., 2016).

Интересна работа, в которой авторы, сравнивая результат пластики критического дефекта ХТ овцы аутологичными хондроцитами, засеянными на двухслойный носитель из поликапролактона и коллагеновую мембрану Chondro-Gide®, отметили полное закрытие дефекта спустя 19 мес., хотя ткань в обоих случаях была фиброзно-хрящевой (Shagemann et al., 2016). Похожие результаты описали и авторы, использовавшие для культивирования аутологичных хондроцитов свиньи двухслойный носитель из полимолочной и полигликоловой кислот, различающихся по размеру пор. Хондроциты в составе ТИК, имплантированной в остеохондральный дефект диаметром 3 мм, подготовленный тирамином для стимуляции интеграции ткани с носителем, сохраняли исходный фенотип в ХТ и подвергались трансдифференцировке в остеогенном направлении в костной ткани (Lin et al., 2019).

Однако в целом эффективность синтетических носителей для пластики ХТ оказывается ниже в сравнении с природными. Они и, возможно, продукты их резорбции инициируют *in vivo* неспецифическую реакцию на инородное тело с участием гигантских многоядерных клеток и нередко постимплантационным воспалением, апоптозом заселенных клеток и фиброзированием (Martinez-Diaz et al., 2010; Liu et al., 2017).

При этом даже сложные композитные носители не обеспечивают эффективной интеграции ТИК с тканями реципиента. Так, носитель из метакрилированного хондроитинсульфата поли(этиленгликоль)метилового эфира ε-капролактон-акрилоилхлорида и оксида графена, полностью соответствующий ВКМ ХТ по пористости, механической прочности, эластичности, коэффициенту набухания и электрической проводимости, спустя 18 нед после имплантации в инвалидный коленный сустав кролика оказался абсолютно недостаточным (Liao et al., 2015).

Перспективной в этой связи, возможно, окажется концепция армирования жесткими волокнами носителей с регулируемыми микроструктурами, механическими свойствами и скоростью биорезорбции, которая может стать эффективной платформой для разработки биомеханически функциональных имплантов для тканевой инженерии мягких тканей

(Pei et al., 2017). В рамках этой концепции наиболее интересными сегодня представляются композитные носители, совмещающие синтетические и природные материалы, выбор которых определяется объединением в одной конструкции заданных проектом биологических и физических свойств (Nava et al., 2016; Ahmadi et al., 2017).

Например, показано, что адгезию и инвазию хондроцитов внутрь носителя из поликапролактона можно усилить за счет поверхностных молекул адгезии коллагена типа I (Minur, Callanan, 2018). В другой работе предложен носитель из губок макропористого поливинилового спирта, поры которого заполнены метакрилированным хондроитин-сульфатом или метакрилированной гиалуроновой кислотой. После подкожной имплантации кроликам аутологичных хондроцитов на этом носителе авторы отмечали формирование хрящеподобной ткани (идентифицированной окрашиванием сафрином-О и положительной реакцией с антителом к коллагену типа II) предположив, что носитель может выступать как динамически перестраиваемое микроокружение благодаря биомиметически спроектированной зональной архитектуре (Kim et al., 2017).

Носитель, включающий фибрин, полигликолевую и полимолочную кислоты, а также нити полидиксансона, сегодня одобрен в Европе для применения при ACT (Ossendorf et al., 2007). Возможность его использования в MACI и ТИК для пластики критических дефектов ХТ оценивают сегодня в доклинических исследованиях.

Таким образом, в перспективе можно будет говорить о дизайне многофазной ТИК, учитывающем, в частности, степень риска вмешательства, размеры дефекта, место имплантации, необходимую микрархитектонику несущего материала, необходимость клеточного компонента и потребность в дополнительных биологических факторах. В общем случае, при пластике крупных дефектов ХТ носитель для персонифицированных ТИК будет представлять собой устойчивый к механическим воздействиям, в зависимости от глубины дефекта одно- или многослойный каркас из синтетических биорезорбируемых материалов с требуемой скоростью деградации, помещенный в гелеподобный материал природного происхождения, способный инициировать синтез компонентов ВКМ иммобилизованным клетками, а также обеспечить миграцию в ТИК собственных клеток реципиента.

Сегодня уже вполне очевидно, что аутологичных хондроцитов недостаточно для того, чтобы заселить подобные ТИК, а культивируемые ММСК не обеспечивают синтез компонентов ВКМ в нужном количестве и в сроки, сопоставимые со сроком резорбции ТИК (Gobbi et al., 2015). В этом контексте понятен поиск путей повышения хондрогенного потенциала ММСК, включающий несколько направлений.

Клеточный материал для ТИК. Первое направление в своей основе имеет положение о хондроцит-стимулирующем действии ММСК, трансплантированных в инвалидный сустав. В экспериментах *in vitro* действительно показан больший терапевтический потенциал клеточного продукта совместного культивирования хондроцитов и ММСК.

В стремлении выяснить механизм данного феномена авторы отметили, что стимуляция хондрогенеза при совместном культивировании не зависит от происхождения ММСК, а агрекан синтезируется только хондроцитами, очевидно, как клетками-мишениями трофического влияния продуктов секреции ММСК. В этой связи авторы не исключают, что замена до 80% хондроцитов в составе клеточного продукта на ММСК не повлияет на формирование и стабильность синтезируемого *de novo* тканеспецифичного ВКМ. Исследователи считают, что оставшихся хондроцитов достаточно для синтеза ВКМ в условиях кооперативного взаимодействия (Liang et al., 2014; Pleusmeekers et al., 2018).

Наблюдаемое синергетическое влияние, вероятнее всего, опосредуется экзосомами, увеличивающими метаболическую активность и экспрессию генов через аденоzin-зависимую активацию сигнальных путей протеинкиназ PI3K-Akt и MAP (митоген-активированных) (Arenaccio et al., 2019). Первая значимая реакция клеток на взаимодействие с экзосомами обнаруживается уже через 24 ч. В этой связи становится понятно, почему обработка инвалидного хряща супензией, содержащей экзосомы ММСК, усиливает репаративную регенерацию, сопровождающую ростом инфильтрации CD163⁺ регенеративными макрофагами M2, но не CD86⁺ макрофагами M1, и снижением уровня провоспалительных синовиальных цитокинов IL-1 β и TNF- α (Zang et al., 2018). Эти наблюдения также демонстрируют, что эффективная регенерация остеохондральных дефектов предполагает участие по типу лиганд-рецепторного взаимодействия не только ансамбля клеток, но и их гуморальных посредников, в частности, экзосом.

В основу другого направления положены результаты исследований, допускающие возможность хондрогенной дифференцировки ММСК *in vitro*, то есть инициации экспрессии генов Sox9, COL2A1 и синтеза коллагена типа II при отсутствии синтеза коллагена типа X – маркера остеоартроза и клеток гипертрофического фенотипа, в ответ на действие дифференцировочных факторов (Salamon et al., 2014). Появление разрешенных к применению в клинической практике хондрогенных сред, содержащих индукторы хондрогенеза, предопределило развитие крупного направления дальнейших исследований (Tang et al., 2015). Так, при поиске оптимального срока прекондиционирования ММСК в среде с факторами хондрогенеза оказалось, что начало хондрогенной дифференцировки связано с инициацией примерно на 3 сут культивирования экспрессии

Sox9, продукт которого регулирует активность генов *COL2A1* (коллагена типа II) и *ACAN* (аггрекана) (Amin et al., 2014). Максимальный уровень экспрессии *Sox9* достигается примерно на 28-е сут культивирования, как показано для ММСК из ЖТ (Salamon et al., 2014). Другие авторы наблюдали окончание хондрогенной дифференцировки через 14 сут, когда экспрессия специфических генов хондрогенеза в культуре ММСК третьего пассажа достигала максимума (Qomi et al., 2015).

Технологии дифференциации клеток *in vitro* сегодня выглядят очень перспективно, однако, с одной стороны, они наиболее эффективны именно в объемных носителях, с другой – при трансплантации преддифференцированных клеток возникает та же проблема, что и в случае АСТ и МАСИ – необходимость адаптации к условиям в организме. Обе эти проблемы успешно могут быть решены в ходе созревания ТИК в биореакторах.

Прекондиционирование ТИК в условиях биореакторов. Объемное культивирование, нацеленное на обеспечение максимальной выживаемости засеянных клеток, а также формирование и поддержание уникальной микроархитектоники формируемой ткани, может стать основным этапом адаптации клеток, инициации и поддержания хондрогенеза (Ravichandran et al., 2018).

Именно биореакторы позволяют моделировать необходимые и критические для хондрогенеза показатели – напряжение углекислого газа, гидростатическое давление и др. (Wang et al., 2011; Советников и др., 2013), что предопределяет успех формирования тканеподобных ТИК *ex vivo*. Так, для костной ткани уже показана возможность формирования ткани на керамическом носителе через 21 сут культивирования ММСК костномозгового происхождения в остеогенной дифференцировочной среде в условиях напряжения, сопутствующего пребыванию остеоцитов *in vivo*, и динамической подачи культуральной среды в биореактор (Egger et al., 2017). Подтверждена возможность масштабирования тканеинженерной костной ткани до размеров, достаточных для трансплантации человеку с дефектом кости в 200 см³, сохранив при этом выживаемость и функциональность клеток на высоком уровне (Nguyen et al., 2016). Показано также ускорение хондрогенной дифференцировки ММСК из КМ на гелевом носителе в условиях перфузационного реактора с формированием на 16-е сут хрящеподобной ткани, что значительно превосходит результаты культивирования в монослое (Севастьянов и др., 2017).

Тем не менее, применение биореакторов в клинике сегодня, помимо высокой стоимости, ограничивается низкой воспроизводимостью получаемых ТИК вследствие, прежде всего, человеческого фактора. Высказано мнение, что фактором, определяющим подобную гетерогенность, может выступать время прекондиционирования ТИК в биореакторе

(Liu et al., 2017). Для импланта существует конкуренция между процессами анаболизма и катаболизма: если ТИК достаточно сформировалась *in vitro* (т.е. характеризуется накоплением обильного и компактно уложенного тканеспецифичного ВКМ на фоне выраженной деградации носителя), очень вероятно формирование функциональной ткани. Если же ТИК не достигла оптимального качества, итогом, скорее всего, станет апоптоз трансплантированных клеток и полная или частичная резорбция с последующим фиброгенезом. В этом отношении надежды на биореакторы, которые позволяют усилить секрецию белков ВКМ, минимизировать время пребывания ТИК *ex vivo*, даже с учетом стоимости прекондиционирования и ТИК в целом, вполне оправданы (Liu et al., 2017).

Дальнейшее совершенствование процедуры прекондиционирования ТИК в биореакторе сопряжено не только с активацией синтеза ВКМ, но и моделированием гистологических зон ХТ не только биохимическими, но и физическими методами, что дает надежду на моделирование морфогенеза ХТ *in vitro* и создание ТИК, максимально приближенной к оригинал. В конечном итоге, решение этой значимой задачи тканевой инженерии таит в себе реальные возможности создания биоинженерных органов и тканей, как альтернативы аллогенным трансплантатам.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

К настоящему времени усилиями медиков, химиков, биологов и биотехнологов проделана большая работа, направленная на разработку способов восстановления дефектов ХТ в клинике, хотя оптимальный баланс между высокотехнологичными решениями и потребностями клиницистов до сих пор не найден. Пока отсутствуют и четкие представления по применению того или иного носителя, вида клеточного материала, их комбинаций и использования в соответствии со стадией заболевания. Конечно, желанным результатом является моделирование условий естественного формирования ХТ *in vitro*. Определенные надежды возложены, во-первых, на появление композитных носителей для будущей биоинженерной ткани, отвечающих всем требованиям биосовместимости и повторяющих физические качества ниш нативного ВКМ на начальных этапах адаптации засеянных клеток. Во-вторых, на появление биореакторов, имитирующих в полной мере условия формирования ХТ *in vivo* в целях получения зонированной структуры, частично или полностью повторяющей морфологию нативной ткани и способной к успешной интеграции с тканью реципиента.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена по государственному заданию Санкт-Петербургского государственного педиатрическо-

го медицинского университета Министерства здравоохранения РФ.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

При выполнении работы экспериментов с участием животных или людей авторы не проводили.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Айрапетов Г.А., Воротников А.А., Коновалов Е.А. 2017. Методы хирургического лечения локальных дефектов гиалинового хряща крупных суставов. Журн. клинической и экспериментальной ортопедии им. Г.А. Илизарова. Т. 23. № 4. С. 485. (Ayrapetov G.A., Vorotnikov A.A., Konovalov E.A. 2017. Methods of surgical treatment of local defects of the hyaline cartilage of large joints. J. Clin. Exper. Orthop. G.A. Ilizarova. V. 23. № 4. P. 485.)*
- Александров В.Н., Кривенцов А.В., Михайлова Е.В., Фигуркина М.А., Соколова М.О., Юдин В.Е., Попрядухин П.В., Хубулава Г.Г. 2017. Протезы из децеллюляризованной аорты и биорезорбируемого материала в эксперименте *in vivo*. Вестник военно-медицинской академии. Т. 7. № 58. С. 120. (Alexandrov V.N., Kriventsov A.V., Mikhaylova E.V., Figurkina M.A., Sokolova M.O., Yudin V.E., Popryadukhin P.V., Khubulava G.G. 2017. Dentures from a decellularized aorta and bioresorbable material in an *in vivo* experiment. Bulletin of the Military Medical Academy. V. 7. № 58. P. 120.)*
- Божокин М.С., Божкова С.А., Нетылько Г.И. 2016. Возможности современных клеточных технологий для восстановления поврежденного суставного хряща. Аналитический обзор литературы. Травматология и ортопедия России. Т. 2. № 3. С. 122. (Bozhokin M.S., Bozhkova S.A., Netylko G.I. 2016. The possibilities of modern cellular technologies for the restoration of damaged articular cartilage. Analytical review of the literature. Traumatology and orthopedics of Russia. V. 2. № 3. P. 122.)*
- Макушин В.Д., Степанов М.А., Ступина Т.А. 2012. Экспериментальное моделирование остеоартроза коленного сустава у собак. Биомедицина. Т. 3. С. 108. (Makushin V.D., Stepanov M.A., Stupina T.A. 2012. Experimental modeling of osteoarthritis of the knee joint in dogs. Biomedicine. V. 3. P. 108.)*
- Нащекина Ю.А., Никонов П.О., Юдинцева Н.М., Нащекин А.В., Лихачев А.И., Москалок О.А., Юдин В.Е., Блинова М.И. 2016. Взаимодействие мезенхимных клеток костного мозга с нативными волокнами фиброна шелка. Цитология. Т. 58. № 11. С. 843. (Nashchekina Yu.A., Nikonorov P.O., Yudintseva N.M., Nashchekin A.V., Likhachev A.I., Moskalyuk O.A., Yudin V.E., Blinova M.I. 2016. Interaction of bone marrow mesenchymal cells with native silk fibroin fibers. Tsitologiya. V. 58. № 11. P. 843.)*
- Новочадов В.В. 2013. Проблема управления клеточным заселением и ремоделированием тканеинженерных матриц для восстановления суставного хряща. Биология и биотехнология. 1(5) : 19–28. (Novochadov V.V. 2013. The problem of managing cell population and remodeling of tissue engineering matrices for restoration of articular cartilage. Biology and biotechnology. 1(5) : 19–28.)*
- Пелешок С.А., Нагибович О.А., Титова М.В., Елисеева М.И., Коровин А.Е., Протасов О.В., Губанов А.П. 2018. Основные направления создания искусственного хряща. Клиническая патофизиология. 24(1) : 29–38. (Peleshok S.A., Nagibovich O.A., Titova M.V., Eliseeva M.I., Korovin A.E., Protasov O.V., Gubanov A.P. 2018. The main directions of creating artificial cartilage. Clinical pathophysiology. 24(1) : 29–38.)*
- Попрядухин П.В., Юкина Г.Ю., Суслов Д.Н., Добровольская И.П., Иванькова Е.М., Юдин В.Е. 2016. Биорезорбция пористых 3D-материалов на основе хитозана. Цитология. 58(10) : 771–777. (Popryadukhin P.V., Yukiina G.Yu., Suslov D.N., Dobrovolskaya I.P., Ivankova E.M., Yudin V.E. 2016. Bioresorption of porous 3D materials based on chitosan. Tsitobiologiya. 58(10) : 771–777.)*
- Севастьянов В.И., Басок Ю.Б., Григорьев А.М., Кирсанова Л.А., Васильтев В.Н. 2017. Применение технологии тканевой инженерии для формирования хрящевой ткани человека в проточном биореакторе. Вестник трансплантологии и искусственных органов. 19(3) : 81–92. (Sevastyanov V.I., Basok Yu.B., Grigoryev A.M., Kirsanova L.A., Vasilets V.N. 2017. The use of tissue engineering technology to form human cartilage in a flow bioreactor. Bulletin of transplantology and artificial organs. 19(3) : 81–92.)*
- Советников Н.Н., Кальсин В.А., Конопляников М.А., Муханов В.В. 2013. Клеточные технологии и тканевая инженерия в лечении дефектов суставной поверхности. Клиническая практика. 1 : 52–66. (Sovetnikov N.N., Kalsin V.A., Konoplyanikov M.A., Mukhanov V.V. 2013. Cell technology and tissue engineering in the treatment of articular defects. Clinical practice. 1 : 52–66.)*
- Шехтер А.Б., Гуллер А.Е., Истронов Л.П., Истронова Е.В., Бутнару Д.В., Винаров А.З., Захаркина О.Л., Курков А.В., Кантимеров Д.Ф., Антонов Е.Н., Марисов Л.В., Глыбочкино П.В. 2015. Морфология коллагеновых матриксов для тканевой инженерии в урологии (биосовместимость, биодеградация, тканевая реакция). Архив патологии. 77(6) : 29–38. (Shekhter A.B., Guller A.E., Istronov L.P., Istronova E.V., Butnaru D.V., Vinarov A.Z., Zakharkina O.L., Kurkov A.V., Kantimerov D.F., Antonov E.N., Marisov L.V., Glybochko P.V. 2015. Morphology of collagen matrices for tissue engineering in urology (biocompatibility, biodegradation, tissue reaction). Pathology Archive. 77(6) : 29–38.)*
- Ahmadi F., Giti R., Mohammadi-Samani S., Mohammadi F. 2017. Biodegradable scaffolds for cartilage tissue engineering. GMJ. 6 : 70–80.*
- Akgun I., Unlu M.C., Erdal O.A., Ogut T., Erturk M., Ovali E., Kantarcı F., Caliskan G., Akgun Y. 2015. Matrix-induced autologous mesenchymal stem cell implantation versus matrix-induced autologous chondrocyte implantation in*

- the treatment of chondral defects of the knee: a 2-year randomized study. *Arch. Orthop. Trauma Surg.* 135 : 251–263.
- Amin H.D., Brady M.A., St-Pierre J.P., Stevens M.M., Overby D.R., Ethier C.R.* 2014. Stimulation of chondrogenic differentiation of adult human bone marrow-derived stromal cells by a moderate-strength static magnetic field. *Tissue Eng. Part A.* 20 : 1612–1619.
- Angele P., Fritz J., Albrecht D., Koh J., Zellner J.* 2015. Defect type, localization and marker gene expression determines early adverse events of matrix-associated autologous chondrocyte implantation. *Injury.* 46 (Suppl. 4) : S2–S9.
- Arenaccio C., Chiozzini C., Ferrantelli F., Leone P., Olivetta E., Federico M.* 2019. Exosomes in therapy: engineering, pharmacokinetics and future applications. *Curr. Drug Targets.* 20 : 87–95.
- Awad H.A., Wickham M.Q., Leddy H.A., Gimble J.M., Guilak F.* 2004. Chondrogenic differentiation of adipose-derived adult stem cells in agarose, alginate and gelatin scaffolds. *Biomaterials.* 25 : 3211–3222.
- Bhat S., Tripathi A., Kumar A.* 2011. Supermacroporous chitosan–agarose–gelatin cryogels: in vitro characterization and in vivo assessment for cartilage tissue engineering. *J. R. Soc. Interface.* 8 : 540–554.
- Bianchi V.J., Weber J.F., Waldman S.D., Backstein D., Kandel RA.* 2017. Formation of hyaline cartilage tissue by passaged human osteoarthritic chondrocytes. *Tissue Eng. Part A.* 23 : 156–165.
- Browne J.E., Anderson A.F., Arciero R., Mandelbaum B., Moseley J.B. Jr., Micheli L.J., Fu F., Ergenel C.* 2005. Clinical outcome of autologous chondrocyte implantation at 5 years in US subjects. *Clin. Orthop. Relat. Res.* 436 : 237–245.
- Calabrese G., Gulino R., Giuffrida R., Forte S., Figallo E., Fabbi C., Salvatorelli L., Memeo L., Gulisano M., Parenti R.* 2017. In vivo evaluation of biocompatibility and chondrogenic potential of a cell-free collagen-based scaffold. *Front. Physiol.* 8 : 984.
- Cengiz I.F., Pereira H., de Girolamo L., Cuccharini M., Espregueira-Mendes J., Reis R.L., Oliveira J.M.* 2018. Orthopaedic regenerative tissue engineering en route to the holy grail: disequilibrium between the demand and the supply in the operating room. *J. Exp. Orthop.* 5 : 14.
- Ceylan H.H., Bilsel K., Buyukpinarbasili N., Ceylan H., Erdil M., Tuncay I., Sen C.* 2016. Can chondral healing be improved following microfracture? The effect of adipocyte tissue derived stem cell therapy. *The Knee.* 23 : 442–449.
- Chen F.M., Liu X.* 2016. Advancing biomaterials of human origin for tissue engineering. *Prog. Polym. Sci.* 53 : 86–168.
- Cheng A., Schwartz Z., Kahn A., Li X., Shao Z., Sun M., Ao Y., Boyan B.D., Chen H.* 2019. Advances in porous scaffold design for bone and cartilage tissue engineering and regeneration. *Tissue Eng. Part B.* 25 : 14–29.
- Choi K.-H., Song B.R., Choi B.H., Lee M., Park S.R., Min B.-H.* 2012. Cartilage tissue engineering using chondrocyte-derived extracellular matrix scaffold suppressed vessel invasion during chondrogenesis of mesenchymal stem cells *in vivo*. *Tissue Eng. Regen. Med.* 9 : 43–50.
- Davatchi F., Sadeghi Abdollahi B., Mohyeddin M., Nikbin B.* 2016. Mesenchymal stem cell therapy for knee osteoarthritis: 5 years follow-up of three patients. *Int. J. Rheum. Dis.* 19 : 219–225.
- De Bari C., Dell'Accio F., Tylzanowski P., Luyten F.P.* 2001. Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane. *Arthritis Rheum.* 44 : 1928–1942.
- Deponti D., Di Giancamillo A., Gervaso F., Domenicucci M., Domeneghini C., Sannino A., Peretti G.M.* 2013. Collagen scaffold for cartilage tissue engineering: the benefit of fibrin glue and the proper culture time in an infant cartilage model. *Tissue Eng. Part A.* 20 : 1113–1126.
- Di Matteo B., El Araby M.M., D'Angelo A., Iacono F., Nannini A., Vitale N.D., Marcacci M., Respizzi S., Kon E.* 2019. Adipose-derived stem cell treatments and formulations. *Clin. Sports Med.* 38 : 61–78.
- Dominici M., Le Blanc K., Mueller I., Slaper-Cortenbach I., Marini F., Krause D., Deans R., Keating A., Prockop Dj., Horwitz E.* 2006. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy.* 8 : 315–317.
- Egger D., Fischer M., Clementi A., Ribitsch V., Hansmann J., Kasper C.* 2017. Development and characterization of parallelizable perfusion bioreactor for 3D cell culture. *Bioengineering (Basel).* <https://doi.org/10.3390/bioengineering4020051>
- Flanigan D.C., Everhart J.S., Early N.A.* 2018. Autologous chondrocyte implantation: scaffold-based solutions. In: *Cartilage repair and regeneration.* Budapest, IntechOpen, 43–162.
- Fulco I., Miot S., Haug M.D., Barbero A., Wixmerten A., Feliciano S., Wolf F., Jundt G., Marsano A., Farhadi J., Heberer M., Jakob M., Schaefer D.J., Martin I.* 2014. Engineered autologous cartilage tissue for nasal reconstruction after tumor resection: an observational first-in-human trial. *The Lancet.* 384 : 337–346.
- Gobbi A., Chaurasia S., Karnatzikos G., Nakamura N.* 2015. Matrix-induced autologous chondrocyte implantation versus multipotent stem cells for treatment of large patellofemoral chondral lesions: A nonrandomized prospective trial. *Cartilage.* 6 : 82–97.
- Gudas R., Kalesinskas R.J., Kimtys V., Stankevicius E., Toliusis V., Bernotavicius G., Smailys A.* 2005. A prospective randomized clinical study of mosaic osteochondral autologous transplantation versus microfracture for the treatment of osteochondral defects in the knee joint in young athletes. *Arthroscopy.* 21 : 1066–1075.
- Hashimoto Y., Nishida Y., Takahashi S., Nakamura H., Mera H., Kashiwa K., Yoshiya S., Inagaki Y., Uematsu K., Tanaka Y., Asada S., Akagi M., Fukuda K., Hosokawa Y., Myoui A., Kamei N., Ishikawa M., Adachi N., Ochi M., Wakitani S.* 2019. Transplantation of autologous bone marrow-derived mesenchymal stem cells under arthroscopic surgery with microfracture versus microfracture alone for articular cartilage lesions in the knee: A multicenter prospective randomized control clinical trial. *Regen. Ther.* 11 : 106–113.
- Hu Z., Yik J.H., Cissell D.D., Michelier P.V., Athanasiou K.A., Haudenschild D.R.* 2015. Inhibition of CDK9 prevents mechanical injury-induced inflammation, apoptosis and deg-

- radiation in cartilage explants. European Cells and Materials. 30 : 200–209.
- Jiang D., Zhang Z., Zhao F., Wang S., Qi Y., Zhao L., Zhang J., Yu J. 2018. The radiated deep-frozen xenogenic meniscal tissue regenerated the total meniscus with chondroprotection. Sci. Rep. 8 : 9041.
- Jo C.H., Lee Y.G., Shin W.H., Kim H., Chai J.W., Jeong E.C., Kim J.E., Shim H., Shin J.S., Shin I.S., Ra J.C., Oh S., Yoon K.S. 2014. Intra-articular injection of mesenchymal stem cells for the treatment of osteoarthritis of the knee: A proof-on-concept clinical trial. Stem Cells. 32 : 1254–1266.
- Irawan V., Sung T.C., Higuchi A., Ikoma T. 2018. Collagen scaffolds in cartilage tissue engineering and relevant approaches for future development. Tissue Eng. Regen. Med. 15 : 673–697.
- Kim H.D., Lee Y., Kim Y., Hwang Y., Hwang N.S. 2017. Biometrically reinforced polyvinyl alcohol-based hybrid scaffolds for cartilage tissue engineering. Polymers. 9 : 655.
- Kim M.K., Choi S.W., Kim S.R., Oh I.S., Won M.H. 2010. Autologous chondrocyte implantation in the knee using fibrin. Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy. 18 : 528–534.
- Kim Y.S., Choi Y.J., Suh D.S., Heo D.B., Kim Y.I., Ryu J.S., Koh Y.G. 2015. Mesenchymal stem cell implantation in osteoarthritic knees: Is fibrin glue effective as a scaffold? Am. J. Sports Med. 43 : 176–185.
- Knutsen G., Drogset J.O., Engebretsen L., Grøntvedt T., Ludvigsen T.C., Løken S., Solheim E., Strand T., Johansen O. 2016. A randomized multicenter trial comparing autologous chondrocyte implantation with microfracture: Long – term follow – up at 14 to 15 years. Bone Joint Surg. Am. 98 : 1332–1339.
- Kuroda K., Kabata T., Hayashi K., Maeda T., Kajino Y., Iwai S., Fujita K., Hasegawa K., Inoue D., Sugimoto N., Tsuchiya H. 2015. The paracrine effect of adipose-derived stem cells inhibits osteoarthritis progression. BMC Musculoskeletal Disorders. 16 : 1–10.
- Lee W.S., Kim H.J., Kim K.I., Kim G.B., Jin W. 2019. Intra-articular injection of autologous adipose tissue-derived mesenchymal stem cells for the treatment of knee osteoarthritis: a phase IIb, randomized, placebo-controlled clinical trial. Stem Cells Transl. Med. 8 : 504–511.
- Lee W.Y., Wang B. 2017. Cartilage repair by mesenchymal stem cells: Clinical trial update and perspectives. J. Orthop. Translation. 9 : 76–88.
- Li J., Cheng L., Zhao Y.P., Guo Y.J., Liu Y., Zhang W., Wang S.S., Zhang Y.Q., Pan X., Nie L. 2015. ADAMTS exhibits elevated expression in cartilage of osteonecrosis of femoral head and has positive correlation with TNF- α and NF- κ B P65. Mediators Inflamm. 2015 : 196702.
- Li L., Duan X., Fan Z., Chen L., Xing F., Xu Z., Chen Q., Xiang Z. 2018. Mesenchymal stem cells in combination with hyaluronic acid for articular cartilage defects. Sci. Reports. 8 : 9900.
- Liang X., Ding Y., Zhang Y., Tse H.F., Lian Q. 2014. Paracrine mechanisms of mesenchymal stem cell-based therapy: current status and perspectives. Cell Transpl. 23 : 1045–1059.
- Liao J.F., Qu Y., Chu B.Y., Zhang X.N., Qian Z.Y. 2015. Biodegradable CSMA/PECA/graphene porous hybrid scaffold for cartilage tissue engineering. Scientific Reports. 5 : 9879.
- Lin T.-H., Wang H.C., Cheng W.H., Hsu H.C., Yeh M.L. 2019. Osteochondral tissue regeneration using a tyramine-modified bilayered PLGA scaffold combined with articular chondrocytes in a porcine model. Int. J. Mol. Sci. 20 : E326.
- Liu Y., Li D., Yin Z., Luo X., Liu W., Zhang W., Zhang Z., Cao Y., Liu Y., Zhou G. 2017. Prolonged in vitro precultivation alleviates post-implantation inflammation and promotes stable subcutaneous cartilage formation in a goat model. Biomedical Materials. 12 : 015006.
- Lo Monaco M., Merckx G., Ratajczak J., Gervois P., Hilkens P., Clegg P., Bronckaers A., Vandeweerd J.-M., Lambrechts I. 2018. Stem cells for cartilage repair: preclinical studies and insights in translational animal models and outcome measures. Stem Cells Int. 2018 : 907–953.
- Martinez-Diaz S., Garcia-Giralt N., Lebourg M., Gómez-Tejedor J.A., Vila G., Caceres E., Benito P., Pradas M.M., Nogues X., Ribelles J.L., Monllau J.C. 2010. In vivo evaluation of 3-dimensional polycaprolactone scaffolds for cartilage repair in rabbits. Am. J. Sports Medicine. 38 : 509–519.
- Mohammadi Z.M., Parivar K., Shahri N.M., Fereidoni M., Hayati-Roodbari N. 2018. Decellularized bovine articular cartilage matrix reinforced by carboxylated-SWCNT for tissue engineering application. Braz. Arch. Biol. Technol. 60 : <https://doi.org/10.1590/1678-4324-2017160083>
- Moran C.J., Pascual-Garrido C., Chubinskaya S., Potter H.G., Warren R.F., Cole B.J., Rodeo S.A. 2014. Restoration of articular cartilage. J. Bone & Joint Surg. 96 : 336–344.
- Moutos F.T., Guilak F. 2008. Composite scaffolds for cartilage tissue engineering. Biorheology. 45 : 501–512.
- Moutos F.T., Glass K.A., Compton S.A., Ross A.K., Gersbach C.A., Guilak F., Estes B.T. 2016. Anatomically shaped tissue-engineered cartilage with tunable and inducible anticytokine delivery for biological joint resurfacing. PNAS. 113 : 4513–4522.
- Munir N., Callanan A. 2018. Novel phase separated polycaprolactone/collagen scaffolds for cartilage tissue engineering. Biomed. Materials. 13 : 1–20.
- Nava M.M., Draghi L., Giordano C., Pietrabissa R. 2016. The effect of scaffold pore size in cartilage tissue engineering. J. Appl. Biomater. Funct. Mater. 14 : 223–229.
- Nguyen B.N., Ko H., Moriarty R.A., Etheridge J.M., Fisher J.P. 2016. Dynamic bioreactor culture of high volume engineered bone tissue. Tissue Eng. Part A. 22 : 263–271.
- O'Conor C.J., Case N., Guilak F. 2013. Mechanical regulation of chondrogenesis. Stem Cells Research and Therapy. 4 : 1–13.
- Oh H.J., Kim S.H., Cho J.-H., Park S.H., Min B.H. 2018. Mechanically reinforced extracellular matrix scaffold for application of cartilage tissue engineering. Tissue Eng. Regen. Med. 15 : 287–299.
- Ossendorf C., Kaps C., Kreuz P.C., Burmester G.R., Sittoner M., Erggelet C. 2007. Treatment of posttraumatic and focal osteoarthritic cartilage defects of the knee with autologous polymer-based three-dimensional chondrocyte grafts: 2-year clinical results. Arthritis Res. Ther. 9 : R41.

- Ozeki N., Muneta T., Koga H., Nakagawa Y., Mizuno M., Tsuji K., Mabuchi Y., Akazawa C., Kobayashi E., Matsumoto K., Futamura K., Saito T., Sekiya I. 2016. Not single but periodic injections of synovial mesenchymal stem cells maintain viable cells in knees and inhibit osteoarthritis progression in rats. *Osteoarthritis Cartilage.* 24 : 1061–1070.
- Pan Z., Duan P., Liu X., Wang H., Cao L., He Y., Dong J., Ding J. 2015. Effect of porosities of bilayered porous scaffolds on spontaneous osteochondral repair in cartilage tissue engineering. *Regenerative Biomaterials.* 2 : 9–19.
- Patra D., Sandell L.J. 2012. Antiangiogenic and anticancer molecules in cartilage. *Expert Reviews in Molecular Medicine.* 14: 1–27.
- Pei B., Wang W., Fan Y., Wang X., Watari F., Li X. 2017. Fiber-reinforced scaffolds in soft tissue engineering. *Regen. Biomaterials.* 4 : 257–268.
- Pei M., He F., Wei L. 2011. Three-dimensional cell expansion substrate for cartilage tissue engineering and regeneration: a comparison in decellularized matrix deposited by synovium-derived stem cells and chondrocytes. *Tissue Sci. Eng.* 2 : 1–7.
- Petri M., Broese M., Simon A., Liodakis E., Ettinger M., Guenther D., Zeichen J., Krettek C., Jagodzinski M., Haasper C. 2013. CaReS (MACT) versus microfracture in treating symptomatic patellofemoral cartilage defects: A retrospective matched-pair analysis. *J. Orthop. Sci.* 18 : 38–44.
- Plieusmeekers M.M., Nimeskern L., Koevoet J.L.M., Karperien M., Stok K.S., van Osch G.J.V.M. 2018. Trophic effects of adipose-tissue-derived and bone-marrow-derived mesenchymal stem cells enhance cartilage generation by chondrocytes in co-culture. *PLoS ONE.* 13 : e0190744.
- Qomi R.T., Sheykhhassan M., Kalhor N., Ghiasi M. 2015. Chondrogenic differentiation of human adipose-derived mesenchymal stem cells using fibrin hydrogel scaffold. *J. Mazandaran Univ. Med. Sci.* 25 : 21–31.
- Rai V., Dilisio M.F., Dietz N.E., Agrawal D.K. 2017. Recent strategies in cartilage repair: A systemic review of the scaffold development and tissue engineering. *J. Biomed. Mat. Res.* 105 : 2343–2354.
- Ravichandran A., Liu Y., Teoh S.H. 2018. Review: bioreactor design towards generation of relevant engineered tissues: focus on clinical translation. *J. Tissue eng. Regen. Med.* 12 : e7–e22.
- Recha-Sancho L., Semino C.E. 2016. Chondroitin sulfate- and decorin-based self-assembling scaffolds for cartilage tissue engineering. *PLoS ONE.* 11 : e0157603.
- Roberts S., McCall I.W., Darby A.J., Menage J., Evans H., Harrison P.E., Richardson J.B. 203. Autologous chondrocyte implantation for cartilage repair: monitoring its success by magnetic resonance imaging and histology. *Arthritis Res. Ther.* 5 : 60–73.
- Roobrouck V.D., Ulloa-Montoya F., Verfaillie C.M. 2008. Self-renewal and differentiation capacity of young and aged stem cells. *Exp. Cell res.* 314 : 1937–1944.
- Salamon A., van Vlierberghe S., van Nieuwenhove I., Baudisch F., Graulus G.-J., Benecke V., Alberti K., Neumann H.-G., Ryckly J., Martins J.-C., Dubruel P., Peters K. 2014. Gelatin-based hydrogels promote chondrogenic differentiation of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells in vitro. *Materials (Basel).* 7 : 1342–1359.
- Sanjurjo-Rodríguez C., Castro-Viñuelas R., Hermida-Gómez T., Fuentes-Boquete M., Javier de Toro F.J., Blanco F.J., Díaz-Prado S.M. 2017. Human cartilage engineering in an *in vitro* repair model using collagen scaffolds and mesenchymal stromal cells. *Int. J. Med. Sci.* 14 : 1257–1262.
- Shi W., Sun M., Hu X., Ren B., Cheng J., Li C., Duan X., Fu X., Zhang J., Chen H., Ao Y. 2017. Structurally and functionally optimized silk-fibroin-gelatin scaffold using 3D printing to repair cartilage injury *in vitro* and *in vivo*. *Adv. Mater.* 29 : https://doi.org/10.1002/adma.201701089
- Shimomura K., Ando W., Moriguchi Y., Sugita N., Yasui Y., Kozumi K., Fujie H., Hart D.A., Yoshikawa H., Nakamura N. 2015. Next generation mesenchymal stem cell (MSC)-based cartilage repair using scaffold-free tissue engineered constructs generated with synovial mesenchymal stem cells. *Cartilage.* 6 : 13–29.
- Solouk A., Mirzadeh H., Amanpour S. 2014. Injectable scaffold as minimally invasive technique for cartilage tissue engineering: *in vitro* and *in vivo* preliminary study. *Prog. Biomater.* 3 : 143–151.
- Stockwell R.A. 1978. Chondrocytes. *J. Clin. Pathology.* 12 : 7–13.
- Tang X., Fan L., Pei M., Zeng L., Ge Z. 2015. Evolving concepts of chondrogenic differentiation: history, state-of-the art and future perspectives. *Eur. Cells and Materials.* 30 : 12–27.
- Wakitani S., Okabe T., Horibe S., Mitsuoka T., Saito M., Koyama T., Nawata M., Tensho K., Kato H., Uematsu K., Kuroda R., Kurosaka M., Yoshiya S., Hattori K., Ohgushi H. 2011. Safety of autologous bone marrow-derived mesenchymal stem cell transplantation for cartilage repair in 41 patients with 45 joints followed for up to 11 years and 5 months. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* 5 : 146–50.
- Wang C.C., Yang K.C., Lin K.H., Liu H.C., Lin F.H. 2011. A highly organized three-dimensional alginate scaffold for cartilage tissue engineering prepared by microfluidic technology. *Biomaterials.* 32 : 7118–7126.
- Wang C.C., Yang K.C., Lin K.H., Liu Y.L., Yang Y.T., Kuo T.F., Chen I.H. 2016. Expandable scaffold improves integration of tissue-engineered cartilage: an *in vivo* study in a rabbit model. *Tissue Eng. Part A.* 22 : 873–884.
- Wang D., Chen S., Esterban M., Tortorella M. 2015. Cartilage tissue engineering using ADAMTS-4/5 deficient mesenchymal stem cells. *Osteoarthritis and cartilage.* 23 : abstract 205.
- Whu S.W., Hung K.C., Hsieh K.H., Chen C.H., Tsai C.L., Hsu S.H. 2013. *In vitro* and *in vivo* evaluation of chitosan-gelatin scaffolds for cartilage tissue engineering. *Mater. Sci. Eng. C. Mater. Biol. Appl.* 33 : 2855–2863.
- Wondrasch B., Risberg M.A., Zak L., Marlovits S., Aldrian S. 2015. Effect of accelerated weightbearing after matrix-associated autologous chondrocyte implantation on the femoral condyle: A prospective, randomized controlled study presenting MRI-based and clinical outcomes after 5 years. *Am. J. Sports Medicine.* 43 : 146–153.
- Xie X., Wang Y., Zhao C., Guo S., Liu S., Jia W., Tuan R.S., Zhang C. 2012. Comparative evaluation of MSCs from bone

- marrow and adipose tissue seeded in PRP-derived scaffold for cartilage regeneration. *Biomaterials*. 33 : 7008–7018.
- Zhang S., Chuah S.J., Lai R.C., Hui J.H.P., Lim S.K., Toh W.S. 2018. MSC exosomes mediate cartilage repair by enhancing proliferation, attenuating apoptosis and modulating immune reactivity. *Biomaterials*. 156 : 16–27.
- Zhang Y., Pizzute T., Pei M. 2014. Anti-inflammatory strategies in cartilage repair. *Tissue Engineering*. 20 : 655–668.
- Zhu D., Tong X., Trinh P., Yang F. 2018. Mimicking cartilage tissue zonal organization by engineering tissue-scale gradient hydrogels as 3D cell niche. *Tissue Engineering Part A*. 24 : 1–10.

CELL TECHNOLOGIES IN CARTILAGE REGENERATION

**V. N. Aleksandrov^{a, b, *}, M. O. Sokolova^a, A. V. Komarov^c, E. V. Mikhailova^{b, d},
A. A. Kokorina^a, and A. V. Kriventsov^a**

^a*Laboratory of Tissue Engineering, Kirov Military Medical Academy, Ministry of Defense of Russia,
St. Petersburg, 194044 Russia*

^b*Laboratory of Experimental Surgery, St. Petersburg State Pediatric University, Ministry of Health of the Russian Federation,
St. Petersburg, 194100 Russia*

^c*Military Hospital 425, branch № 2, Ministry of Defense of Russia, Krasnoyarsk, 660017 Russia*

^d*Institute of Cytology RAS, St. Petersburg, 194064 Russia*

*e-mail: vnaleks9@yandex.ru

The damages of cartilage (CT) remain an important clinical problem, characterized by a decrease in the quality of life, severe pain, limited function and, in the case of extensive lesions, mobility and deep disability. Microfracturing and abrasive chondroplasty, methods of activating reparative regeneration in many cases lead to the formation of tissue inferior to the properties of the native one. In this regard, the development of personalized tissue-engineering structures, including cells and a scaffold selected specifically to replace cartilage defects of different severity and clinical manifestations, seems to be very relevant. This review discusses various types of cells and scaffolds in the context of ideas about biochemical and mechanical factors that can stimulate chondrogenesis *in vivo*. Advantages and disadvantages of scaffolds of biological and synthetic origin are examined according to the criteria of biocompatibility, immunogenicity, mechanical strength, stability, adhesiveness. It has been shown that currently the most promising scaffolds are composite ones, combining materials of biological and synthetic origin and preferably populated by autologous cells.

Keywords: cartilage tissue, chondrogenesis, multipotent mesenchymal stromal cells, tissue engineering, carrier, extracellular matrix, bioreactor