

## ВОЗМОЖНОСТИ СОВРЕМЕННЫХ КЛЕТОЧНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ ДЛЯ ВОССТАНОВЛЕНИЯ ПОВРЕЖДЕННОГО СУСТАВНОГО ХРЯЩА (аналитический обзор литературы)

М.С. Божокин, С.А. Божкова, Г.И. Нетылько

ФГБУ «Российский научно-исследовательский институт травматологии и ортопедии им. Р.Р. Вредена»  
Минздрава России  
Ул. Ак. Байкова, д. 8, Санкт-Петербург, Россия, 195427

### Реферат

Несмотря на внедрение в клиническую практику широкого спектра хирургических методик лечения поврежденных суставного хряща, на современном этапе развития медицины и биотехнологий поиск методов восстановления суставных поверхностей остается очень актуальной и нерешенной задачей. В последние годы все больше надежд связывают с разработкой клеточных методов восстановления гиалинового хряща, таких как аутологичная имплантация хондроцитов, имплантация клеточной культуры мезенхимальных стволовых клеток (МСК), в том числе с технологиями генной модификации клеток. Целью настоящего обзора было обобщение опубликованной в научной литературе информации о полученных на современном этапе результатах при разработке перспективных клеточных технологий восстановления суставного хряща.

Первой клинически применяемой методикой для восстановления гиалинового хряща с использованием клеточных технологий считается аутологичная трансплантация хондроцитов, впервые осуществленная группой шведских ученых в 1987 г. Однако пересаженная культура клеток характеризуется низким пролиферативным потенциалом и неспособностью сформировать устойчивый к повышенным физическим нагрузкам регенерат. Следующее поколение методик, появившееся на рубеже веков, использует вместо аутологичных хондроцитов мезенхимальные стволовые клетки, заготовка которых является менее инвазивной процедурой по сравнению с получением хондроцитов, а сама культура обладает повышенным пролиферативным потенциалом. Для надежной фиксации клеток исследователи используют различные биодеградируемые носители (матрицы). Несмотря на хорошие клинические результаты, полученные в среднесрочной перспективе, с течением времени в результате клеточной де-дифференцировки имплантированная тканеинженерная конструкция деградирует. Следующим поколением методов, находящихся в стадии доклинических исследований, является предварительная хондрогенная модификация имплантированной клеточной культуры. Использование различных факторов роста, модифицированного клеточного продукта и гено-активирующих матриц, позволяет достичь стабильного синтеза регуляторных и ключевых белков, точно повлиять на пролиферацию регенерата в хондрогенном направлении и, как следствие, сформировать полноценный гиалиновый хрящ, устойчивый во времени к большим физическим нагрузкам.

Таким образом, разработка путей восстановления суставного хряща давно вышла за рамки интересов врачей клинических специальностей, и только тесное междисциплинарное взаимодействие клиницистов со специалистами в области клеточной биологии, молекулярной генетики, и, возможно, вирусологии позволит восстановить на месте дефекта полноценный гиалиновый хрящ.

**Ключевые слова:** регенерация суставного хряща, хондроциты, ММСК.

DOI 10.21823/2311-2905-2016-22-3-122-134

### Введение

Ещё в 1743 г. Вильям Хантер впервые отметил, что повреждённый хрящ уже никогда не восстановится, а в 1853 г. Джеймс Рагет написал: «Неизвестно ни единого случая, когда потерянная часть хряща восстанавливалась новым или хорошо сформированным хрящом» [11]. Заболеваниями суставного хряща в современном мире страдают миллионы людей.

Несмотря на относительную простоту биохимической и клеточной структуры, способности суставного хряща к регенерации весьма ограничены [7], и поиск методов восстановления суставных поверхностей является актуальной и нерешенной задачей [21]. К настоящему времени разработан и внедрен в клиническую практику широкий спектр хирургических методик по лечению повреждений суставного хряща:

Божокин М.С., Божкова С.А., Нетылько Г.И. Возможности современных клеточных технологий для восстановления поврежденного суставного хряща (аналитический обзор литературы) *Травматология и ортопедия России*. 2016;22(3):122-134. DOI 10.21823/2311-2905-2016-22-3-122-134.

Божокин Михаил Сергеевич. Ул. Ак. Байкова, д. 8, Санкт-Петербург, Россия, 195427; e-mail: writeback@mail.ru

Рукопись поступила: 22.08.2016; принята в печать: 01.09.2016

артроскопическая туннелизация, микрофрактурирование, мозаичная аутохондропластика, пересадка собственной культуры хондроцитов [2, 25]. Кроме того, идут разработки гидрогелевых имплантатов для восполнения дефектов хряща [1, 51]. Известные экспериментальные методики тканевой инженерии хряща с дермальными фибробластами не получили широкого распространения в связи со сложной процедурой селекции клеток, склонных к индукции хондрального фенотипа [5].

В последнее десятилетие активно разрабатываются клеточные методы восстановления гиалинового хряща: аутологичная трансплантация хондроцитов, трансплантация клеточной культуры мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (ММСК), в том числе, с технологиями генной модификации клеток.

**Целью** настоящего обзора является обобщение опубликованной в научной литературе информации о полученных на современном этапе результатах разработки перспективных клеточных технологий восстановления суставного хряща.

#### *Технологии с применением хондроцитов*

В 1987 г. группой шведских учёных во главе с М. Brittberg [10] для восстановления повреждённой хрящевой поверхности впервые была опробована принципиально новая технология, заключающаяся в ауто трансплантации хондроцитов (далее АТХ, в англ. АСI – autological chondrocyte implantation). Данная методика представляет собой двухэтапный процесс, в котором на первом этапе артроскопически из ненагружаемой зоны суставной поверхности забирают участок неповрежденного хряща, после чего в стерильных условиях с помощью различных ферментов (например, коллагеназы) выделяют хондроциты и культивируют их до достижения необходимого количества (12–48 млн клеток). На втором этапе выполняют трансплантацию культуры клеток в область повреждения [17]. В 1994 г. появился первый коммерческий клеточный продукт CartiCel(R), разработанный в США, а в 1996 г. была впервые предложена логическая модификация методики АТХ – матрикс-индуцированная имплантация хондроцитов (МАТХ – matrix associated chondrocyte implantation), при которой культивирование клеточной культуры проводят внутри 3D-структуры (матрица, гель), выступающей в качестве носителя клеток и способствующей образованию гиалиноподобной ткани [59] с последующим внесением всей конструкции в зону дефекта. Таким

образом, трансплантация хондроцитов может происходить как в сочетании с биодеградируемым носителем, так и без него. Однако в последнем случае возможна миграция клеточного продукта, что, на наш взгляд, делает применение тканеинженерных конструкций (матрица-носитель с культурой клеток) более перспективным методом.

Лабораторные исследования показали, что успешное восстановление хрящевой ткани зависит не только от способности хондроцитов к пролиферации, но и от направления их дифференцировки внутри тканеинженерной 3D-матрицы [18]. В качестве матрицы широкое распространение получили биоматериалы на основе коллагена, агарозы, альгината, хитозана и гиалуриновой кислоты (ГК), а также различные полимолочные кислоты (полилактиды) [42]. Существует ряд коммерческих продуктов для фиксации клеточной культуры (например, ChondroGyde® и др.). Доказано, что трехмерная структура матрицы положительно влияет на дифференцировку клеточной культуры в хондрогенном направлении, в результате чего происходит формирование характерного для гиалинового хряща внеклеточного матрикса и повышается синтез ключевых белков, таких как коллаген II типа, аггрекан [35].

На данный момент не существует «золотого стандарта» совмещения клеточной культуры и биодеградируемого носителя, поэтому исследователи используют различные методы и протоколы, которые можно разделить на две основные группы: статическую – когда клетки проникают внутрь носителя под действием диффузии, и динамическую – когда на клеточную культуру воздействуют вакуумом, электромагнитной или центробежной силой, кроме того, возможно использование циркуляционного насоса [4]. Одновременно с трансплантацией тканеинженерной конструкции (ТИК) для внесения клеток и регуляторных факторов в область дефекта для стимуляции регенеративных процессов в повреждённой области хряща могут применять микрофрактурирование, субхондральную туннелизацию [33] или оставляют область дефекта интактной [28]. В ряде случаев при остеохондральных дефектах в комбинации с клеточными технологиями выполняют дебридмент [15]. Возможно, что для многослойных ТИК важное значение имеет различная структура слоёв, к примеру, слой, обращённый в полость сустава, должен создавать минимальное трение с противоположной суставной поверхностью, а слой, обращённый к субхондральной кости, – обладать специфической адгезивной способностью [58].

В клинической практике для фиксации ТИК применяют различные способы. При размере матрицы от 1,0 см<sup>2</sup> применяют металлические скобы или швы [53], но в основном исследователи для предотвращения миграции имплантированной культуры клеток используют коллагеновые, фибриновые клеи, в том числе, обогащённые тромбоцитами, а также лоскуты надкостницы [2, 24, 27, 57, 61].

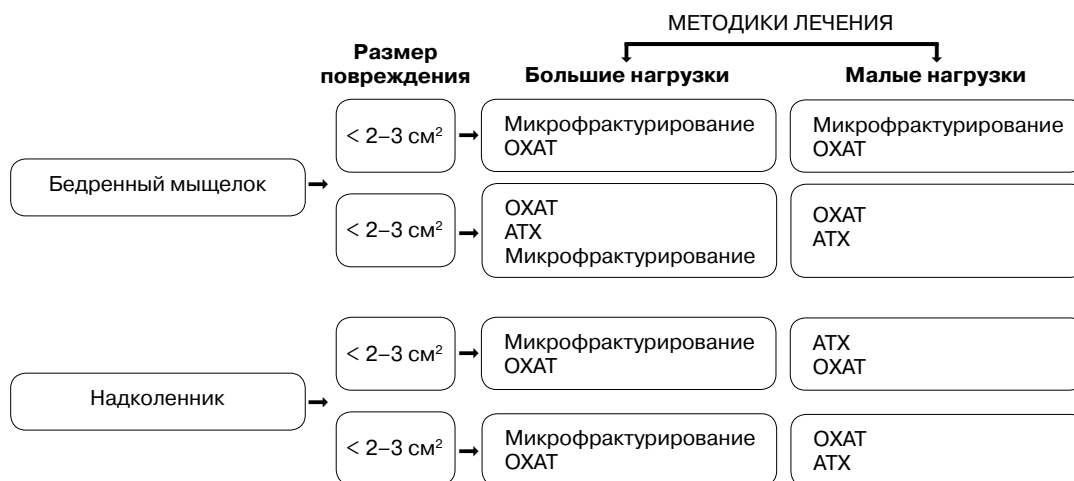
Данные научной литературы свидетельствуют о сопоставимой эффективности применения технологий АТХ и МАТХ. К основным достоинствам обоих методов можно отнести отсутствие риска развития иммунных осложнений, включающих реакцию «трансплантат против хозяина» (РТПХ), а также больший риск заражения пациента вирусными инфекциями, что возможно при пересадке аллогенных клеток. К достоинствам указанных методик можно отнести и малый объем хирургического вмешательства на первом этапе, в отличие от аутологичной костно-хрящевой трансплантации [33]. Результаты лечения даже больших (>4 см<sup>2</sup>) повреждений хряща коленного сустава можно расценить как хорошие, поскольку они приводят к увеличению качества жизни пациентов, несмотря на выявляемую артроскопически неравномерность регенерации в области повреждения [40]. Аналогичные результаты демонстрируют L. Peterson и соавторы, применившие сочетание корригирующей остеотомии и технологии АТХ [53].

Несмотря на значимое уменьшение болевого синдрома у пациентов после трансплантации аутологичных хондроцитов [59], применение данной технологии не получило всеобщего распространения. Одной из причин этого является высокая стоимость применения АТХ, которая существенно превышает стоимость выполнения микрофрактурирования при схожих результатах лечения дефектов менее 3 см<sup>2</sup> при сроке наблюдения 10 лет [40]. При этом в одних исследованиях при сравнении результатов применения данных методик не выполняли анализ гистологических и рентгенографических изменений в регенерате, в других же – внутренняя структура регенерата при использовании технологии АТХ соответствовала неповреждённому гиалиновому хрящу в большей степени [48]. Последнее, по-видимому, свидетельствует о большом количестве неучтённых факторов, влияющих на развитие регенерата после оперативного вмешательства. Сравнение технологий АТХ и МАТХ показало отсутствие существенных различий между ними по шкале IKDC (International Knee Documentation Committee) через 24 месяца после выполнения процедуры. Однако применение технологии

МАТХ представляется более предпочтительным, так как трёхмерное микроокружение способствует дифференцировке культуры клеток в хондрогенном направлении и существенно уменьшает риск миграции из ТИК в полость сустава [69].

Помимо высокой стоимости, технология аутологичной трансплантации хондроцитов имеет и другие недостатки. Во-первых, это процесс, требующий двух полноценных оперативных вмешательств. Во-вторых, для формирования и интеграции вновь образованной ткани в неповреждённую область требуется длительный, иногда до полугода, процесс реабилитации. В-третьих, при использовании надкостничного лоскута возможно развитие гипертрофии хряща [13]. Однако, на наш взгляд, главным и самым существенным недостатком данной технологии является де-дифференцировка хондроцитов. При культивировании в монослое клетки перестают синтезировать ключевые белки суставного хряща, коллаген II типа и агрекан, гипергидратированное взаимодействие которых между собой и придаёт гиалиновому хрящу уникальные биомеханические свойства, например, способность к обратной микродеформации. Вместо этого начинается синтез коллагена I типа и неспецифических протеогликанов, что приводит к образованию волокнистого хряща с кардинально другими механическими свойствами, неспособного выдерживать значительные физические нагрузки и впоследствии деградирующего [6, 36]. Несмотря на то, что культивирование хондроцитов в трёхмерной среде на ранней стадии препятствует де-дифференцировке клеток и способствует синтезу основных белков суставного хряща, это не является достаточным условием для гарантированного образования гиалиноподобного регенерата в долгосрочной перспективе, что свидетельствует о недостаточной изученности процесса регуляции формирования гиалиновой ткани.

Известны всего несколько методик, которые достаточно активно применяют в клинической практике врачи США: это микрофрактурирование, которое мы подробно не рассматриваем в рамках данной работы, остеохондральная аутологичная трансплантация и трансплантация аутологичных хондроцитов. Как правило, при выборе методики для конкретного пациента учитывают размер, вид и локализацию дефекта (рис.). Методика МАТХ до сих пор не получила широкого распространения в клинической практике, что связано, вероятно, с этапом накопления отдаленных результатов и совершенствования методик культивирования хондроцитов.



**Рис.** Схема выбора методики лечения дефекта хряща в зависимости от локализации и размера (по данным научной литературы): ОХАТ – остеохондральная аутологичная трансплантация; АТХ – аутологичная трансплантация хондроцитов

По-видимому, дальнейшее усовершенствование методик АТХ и МАТХ должно быть направлено на усиление интеграции полученного тканеинженерного продукта в область неповреждённого хряща, увеличение скорости формирования регенерата и предупреждение де-дифференцировки хондроцитов, что должно привести к образованию устойчивой к механическому воздействию гиалиноподобной хрящевой ткани.

#### *Технологии с применением ММСК*

Параллельно с технологией АТХ в 1994 г. S. Wakitani предложил новую методику, где в качестве клеток для последующей трансплантации использовали не хондроциты, а ММСК [60]. Получение данного вида клеток, находящихся в костном мозге, ткани синовиальной оболочки, крови, жировой ткани (в том числе, жировой ткани из коленного сустава [2]) и надкостнице [45], в отличие от метода получения хондроцитов, не приводит к дополнительной травматизации интактного суставного хряща. При этом применение различных ростовых факторов, таких как TGF-beta-3 и дексаметазон, способно направить дифференцировку клеточной культуры в хондрогенном направлении [20]. Культивирование и трансплантацию клеточной культуры ММСК чаще всего проводят в составе ТИК, используя биodeградируемые матрицы различной структуры. Данный метод считается одной из наиболее перспективных клеточных технологий для лечения травматических хондральных и остеохондральных дефектов коленного и голеностопно-

го суставов. При этом трансплантация ММСК в область повреждения в целом аналогична трансплантации хондроцитов, а различия в основном связаны с получением и культивированием клеточной культуры.

Как уже упоминалось выше, источником ММСК могут служить различные ткани, но чаще всего для получения ММСК у человека при лечении остеохондральных повреждений суставного хряща используют игольную аспирацию костного мозга [15] или выделение ММСК из жировой ткани [51]. В качестве альтернативного источника получения данных клеток у животных используют ткань синовиальной оболочки [51]. K. Saw и соавторы предложили способ выделения ММСК из периферической крови, но в настоящее время, в том числе, из-за высокой стоимости, он не получил широкого распространения [49]. Известно, что ММСК, выделенные из разных источников, обладают способностью к дифференцировке в различных направлениях [47]. Для детального анализа полученной культуры на возможность дальнейшей дифференцировки в определенном направлении необходимо предварительно тестировать клетки на наличие или отсутствие у них специфических маркеров. К примеру, хондрогенная дифференцировка возможна у клеток, положительных по CD90 и отрицательных по CD45 [47].

По мнению Y. Sakaguchi и соавторов (2005), синовиальные ММСК в сравнении с клетками, выделенными из костного мозга и надкостницы, характеризуются большей способностью к хондрогенной дифференцировке [47]. В других экспериментальных исследованиях этот тезис не

подтвердился [30]. Несмотря на то, что ММСК жировой ткани обладают меньшим хондрогенным потенциалом в сравнении с ММСК надкостницы, синовиальной оболочки и костного мозга, они легко могут быть выделены в количестве, необходимом для последующей трансплантации. Надо отметить, что ММСК из костного мозга и надкостницы характеризуются выраженным остеогенным потенциалом [47] и способны к спонтанной дифференцировке в данном направлении. Данное свойство не является положительным для хрящевой инженерии, но может быть использовано при лечении дефектов костной ткани.

Оценка хондрогенного потенциала ММСК, выделенных из разных источников, является актуальной задачей. Разработанные протоколы выделения и культивирования клеток (в том числе, 3D) и обработка их различными комбинациями факторов роста способствуют усилению хондрогенного потенциала исходной клеточной культуры [47]. Сформулированные разными исследователями количественные и качественные его характеристики способствуют анализу и систематизации полученных данных. Несмотря на большое количество работ в данном направлении, критерии выбора клеточной культуры для восстановления повреждений суставного хряща являются темой дискуссий, и подробное обсуждение данного вопроса выходит за рамки данной работы.

Помимо трансплантации аутологичных ММСК, существует возможность применения ММСК из клеточных банков или заготовленных заранее стволовых клеток пупочного канатика, что может в будущем создать альтернативное направление данной методике. Однако необходимы дальнейшие исследования, направленные на доказательство безопасности применения аллогенной трансплантации из-за возможного иммунного ответа [41].

В настоящее время известно значительное количество факторов (физических, химических, биологических), влияющих на направление дифференцировки ММСК в культуре. Например, экспрессия генов *col2a1* и *sox9*, также как и снижение парциального давления  $O_2$  в 7 раз с 21 до 3%, значительно увеличивает синтез гликозаминогликанов (ГАГ) [8]. Аналогично действует низкоинтенсивное (200 мВ на  $1\text{ см}^2$ ) ультразвуковое (1 МГц) воздействие на культуру клеток [12]. Большое влияние на хондрогенную дифференцировку имеет также наличие в культуральной среде серы, которая должна входить в состав сульфатированных ГАГ [34]. Известно, что прямое действие на дифференцировку ММСК в

хондрогенном направлении оказывают факторы роста фибробластов: bFGF, TGF-beta3, FGF-2, последний из которых увеличивает синтез коллагена II типа и специфических протеогликанов [23]. Кроме того, аналогичное действие проявляют дексаметазон, костные морфогенетические белки (BMP-2,4,6), инсулиноподобный фактор роста (IGF-1) [39, 47], Sox9 [55]. В результате большинство протоколов культивирования ММСК включает в себя добавление тех или иных регуляторов роста [33, 43, 67]. Применение во время культивирования паратиреоидного гормона позволяет подавить остеогенную дифференцировку ММСК [29]. Таким образом, у исследователей есть широкий набор методов для придания дифференцировке ММСК необходимого направления и некоторому увеличению синтеза ключевых белков, таких как коллаген II типа и агрекан.

Актуальной задачей большинства доклинических исследований является применение различных трёхмерных тканеинженерных конструкций, содержащих дифференцированные ММСК [52, 63]. Y. Zhao и соавторами культивировали ММСК собаки внутри выделенного и очищенного хрящевого внеклеточного матрикса. В результате после 3 недель культивирования *in vitro* биохимический анализ показал наличие вновь синтезированных молекул коллагена II типа и ГАГ вокруг равномерно распределённых клеток [67]. Аналогично, в остехондральных эксплантатах на 4-й неделе культивирования ММСК в агарозном геле M.L. Murphy с соавторами выявили экспрессию гена коллагена II типа, при этом уровень синтеза ГАГ соответствовал неповреждённому гиалиновому хрящу [37]. В экспериментах A. Wataru с соавторами через 6 месяцев после имплантации ТИК в область остехондрального дефекта коленного сустава свиньи было показано формирование в зоне имплантации интегрированного и структурно совпадающего с окружающей поверхностью гиалиноподобного регенерата [63]. В некоторых работах матрицу с культурой клеток трансплантировали в область дефекта после предварительного культивирования *in vitro* в течение 2–3 недель, что способствовало лучшему распределению клеток внутри биодеградируемого носителя и синтезу большего количества внеклеточного матрикса [64]. К примеру, В. Marquass и соавторы получили в эксперименте через год после трансплантации гиалиноподобный регенерат, который отличался наличием коллагена II типа, интеграцией регенерата в неповреждённую область и отсутствием признаков даже частичной дегградации [38]. J. Bekkers и соавторы проводили эксперимент

с одновременной трансплантацией хондроцитов и ММСК в фибриновом геле в область хондрального дефекта мышечка бедренной кости половозрелой мыши. Несмотря на маленький размер экспериментального животного, через 6 месяцев после оперативного вмешательства им удалось установить формирование гиалиноподобного регенерата. При этом гистологические и биомеханические исследования показали более полное заполнение дефекта и большее содержание ГАГ по сравнению с применением методики микрофрактурирования [9]. Однако ряд исследователей считает, что необходимы поиск новых экспериментальных моделей и проведение дополнительных исследований для дальнейшей объективной оценки эффективности данной технологии [3].

S. Giannini и соавторы, используя ММСК при лечении остеохондральных повреждений ( $>1,5 \text{ см}^2$ ), добились хорошей степени заполнения дефекта гиалиноподобным регенератом с его интеграцией в область неповрежденной поверхности на 76% при средних сроках наблюдения около 5 лет [16]. В работе K. Saw и соавторов показано заполнение области повреждения и хорошие результаты по шкале ICRS II (International Cartilage Repair Society) через 24 месяца после проведения оперативного вмешательства [49]. A. Gigante с соавторами также через 24 месяца после оперативного вмешательства показали полное заполнение области повреждения, отсутствие воспалительной реакции и болевых ощущений у пациентов с травматическим дефектом хрящевой поверхности ( $3 \text{ см}^2$ ) [14].

Безусловно, применение ММСК для восстановления хрящевых и остеохондральных дефектов является перспективной для клинического использования методикой. Однако в связи с небольшим периодом применения к настоящему моменту отдаленных результатов накоплено недостаточно. Согласно международному реестру клинических исследований Национального института здоровья США (<http://clinicaltrials.gov>), на текущий момент из 55 зарегистрированных в нем исследований по изучению трансплантации ММСК в область коленного сустава (mesenchymal stem cell knee) завершено 21, однако результаты опубликованы только по двум со сроками наблюдения 6 месяцев и 2 года, что является явно недостаточным для широкого клинического применения данной технологии.

В отличие от трансплантации хондроцитов [59], использование ММСК подразумевает менее инвазивную процедуру получения клеток и сохранение целостности интактного суставного

хряща [28, 62], что в совокупности с меньшими финансовыми затратами в сравнении с МАТХ и АТХ [16] делает применение ММСК более предпочтительной методикой.

#### *Методы модификации клеточной культуры*

При использовании культуры хондроцитов или ММСК формируется регенерат, не полностью соответствующий структуре гиалинового хряща, следовательно, неспособный выдерживать значительные механические нагрузки в течение длительного времени, и, как следствие, деградирующий. Один из путей решения данной проблемы включает в себя использование различных факторов роста для воздействия на направление дифференцировки клеток, о чем говорилось выше. Были получены первые положительные результаты, но оказалось, что требуется разработка эффективной системы доставки белковых регуляторов в область повреждения для получения долгосрочного воздействия на клетку в составе ТИК [19].

Другой путь предполагает использование генно-модифицированного клеточного продукта, который позволяет достичь стабильного синтеза необходимых регуляторных белков в имплантированных клетках, направляя тем самым дифференцировку по хондрогенному пути [66]. Для получения генно-модифицированных клеток применяют адено-, ретро-, лентовирусы и аденоассоциированные вирусы, каждый из которых имеет свои преимущества и недостатки [56, 66].

В недавних исследованиях на кроликах было показано, что генно-модифицированные бакуловирусом стромальные клетки, полученные из жировой ткани и костного мозга, стабильно экспрессирующие ростовой фактор BMP-6 суперсемейства TGF-beta3, способны усиливать хондрогенез, подавлять оссификацию и гипертрофию формирующегося регенерата [66]. Тканеинженерную конструкцию создавали *in vitro*, затем имплантировали в область созданного дефекта. Через 6 месяцев была установлена интеграция сформированного регенерата в неповрежденную область суставного хряща и синтез специфического внеклеточного матрикса гиалинового хряща. Полученные результаты свидетельствуют о возможности трансплантации в область хрящевого дефекта ТИК с измененной экспрессией некоторых собственных генов, влияющими на синтез ключевых белков или ростовых факторов, что открывает исследователям принципиально новый метод восстановления гиалинового хряща.

Одной из последних разработок в области регенерации суставного хряща является ис-

пользование микроРНК, которое позволяет предельно точно регулировать синтез тех или иных белков, влияющих на пролиферацию хрящевой ткани [19]. На сегодняшний день известно, что экспрессия микроРНК изменяется также на этапах хрящевой пролиферации [54], де-дифференцировки хондроцитов [22] и хондрогенеза ММСК [65]. Также было показано, что микроРНК miR-148b участвует в регуляции остеогенной дифференцировки и формировании костной ткани [31], а miR-199a, miR-675, miR-145, miR-140 стимулируют хондрогенез [56].

На наш взгляд, большой интерес представляет предложенная S. Raisin с соавторами технология геноактивирующей матрицы (GAM) [46], когда в биодеградирующий носитель помещают плазмиды ДНК, которые после имплантации GAM в область повреждения проникают в клетки организма пациента и на определенное время изменяют экспрессию нужных генов, вследствие чего происходит синтез молекул необходимых белков и восстановление хрящевой ткани. Данные технологии дают исследователям обширные возможности для дифференцировки имплантируемой клеточной культуры именно в хондрогенном направлении с образованием гиалинового хряща требуемой структуры.

### Заключение

Регенеративная биомедицина суставов является одной из наиболее быстро развивающихся отраслей науки. Большинство методик и технологий в настоящее время тестируется в экспериментах и клинических исследованиях. Наиболее широко применяемой в клинической практике ряда стран (ЕС, США) методикой, представленной в нашем обзоре, является трансплантация аутологичных хондроцитов. Однако уже очевидно, что именно методы тканевой инженерии позволяют исследователям замещать область повреждения суставной поверхности регенератом, наиболее близким по структуре и свойствам к гиалиновому хрящу. Перспективно использование тканеинженерных конструкций, содержащих ММСК, некоторые из которых уже проходят клинические исследования. Кроме того, развитие методов генной модификации клеток, высокоэффективно регулирующих хондрогенную клеточную дифференцировку, может в значительной степени способствовать повышению эффективности применения ММСК для лечения дефектов суставного хряща. Таким образом, разработка путей восстановления суставного хряща давно вышла за рамки интересов клинических специалистов, и только тесное междисциплинарное взаимодействие в области

клеточной биологии, молекулярной генетики, и, возможно, вирусологии позволит восстановить на месте дефекта полноценный гиалиновый хрящ.

**Конфликт интересов:** не заявлен.

**Источник финансирования:** исследование проведено без спонсорской поддержки.

### Литература

1. Божкова С.А., Буянов А.Л., Кочиш А.Ю., Румакин В.П., Хрипунов А.К., Нетьлько Г.И., Смыслов Р.Ю., Афанасьев А.В., Панарин Е.Ф. Перифокальные тканевые реакции на имплантацию образцов гидрогелевого материала на основе полиакриламида с добавлением целлюлозы (экспериментальное исследование). *Морфология*. 2016;149(2):47-53.
2. Брянская А.И., Куляба Т.А., Корнилов Н.Н., Румакин В.П., Горностаев В.С. Артропластика с использованием аутологичных мультипотентных мезенхимальных клеток и коллагеновой мембраны ChondroGyde®. *Вестник травматологии и ортопедии им. Н.Н. Приорова*. 2014;1: 62-66.
3. Деев Р.В., Григорян А.С., Кругляков П.В., Билибина А.А., Соколова И.Б., Павличенко Н.Н., Полинцев Д.Г. Применение трансплантатов, содержащих мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки, для восстановления поврежденных суставных поверхностей в эксперименте. *Гены и клетки*. 2010;5(2):44-55.
4. Нащекина Ю.А., Никонов П.О., Михайлов В.М., Пинаев Г.П. Зависимость заполнения стромальными клетками костного мозга трёхмерной матрицы от способа посева клеток и типа модификации поверхности матрицы. *Цитология*. 2014;56(4):283-290.
5. Новочадов В.В. Проблема управления клеточным заселением и ремоделированием тканеинженерных матриц для восстановления суставного хряща (обзор литературы). *Вестник Волгоградского государственного университета. Естественные науки*. 2013;(1):19-28.
6. Омеляненко Н.П. Слущкий Л.И. Соединительная ткань Т.2. М.: Известия; 2009. 378 с.
7. Советников Н.Н., Кальсин В.А., Конопляников М.А., Муханов В.В. Клеточные технологии и тканевая инженерия в лечении дефектов суставной поверхности. *Клиническая практика*. 2013;(1):52-66.
8. Adesida A.B., Mulet-Sierra A., Jomha N.M. Hypoxia mediated isolation and expansion enhances the chondrogenic capacity of bone marrow mesenchymal stromal cells. *Stem Cell Res Ther*. 2012;3:9. doi.org/10.1186/scrt100
9. Bekkers J.E., Tsuchida A.I., van Rijen M.H., Vonk L.A., Dhert W.J., Creemers L.B., Saris D.B. Single-stage cell-based cartilage regeneration using a combination of chondrons and mesenchymal stromal cells: comparison with microfracture. *Am J Sports Med*. 2013;41(9):2158-2166. doi.org/10.1177/0363546513494181
10. Brittberg M., Lindahl A., Nilsson A., Ohlsson C., Isaksson O., Peterson L. Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation. *N Eng J Med*. 1994; (331): 889-895. doi.org/10.1056/nejm199410063311401
11. Capeci C.M., Turchiano M., Strauss E.J., Youm T. Osteochondral allografts: applications in treating

- articular cartilage defects in the knee. *Bull Hosp J Dis.* 2013;71(1):60-67.
12. Choi J., Choi B., Park S., Pai K., Li T., Min B., Park S. Mechanical stimulation by ultrasound enhances chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells in a fibrin-hyaluronic acid hydrogel. *Artif Organs.* 2013; 37(7):648-655. doi:10.1111/aor.12041.
  13. Darling E., Athanasiou K. Rapid phenotypic changes in passaged articular chondrocyte subpopulations. *J Orthop Res.* 2005;23(2):425-432. doi.org/10.1016/j.jorthres.2004.08.008
  14. Gigante A., Cecconi S., Calcagno S., Busilacchi A., Enea D. Arthroscopic knee cartilage repair with covered microfracture and bone marrow concentrate. *Arthrosc Tech.* 2012;1:175-180. doi.org/10.1016/j.eats.2012.07.001
  15. Giannini S., Buda R., Vannini F., Cavallo M., Grigolo B. One-step bone marrow-derived cell transplantation in talar osteochondral lesions. *Clin Orthop Relat Res.* 2009; 467:3307-3320. doi.org/10.1007/s11999-009-0885-8
  16. Giannini S., Buda R., Cavallo M., Ruffilli A., Cenacchi A., Cavallo C., Vannini F. Cartilage repair evolution in post-traumatic osteochondral lesions of the talus: from open field autologous chondrocyte to bone-marrow-derived cells transplantation. *Injury.* 2010;41:1196-1203. doi.org/10.1016/j.injury.2010.09.028
  17. Gille J., Schuseil E., Wimmer J., Gellissen J., Schulz AP., Behrens P. Mid-term results of Autologous Matrix-Induced Chondrogenesis for treatment of focal cartilage defects in the knee. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 2010; 18(11):1456-1465. doi.org/10.1007/s00167-010-1042-3
  18. Grigolo B., Lisignoli G., Piacentini A., Fiorini M., Gobbi P., Mazzotti G., Duca M., Pavesio A., Facchini A. Evidence for redifferentiation of human chondrocytes grown on a hyaluronan-based biomaterial (HYAff 11): molecular, immunohistochemical and ultrastructural analysis. *Biomaterials.* 2002;23(4):1187-1195. doi.org/10.1016/s0142-9612(01)00236-8
  19. Im G.I. Gene transfer strategies to promote chondrogenesis and cartilage regeneration. *Tissue Eng Part B Rev.* 2016;22(2):136-148. doi.org/10.1089/ten.teb.2015.0347
  20. Johnstone B., Hering M., Caplan I., Goldberg M., Yoo U. In vitro chondrogenesis of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells. *Exp Cell Res.* 1998;238: 265-272.
  21. Jomha NM, Adesida AB, Bornes TD. Mesenchymal stem cells in the treatment of traumatic articular cartilage defects: a comprehensive review. *Arthritis Res Ther.* 2014;16:432-451. doi.org/10.1186/s13075-014-0432-1
  22. Karlsen T.A., Shahdadfar A., Brinckmann J.E. Human primary articular chondrocytes, chondroblasts-like cells, and dedifferentiated chondrocytes: differences in gene, microRNA, and protein expression and phenotype. *Tissue Eng Part C Methods.* 2011;17(2):219-227. doi: 10.1089/ten.TEC.2010.0200
  23. Khan W.S., Tew S.R., Adesida A.B., Hardingham T.E. Human infrapatellar fat pad-derived stem cells express the pericyte marker 3G5 and show enhanced chondrogenesis after expansion in fibroblast growth factor-2. *Arthritis Res Ther.* 2008;10(4):10-17. doi.org/10.1186/ar2448
  24. Kon E., Vannini F., Buda R., Filardo G., Cavallo M., Ruffilli A., Nanni M., Di Martino A., Marcacci M., Giannini S. How to treat osteochondritis dissecans of the knee: surgical techniques and new trends: AAOS exhibit selection. *J Bone Joint Surg Am.* 2012;94:1-8. doi.org/10.2106/jbjs.k.00748
  25. Koh Y.G., Kwon O.R., Kim Y.S., Choi Y.J., Tak D.H. Adipose-derived mesenchymal stem cells with microfracture versus microfracture alone: 2-year follow-up of a prospective randomized trial. *Arthroscopy.* 2016;32(1):97-109.
  26. Kon E., Filardo G., Berruto M., Benazzo F., Zanon G., Della Villa S., Marcacci M. Articular cartilage treatment in high-level male soccer players: a prospective comparative study of arthroscopic second-generation autologous chondrocyte implantation versus microfracture. *Am J Sports Med.* 2011; 39:2549-2557. doi.org/10.1177/0363546511420688
  27. Kuroda R., Ishida K., Matsumoto T., Akisue T., Fujioka H., Mizuno K., Ohgushi H., Wakitani S., Kurosaka M. Treatment of a full-thickness articular cartilage defect in the femoral condyle of an athlete with autologous bone-marrow stromal cells. *Osteoarthritis Cartilage.* 2007;15: 226-231. doi.org/10.1016/j.joca.2006.08.008
  28. Kuroda R., Ishida K., Matsumoto T., Akisue T., Fujioka H., Mizuno K., Ohgushi H., Wakitani S., Kurosaka M. Treatment of a full-thickness articular cartilage defect in the femoral condyle of an athlete with autologous bone-marrow stromal cells. *Osteoarthritis Cartilage.* 2011;17(2): 219-227. doi.org/10.1089/ten.tec.2010.0200
  29. Kafienah W., Mistry S., Dickinson SC., Sims TJ., Learmonth I., Hollander A.P. Three-dimensional cartilage tissue engineering using adult stem cells from osteoarthritis patients. *Arthritis Rheum.* 2007;56:177-187. doi.org/10.1016/s1063-4584(07)61356-9
  30. Li Q., Tang J., Wang R., Bei C., Xin L., Zeng Y., Tang X. Comparing the chondrogenic potential in vivo of autogeneic mesenchymal stem cells derived from different tissues. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol.* 2010; 39:31-38. doi.org/10.3109/10731191003776769
  31. Liao Y.H., Chang Y.H., Sung L.Y., Li K.C., Yeh C.L., Yen T.C., Hwang S.M., Lin K.J., Hu Y.C. Osteogenic differentiation of adipose-derived stem cells and calvarial defect repair using baculovirus-mediated co-expression of BMP-2 and miR-148b. *Biomaterials.* 2014;35(18):4901-4910. doi.org/10.1016/j.biomaterials.2014.02.055
  32. Makris E.A., Gomoll A.H., Malizos K.N., Hu J.C., Athanasiou K.A. Repair and tissue engineering techniques for articular cartilage. *Nat Rev Rheumatol.* 2014;11(1):21-34. doi.org/10.1038/nrrheum.2014.157
  33. Madry H., Orth P., Kaul G., Zurakowski D., Menger M.D., Kohn D., Cucchiari M. Acceleration of articular cartilage repair by combined gene transfer of human insulin-like growth factor I and fibroblast growth factor-2 in vivo. *Arch Orthop Trauma Surg.* 2010;130(10):1311-1322. doi.org/10.1007/s00402-010-1130-3
  34. Martin I., Muraglia A., Campanile G., Cancedda R., Quarto R. Fibroblast growth factor-2 supports ex vivo expansion and maintenance of osteogenic precursors from human bone marrow. *Endocrinology.* 1997;138:4456-4462. doi: 10.1210/endo.138.10.5425
  35. Martinez I., Elvenes J., Olsen R., Bertheussen K., Johansen O. Redifferentiation of in vitro expanded adult articular chondrocytes by combining the hanging-drop cultivation method with hypoxic environment. *Cell Transplant.* 2008;17:987-996. doi.org/10.3727/096368908786576499
  36. Marlovits S., Hombauer M., Truppe M., Vecsei V., Schlegel W. Changes in the ratio of type-I and type-II collagen expression during monolayer culture of human chondrocytes. *J Bone Joint Surg Br.* 2004;86(2):286-295. doi.org/10.1302/0301-620x.86b2.14918
  37. Murphy J.M., Marloes L., de Vries-van Melle M.L., Narcisi R., Kops N., Koevoet W.J., Bos P.K., Verhaar J.A., van der Kraan P.M., van Osch G.J. Chondrogenesis of mesenchymal stem cells in an osteochondral environment



- is mediated by the subchondral bone. *Tissue Eng Part A*. 2014;20(1-2):23-33. doi.org/10.1089/ten.tea.2013.0080
38. Marquass B., Schulz R., Hepp P., Zscharnack M., Aigner T., Schmidt S., Stein F., Richter R., Osterhoff G., Aust G., Josten C., Bader A. Matrix-associated implantation of predifferentiated mesenchymal stem cells versus articular chondrocytes: in vivo results of cartilage repair after 1 year. *Am J Sports Med*. 2011;39:1401-1412. doi.org/10.1177/0363546511398646
  39. Matsuda C., Takagi M., Hattori T., Wakitani S., Yoshida T. Differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells to chondrocytes for construction of three-dimensional cartilage tissue. *Cytotechnology*. 2005;47:11-17. doi.org/10.1007/s10616-005-3751-x
  40. Mobasheri A., Kalamegam G., Musumeci G., Batt M.E. Chondrocyte and mesenchymal stem cell-based therapies for cartilage repair in osteoarthritis and related orthopaedic conditions. *Maturitas*. 2014;78(3):188-198. doi.org/10.1016/j.maturitas.2014.04.017
  41. Mukonoweshuro B., Brown C.J., Fisher J., Ingham E. Immunogenicity of undifferentiated and differentiated allogeneic mouse mesenchymal stem cells. *J Tissue Eng*. 2014;5:1-15. doi.org/10.1177/2041731414534255
  42. Naderi-Meshkin H., Andreas K., Matin M.M., Sittlinger M., Bidkhorji H.R., Ahmadiankia N., Bahrami A.R., Ringe J. Chitosan-based injectable hydrogel as a promising in situ forming scaffold for cartilage tissue engineering. *Cell Biol Int*. 2013;38(1):72-84. doi.org/10.1002/cbin.10181
  43. Neumann A.J., Alini M., Archer C.W., Stoddart M.J. Chondrogenesis of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells is modulated by complex mechanical stimulation and adenoviral-mediated overexpression of bone morphogenetic protein 2. *Tissue Eng Part A*. 2013;11-19. doi.org/10.1089/ten.tea.2012.0411
  44. Ochi M., Uchio Y., Tobita M., Kuriwaka M. Current concepts in tissue engineering technique for repair of cartilage defect. *Artificial Organs*. 2001;25(3):172-179. doi.org/10.1046/j.1525-1594.2001.025003172.x
  45. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*. 1999;284:143-147. doi.org/10.1126/science.284.5411.143
  46. Raisin S., Belamie E., Morille M. Non-viral gene activated matrices for mesenchymal stem cells based tissue engineering of bone and cartilage. *Biomaterials*. 2016(21);104:223-237. doi.org/10.1016/j.biomaterials.2016.07.017
  47. Sakaguchi Y., Sekiya I., Yagishita K., Muneta T. Comparison of human stem cells derived from various mesenchymal tissues: superiority of synovium as a cell source. *Arthritis Rheum*. 2005;52(8):2521-2529. doi.org/10.1002/art.21212
  48. Saris D.B. et al. 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*. 2008;36:235-246. doi.org/10.1177/0363546507311095
  49. Saw K.Y., Anz A., Merican S., Tay Y., Ragavanaidu K., Jee C., McGuire D. Articular cartilage regeneration with autologous peripheral blood progenitor cells and hyaluronic acid after arthroscopic subchondral drilling: a report of 5 cases with histology. *Arthroscopy*. 2011;27:493-506. doi.org/10.1016/j.arthro.2010.11.054
  50. Saw K.Y., Anz A., Siew-Yoke Jee C., Merican S., Ching-Soong R., Roohi S.A., Ragavanaidu K. Articular cartilage regeneration with autologous peripheral blood stem cells versus hyaluronic acid: a randomized controlled trial. *Arthroscopy*. 2013;29:684-694. doi.org/10.1016/j.arthro.2012.12.008
  51. Sciarretta F.V. 5 to 8 years follow-up of knee chondral defects treated by PVA-H hydrogel implants. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2013;(17):3031-3038.
  52. Shimomura K., Ando W., Tateishi K., Nansai R., Fujie H., Hart D.A., Kohda H., Kita K., Kanamoto T., Mae T., Nakata K., Shino K., Yoshikawa H., Nakamura N. The influence of skeletal maturity on allogenic synovial mesenchymal stem cell-based repair of cartilage in a large animal model. *Biomaterials*. 2010;31:8004-8011. doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.07.017
  53. Steinwachs M., Peterson L., Bobic V., Verdonk P., Niemeyer P. Cell-seeded collagen matrix-supported autologous chondrocyte transplantation (ACT-CS): a consensus statement on surgical technique. *Cartilage*. 2012;3(1):5-12. doi.org/10.1177/1947603511415839
  54. Sun J., Zhong N., Li Q., Min Z., Zhao W., Sun Q., Tian L., Yu H., Shi Q., Zhang F., Lu S. MicroRNAs of rat articular cartilage at different developmental stages identified by Solexa sequencing. *Osteoarthritis Cartilage*. 2011;19(10):1237-1245. doi.org/10.1016/j.joca.2011.07.002
  55. Stokes D.G., Liu G., Dharmavaram R., Hawkins D., Piera-Velazquez S., Jimenez S.A. Regulation of type-II collagen gene expression during human chondrocyte de-differentiation and recovery of chondrocyte-specific phenotype in culture involves Sry-type high-mobility-group box (SOX) transcription factors. *Biochem J*. 2001;360(Pt2):461-470. doi.org/10.1042/bj3600461
  56. Strappe P., Gurusinghe S. Gene modification of mesenchymal stem cells and articular chondrocytes to enhance chondrogenesis. *Biomed Res Int*. 2014; 369528: doi:10.1155/2014/369528
  57. Teo B.J., Buhary K., Tai B.C., Hui J.H. Cell-based therapy improves function in adolescents and young adults with patellar osteochondritis dissecans. *Clin Orthop Relat Res*. 2012;471(4):1152-1158. doi.org/10.1007/s11999-012-2338-z
  58. Uematsu K., Hattori K., Ishimoto Y., Yamauchi J., Habata T., Takakura Y., Ohgushi H., Fukuchi T., Sato M. Cartilage regeneration using mesenchymal stem cells and a three-dimensional poly-lactic-glycolic acid (PLGA) scaffold. *Biomaterials*. 2005;26:4273-4279. doi.org/10.1016/j.biomaterials.2004.10.037
  59. Vasiliadis H.S., Danielson B., Ljungberg M., McKeon B., Lindahl A., Peterson L. Implantation of autologous chondrocytes for cartilaginous lesions in young patients. *Am J Sports Med*. 2010;38(5):943-949.
  60. Wakitani S., Goto T., Pineda S.J., Young R.G., Mansour J.M., Caplan A.I., Goldberg V.M. Mesenchymal cell-based repair of large, full-thickness defects of articular cartilage. *J Bone Joint Surg Am*. 1994;76(4):579-592.
  61. Wakitani S., Imoto K., Yamamoto T., Saito M., Murata N., Yoneda M. Human autologous culture expanded bone marrow mesenchymal cell transplantation for repair of cartilage defects in osteoarthritic knees. *Osteoarthritis Cartilage*. 2002;10:199-206. doi.org/10.1053/joca.2001.0504
  62. Wakitani S., Nawata M., Tensho K., Okabe T., Machida H., Ohgushi H. Repair of articular cartilage defects in the patello-femoral joint with autologous bone marrow mesenchymal cell transplantation: three case reports involving nine defects in five knees. *J Tissue Eng Regen Med*. 2007;1:74-79. doi.org/10.1002/term.8
  63. Wataru Ando, Hiromichi Fujie, Yu Moriguchi, Ryosuke Nansai, Kazunori Shimomura, David A. Hart,

- Hideki Yoshikawa, Norimasa Nakamura. Detection of abnormalities in the superficial zone of cartilage repaired using a tissue engineered construct derived from synovial stem cells. *Eur Cell Mater.* 2012;24:292-307. doi.org/10.1016/j.jbiomech.2015.10.015
64. Wayne J.S., McDowell C.L., Shields K.J., Tuan R.S. In vivo response of polylactic acid-alginate scaffolds and bone marrow-derived cells for cartilage tissue engineering. *Tissue Eng.* 2005;11:953-963. doi.org/10.1089/ten.2005.11.953
65. Yan C., Wang Y., Shen XY., Yang G., Jian J., Wang HS., Chen GQ., Wu Q. MicroRNA regulation associated chondrogenesis of mouse MSCs grown on polyhydroxyalkanoates. *Biomaterials.* 2011;32(27):6435-6444. doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.05.031
66. Yu-Chen Hu. Therapy for cartilage and bone tissue engineering. Heidelberg : Springer; 2014. 89 p. doi.org/10.1007/978-3-642-53923-7
67. Zhao Y.H., Yang Q., Xia Q., Peng J., Lu S.B., Guo Q.Y., Ma X.L., Xu B.S., Hu Y.C., Zhao B., Zhang L., Wang A.Y., Xu W.J., Miao J., Liu Y. In vitro cartilage production using an extracellular matrix-derived scaffold and bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Chin Med J (Engl).* 2013; 126:3130-3137. doi.org/10.1007/s12015-013-9456-1
68. Zeifang F., Oberle D., Nierhoff C., Richter W., Moradi B., Schmitt H. Autologous chondrocyte implantation using the original periosteum-cover technique versus matrix-associated autologous chondrocyte implantation: a randomized clinical trial. *Am J Sports Med.* 2009; 38(5): 924-933. doi.org/10.1177/0363546509351499

## СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

*Божокин Михаил Сергеевич* – лаборант-исследователь, ФГБУ «Российский научно-исследовательский институт травматологии и ортопедии им. Р.Р. Вредена» Минздрава России

*Божкова Светлана Анатольевна* – канд. мед. наук руководитель научного направления профилактики и лечения раневой инфекции, заведующая отделением клинической фармакологии, ФГБУ «Российский научно-исследовательский институт травматологии и ортопедии им. Р.Р. Вредена» Минздрава России

*Нетьлюк Георгий Иванович* – д-р мед. наук заведующий экспериментально-морфологическим отделением, ФГБУ «Российский научно-исследовательский институт травматологии и ортопедии им. Р.Р. Вредена» Минздрава России

## POSSIBILITIES OF CURRENT CELLULAR TECHNOLOGIES FOR ARTICULAR CARTILAGE REPAIR (analytical review)

M.S. Bozhokin, S.A. Bozhkova, G.I. Netylko

*Vreden Russian Research Institute of Traumatology and Orthopedics  
Ul. Akad. Baykova, 8, St. Petersburg, Russia, 195427*

**Abstract**

Despite a wide variety of surgical procedures utilized in clinical practice for treatment of articular cartilage lesions, the search for other options of articular reconstruction remains a relevant and open issue at the current stage of medicine and biotechnologies development. The recent years demonstrated a strong belief in cellular methods of hyaline cartilage repair such as implantation of autologous chondrocytes (ACI) or cultures of mesenchymal stem cells (MSC) including techniques for genetic modification of cells.

The purpose of presented review is to summarize the published scientific data on up to date results of perspective cellular technologies for articular cartilage repair that are being developed. Autologous chondrocyte transplantation originally performed by Swedish researchers in 1987 is considered the first clinically applied technique for restoration of hyaline cartilage using cellular technologies. However, the transplanted cell culture featured low proliferative capacity and inability to form a regenerate resistant to high physical activity. Another generation of methods originated at the turn of the century utilized mesenchymal stem cells instead of autologous chondrocytes. Preparation of MSCs is a less invasive procedure compared to chondrocytes harvesting and the culture is featured by a higher proliferative ability. Researchers use various biodegradable carriers (matrices) to secure cell fixation. Despite good clinical mid-term outcomes the transplanted tissue-engineering structures deteriorate with time due to cellular de-differentiation. Next generation of techniques being currently under pre-clinical studies is featured by the preliminary chondrogenic modification of transplanted cell culture. Usage of various growth factors, modified cell product and gene-activated matrices allow to gain a stable regulatory and key proteins synthesis and achieve a focused influence on regenerate's chondrogenic proliferation and in result to form a good hyaline cartilage resistant to high physical load in long term period.

**Cite as:** Bozhokin MS, Bozhkova SA, Netylko GI. [Possibilities of current cellular technologies for articular cartilage repair (analytical review)]. *Traumatologia i ortopedia Rossii.* 2016;22(3):122-134 [in Russian]. DOI 10.21823/2311-2905-2016-22-3-122-134.

✉ *Bozhokin Mikhail S.* Ul. Akad. Baykova, 8, St. Petersburg, Russia, 195427; e-mail: writeback@mail.ru

1 Received: 22.08.2016; Accepted for publication: 01.09.2016

Thus, development of methods for articular cartilage repair has long ago went beyond the interests of clinical physicians, and only the close interdisciplinary cooperation of clinicians and specialists for cytology, molecular genetics and, probably, virology would enable replacement of a defect with a rigorous hyaline cartilage.

**Keywords:** cartilage regeneration, chondrocytes, MSC.

DOI 10.21823/2311-2905-2016-22-3-122-134

**Competing interests:** the authors declare that they have no competing interests.

**Funding:** the authors have no support or funding to report.

## References

- Bozhkova SA, Bujanov AL, Kochish AJu, Rumakin VP, Hripunov AK, Netyl'ko GI, Smyslov RJu, Afanas'ev AV, Panarin EF. [Perifocal tissue reaction to the implantation of hydrogel materials samples based on cellulose addition (pilot study)]. *Morfologija*. [Morphology]. 2016;149(2): 47-53. [in Russ.]
- Brjanskaja AI, Kuljaba TA, Kornilov NN, Rumakin VP, Gornostaev VS. [Arthroplasty using autologous multipotent mesenchymal cells and collagen membrane Chondro-Gide®]. *Vestnik travmatologii i ortopedii im. N.N. Priorova*. [Reporter of Traumatology and Orthopedics named Priorov]. 2014;1:62-66. [in Russ.]
- Deev RV, Grigorjan AS, Krugljakov PV, Bilibina A.A., Sokolova I.B., Pavlichenko N.N., Polyncev D.G. [The use of transplants containing multipotent mesenchymal stromal cells for the repair of the articular surface in experiment]. *Geny i kletki* [Gene and Cells]. 2010;5(2):44-55. [in Russ.]
- Nashhekina JuA, Nikonov PO, Mihajlov VM, Pinaev GP. [The Dependence of the filling BMSC on the three-dimensional matrix from method of seeding and type of surface matrix modification]. *Citologija* [Cytology]. 2014; 56(4):283-290. [in Russ.]
- Novochadov VV. [The control of the cell settlement and scaffold remodeling in cartilage tissue engineering: a review]. *Vestnik Volgogradskogo gosudarstvennogo universiteta. Estestvennyye nauki*. [Science journal of Volgograd state university. Natural Science]. 2013. №1(5): 19-28. [in Russ.]
- Omel'janenko NP, Sluckij LI. Soedinitel'naja tkan' T. 2. [Connective tissue]. M.: Izvestija; 2009. 378 c. [in Russ.]
- Sovetnikov NN, Kal'sin VA, Konopljannikov MA, Muhanov VV. [Cell technologies and tissue engineering in treatment of articular chondral defects]. *Klinicheskaja praktika* [Clinical practice]. 2013;(1):52-66. [in Russ.]
- Bekkers JE, Tsuchida AI, van Rijen MH, Vonk LA, Dhert WJ, Creemers LB, Saris DB. Single-stage cell-based cartilage regeneration using a combination of chondrons and mesenchymal stromal cells: comparison with microfracture. *Am J Sports Med*. 2013;41(9):2158-2166. doi.org/10.1177/0363546513494181
- Brittberg M, Lindahl A, Nilsson A, Ohlsson C, Isaksson O, Peterson L. Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation. *N Eng J Med*. 1994; (331): 889-895. doi.org/10.1056/nejm199410063311401
- Capeci C.M., Turchiano M., Strauss E.J., Youm T. Osteochondral allografts: applications in treating articular cartilage defects in the knee. *Bull Hosp J Dis*. 2013;71(1):60-67.
- Choi J, Choi B, Park S, Pai K, Li T, Min B, Park S. Mechanical stimulation by ultrasound enhances chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells in a fibrin-hyaluronic acid hydrogel. *Artif Organs*. 2013; 37(7):648-655. doi:10.1111/aor.12041.
- Darling E, Athanasiou K. Rapid phenotypic changes in passaged articular chondrocyte subpopulations. *J Orthop Res*. 2005;23(2):425-432. doi.org/10.1016/j.orthres.2004.08.008
- Gigante A, Cecconi S, Calcagno S, Busilacchi A, Enea D. Arthroscopic knee cartilage repair with covered microfracture and bone marrow concentrate. *Arthrosc Tech*. 2012;1:175-180. doi.org/10.1016/j.eats.2012.07.001
- Giannini S, Buda R, Vannini F, Cavallo M, Grigolo B. One-step bone marrow-derived cell transplantation in talar osteochondral lesions. *Clin Orthop Relat Res*. 2009; 467:3307-3320. doi.org/10.1007/s11999-009-0885-8
- Giannini S, Buda R, Cavallo M, Ruffilli A, Cenacchi A, Cavallo C, Vannini F. Cartilage repair evolution in post-traumatic osteochondral lesions of the talus: from open field autologous chondrocyte to bone-marrow-derived cells transplantation. *Injury*. 2010;41:1196-1203. doi.org/10.1016/j.injury.2010.09.028
- Gille J, Schuseil E, Wimmer J, Gellissen J, Schulz AP, Behrens P. Mid-term results of autologous matrix-induced chondrogenesis for treatment of focal cartilage defects in the knee. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*. 2010; 18(11):1456-1465. doi.org/10.1007/s00167-010-1042-3
- Grigolo B, Lisignoli G, Piacentini A, Fiorini M, Gobbi P, Mazzotti G, Duca M, Pavesio A, Facchini A. Evidence for redifferentiation of human chondrocytes grown on a hyaluronan-based biomaterial (HYAff 11): molecular, immunohistochemical and ultrastructural analysis. *Biomaterials*. 2002;23(4):1187-1195. doi.org/10.1016/s0142-9612(01)00236-8
- Im GI. Gene transfer strategies to promote chondrogenesis and cartilage regeneration. *Tissue Eng Part B Rev*. 2016;22(2):136-148. doi.org/10.1089/ten.teb.2015.0347
- Johnstone B, Hering M, Caplan I, Goldberg M, Yoo U. In vitro chondrogenesis of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells. *Exp Cell Res*. 1998;238: 265-272.
- Jomha NM, Adesida AB, Bornes TD. Mesenchymal stem cells in the treatment of traumatic articular cartilage defects: a comprehensive review. *Arthritis Res Ther*. 2014;16:432-451. doi.org/10.1186/s13075-014-0432-1
- Karlsen TA, Shahdadfar A, Brinchmann JE. Human primary articular chondrocytes, chondroblasts-like cells, and dedifferentiated chondrocytes: differences in gene, microRNA, and protein expression and phenotype. *Tissue Eng Part C Methods*. 2011;17(2):219-227. doi: 10.1089/ten.TEC.2010.0200
- Khan WS, Tew SR, Adesida AB, Hardingham TE. Human infrapatellar fat pad-derived stem cells express the pericyte marker 3G5 and show enhanced chondrogenesis after expansion in fibroblast growth factor-2. *Arthritis Res Ther*. 2008;10(4):10-17. doi.org/10.1186/ar2448
- Kon E, Vannini F, Buda R, Filardo G, Cavallo M, Ruffilli A, Nanni M, Di Martino A, Marcacci M, Giannini S. How to treat osteochondritis dissecans of the knee: surgical techniques and new trends: AAOS

- exhibit selection. *J Bone Joint Surg Am.* 2012;94:1-8. doi.org/10.2106/jbjs.k.00748
25. Koh YG, Kwon OR, Kim YS, Choi YJ, Tak DH. Adipose-derived mesenchymal stem cells with microfracture versus microfracture alone: 2-year follow-up of a prospective randomized trial. *Arthroscopy.* 2016;32(1):97-109.
  26. Kon E, Filardo G, Berruto M, Benazzo F, Zanon G, Della Villa S, Marcacci M. Articular cartilage treatment in high-level male soccer players: a prospective comparative study of arthroscopic second-generation autologous chondrocyte implantation versus microfracture. *Am J Sports Med.* 2011; 39:2549-2557. doi.org/10.1177/0363546511420688
  27. Kuroda R, Ishida K, Matsumoto T, Akisue T, Fujioka H, Mizuno K, Ohgushi H, Wakitani S, Kurosaka M. Treatment of a full-thickness articular cartilage defect in the femoral condyle of an athlete with autologous bone-marrow stromal cells. *Osteoarthritis Cartilage.* 2007;15: 226-231. doi.org/10.1016/j.joca.2006.08.008
  28. Kuroda R, Ishida K, Matsumoto T, Akisue T, Fujioka H, Mizuno K, Ohgushi H, Wakitani S, Kurosaka M. Treatment of a full-thickness articular cartilage defect in the femoral condyle of an athlete with autologous bone-marrow stromal cells. *Osteoarthritis Cartilage.* 2011;17(2): 219-227. doi.org/10.1089/ten.tec.2010.0200
  29. Kafienah W, Mistry S, Dickinson SC, Sims TJ, Learmonth I, Hollander AP. Three-dimensional cartilage tissue engineering using adult stem cells from osteoarthritis patients. *Arthritis Rheum.* 2007;56:177-187. doi.org/10.1016/s1063-4584(07)61356-9
  30. Li Q, Tang J, Wang R, Bei C, Xin L, Zeng Y, Tang X. Comparing the chondrogenic potential in vivo of autogeneic mesenchymal stem cells derived from different tissues. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol.* 2010; 39:31-38. doi.org/10.3109/10731191003776769
  31. Liao YH, Chang YH, Sung LY, Li KC, Yeh CL, Yen TC, Hwang SM, Lin KJ, Hu YC. Osteogenic differentiation of adipose-derived stem cells and calvarial defect repair using baculovirus-mediated co-expression of BMP-2 and miR-148b. *Biomaterials.* 2014;35(18):4901-4910. doi.org/10.1016/j.biomaterials.2014.02.055
  32. Makris EA, Gomoll AH, Malizos KN, Hu JC, Athanasiou KA. Repair and tissue engineering techniques for articular cartilage. *Nat Rev Rheumatol.* 2014;11(1):21-34. doi.org/10.1038/nrrheum.2014.157
  33. Madry H, Orth P, Kaul G, Zurakowski D, Menger MD, Kohn D, Cucchiari M. Acceleration of articular cartilage repair by combined gene transfer of human insulin-like growth factor I and fibroblast growth factor-2 in vivo. *Arch Orthop Trauma Surg.* 2010;130(10):1311-1322. doi.org/10.1007/s00402-010-1130-3
  34. Martin I, Muraglia A, Campanile G, Cancedda R, Quarto R. Fibroblast growth factor-2 supports ex vivo expansion and maintenance of osteogenic precursors from human bone marrow. *Endocrinology.* 1997;138:4456-4462. doi: 10.1210/endo.138.10.5425
  35. Martinez I, Elvenes J, Olsen R, Bertheussen K, Johansen O. Redifferentiation of in vitro expanded adult articular chondrocytes by combining the hanging-drop cultivation method with hypoxic environment. *Cell Transplant.* 2008;17:987-996. doi.org/10.3727/096368908786576499
  36. Marlovits S, Hombauer M, Truppe M, Vècsei V, Schlegel W. Changes in the ratio of type-I and type-II collagen expression during monolayer culture of human chondrocytes. *J Bone Joint Surg Br.* 2004;86(2):286-295. doi.org/10.1302/0301-620x.86b2.14918
  37. Murphy J.M, Marloes L, de Vries-van Melle ML, Narcisi R, Kops N, Koevoet WJ, Bos PK, Verhaar JA, van der Kraan PM, van Osch GJ. Chondrogenesis of mesenchymal stem cells in an osteochondral environment is mediated by the subchondral bone. *Tissue Eng Part A.* 2014;20(1-2):23-33. doi.org/10.1089/ten.tea.2013.0080
  38. Marquass B, Schulz R, Hepp P, Zscharnack M, Aigner T, Schmidt S, Stein F, Richter R, Osterhoff G, Aust G, Josten C, Bader A. Matrix-associated implantation of predifferentiated mesenchymal stem cells versus articular chondrocytes: in vivo results of cartilage repair after 1 year. *Am J Sports Med.* 2011;39:1401-1412. doi.org/10.1177/0363546511398646
  39. Matsuda C, Takagi M, Hattori T, Wakitani S, Yoshida T. Differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells to chondrocytes for construction of three-dimensional cartilage tissue. *Cytotechnology.* 2005;47: 11-17. doi.org/10.1007/s10616-005-3751-x
  40. Mobasheri A, Kalamegam G, Musumeci G, Batt ME. Chondrocyte and mesenchymal stem cell-based therapies for cartilage repair in osteoarthritis and related orthopaedic conditions. *Maturitas.* 2014;78(3):188-198. doi.org/10.1016/j.maturitas.2014.04.017
  41. Mukonoweshuro B, Brown C.J, Fisher J, Ingham E. Immunogenicity of undifferentiated and differentiated allogeneic mouse mesenchymal stem cells. *J Tissue Eng.* 2014;5:1-15. doi.org/10.1177/2041731414534255
  42. Naderi-Meshkin H, Andreas K, Matin MM, Sittlinger M, Bidkhorri HR, Ahmadiankia N, Bahrami AR, Ringe J. Chitosan-based injectable hydrogel as a promising in situ forming scaffold for cartilage tissue engineering. *Cell Biol Int.* 2013;38(1):72-84. doi.org/10.1002/cbin.10181
  43. Neumann AJ, Alini M, Archer CW, Stoddart MJ. Chondrogenesis of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells is modulated by complex mechanical stimulation and adenoviral-mediated overexpression of bone morphogenetic protein 2. *Tissue Eng Part A.* 2013;11-19. doi.org/10.1089/ten.tea.2012.0411
  44. Ochi M, Uchio Y, Tobita M, Kuriwaka M. Current concepts in tissue engineering technique for repair of cartilage defect. *Artificial Organs.* 2001;25(3):172-179. doi.org/10.1046/j.1525-1594.2001.025003172.x
  45. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science.* 1999;284: 143-147. doi.org/10.1126/science.284.5411.143
  46. Raisz S, Belamie E, Morille M. Non-viral gene activated matrices for mesenchymal stem cells based tissue engineering of bone and cartilage. *Biomaterials.* 2016(21);104:223-237. doi.org/10.1016/j.biomaterials.2016.07.017
  47. Sakaguchi Y, Sekiya I, Yagishita K, Muneta T. Comparison of human stem cells derived from various mesenchymal tissues: superiority of synovium as a cell source. *Arthritis Rheum.* 2005;52(8):2521-2529. doi.org/10.1002/art.21212
  48. Saris DB. et al. 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.* 2008;36:235-246. doi.org/10.1177/0363546507311095
  49. Saw K.Y, Anz A, Merican S, Tay Y, Ragavanaidu K, Jee C, McGuire D. Articular cartilage regeneration with autologous peripheral blood progenitor cells and hyaluronic acid after arthroscopic subchondral drilling: a report of 5 cases with histology. *Arthroscopy.* 2011;27: 493-506. doi.org/10.1016/j.arthro.2010.11.054

50. Saw KY, Anz A, Siew-Yoke Jee C, Merican S, Ching-Soong R, Roohi SA, Ragavanaidu K. Articular cartilage regeneration with autologous peripheral blood stem cells versus hyaluronic acid: a randomized controlled trial. *Arthroscopy*. 2013;29:684-694. doi.org/10.1016/j.arthro.2012.12.008
51. Sciaretta FV. 5 to 8 years follow-up of knee chondral defects treated by PVA-H hydrogel implants. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2013;(17):3031-3038.
52. Shimomura K, Ando W, Tateishi K, Nansai R, Fujie H, Hart DA, Kohda H, Kita K, Kanamoto T, Mae T, Nakata K, Shino K, Yoshikawa H, Nakamura N. The influence of skeletal maturity on allogenic synovial mesenchymal stem cell-based repair of cartilage in a large animal model. *Biomaterials*. 2010;31:8004-8011. doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.07.017
53. Steinwachs M, Peterson L, Bobic V, Verdonk P, Niemeyer P. Cell-seeded collagen matrix-supported autologous chondrocyte transplantation (ACT-CS): a consensus statement on surgical technique. *Cartilage*. 2012;3(1):5-12. doi.org/10.1177/1947603511415839
54. Sun J, Zhong N, Li Q, Min Z, Zhao W, Sun Q, Tian L, Yu H, Shi Q, Zhang F, Lu S. MicroRNAs of rat articular cartilage at different developmental stages identified by Solexa sequencing. *Osteoarthritis Cartilage*. 2011;19(10): 1237-1245. doi.org/10.1016/j.joca.2011.07.002
55. Stokes DG, Liu G, Dharmavaram R, Hawkins D, Piera-Velazquez S, Jimenez SA. Regulation of type-II collagen gene expression during human chondrocyte de-differentiation and recovery of chondrocyte-specific phenotype in culture involves Sry-type high-mobility-group box (SOX) transcription factors. *Biochem J*. 2001; 360(Pt2):461-470. doi.org/10.1042/bj3600461
56. Strappe P, Gurusinghe S. Gene modification of mesenchymal stem cells and articular chondrocytes to enhance chondrogenesis. *Biomed Res Int*. 2014; 369528: doi:10.1155/2014/369528
57. Teo BJ, Buhary K, Tai BC, Hui JH. Cell-based therapy improves function in adolescents and young adults with patellar osteochondritis dissecans. *Clin Orthop Relat Res*. 2012;471(4):1152-1158. doi.org/10.1007/s11999-012-2338-z
58. Uematsu K, Hattori K, Ishimoto Y, Yamauchi J, Habata T, Takakura Y, Ohgushi H, Fukuchi T, Sato M. Cartilage regeneration using mesenchymal stem cells and a three-dimensional poly-lactic-glycolic acid (PLGA) scaffold. *Biomaterials*. 2005;26:4273-4279. doi.org/10.1016/j.biomaterials.2004.10.037
59. Vasiliadis HS, Danielson B, Ljungberg M, McKeon B, Lindahl A, Peterson L. Implantation of autologous chondrocytes for cartilagenous lesions in young patients. *Am J Sports Med*. 2010;38(5): 943-949.
60. Wakitani S, Goto T, Pineda SJ, Young RG, Mansour JM, Caplan AI, Goldberg VM. Mesenchymal cell-based repair of large, full-thickness defects of articular cartilage. *J Bone Joint Surg Am*. 1994;76(4): 579-592.
61. Wakitani S, Imoto K, Yamamoto T, Saito M, Murata N, Yoneda M. Human autologous culture expanded bone marrow mesenchymal cell transplantation for repair of cartilage defects in osteoarthritic knees. *Osteoarthritis Cartilage*. 2002;10:199-206. doi.org/10.1053/joca.2001.0504
62. Wakitani S, Nawata M, Tensho K, Okabe T, Machida H, Ohgushi H. Repair of articular cartilage defects in the patello-femoral joint with autologous bone marrow mesenchymal cell transplantation: three case reports involving nine defects in five knees. *J Tissue Eng Regen Med*. 2007;1:74-79. doi.org/10.1002/term.8
63. Wataru Ando, Hiromichi Fujie, Yu Moriguchi, Ryosuke Nansai, Kazunori Shimomura, David A. Hart, Hideki Yoshikawa, Norimasa Nakamura. Detection of abnormalities in the superficial zone of cartilage repaired using a tissue engineered construct derived from synovial stem cells. *Eur Cell Mater*. 2012;24:292-307. doi.org/10.1016/j.jbiomech.2015.10.015
64. Wayne JS, McDowell CL, Shields KJ, Tuan RS. In vivo response of polylactic acid-alginate scaffolds and bone marrow-derived cells for cartilage tissue engineering. *Tissue Eng*. 2005;11:953-963. doi.org/10.1089/ten.2005.11.953
65. Yan C, Wang Y, Shen XY, Yang G, Jian J, Wang HS, Chen GQ, Wu Q. MicroRNA regulation associated chondrogenesis of mouse MSCs grown on polyhydroxyalkanoates. *Biomaterials*. 2011;32(27):6435-6444. doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.05.031
66. Yu-Chen Hu. Therapy for cartilage and bone tissue engineering. Heidelberg : Springer; 2014. 89 p. doi.org/10.1007/978-3-642-53923-7
67. Zhao YH, Yang Q, Xia Q, Peng KJ, Lu SB, Guo QY, Ma XL, Xu BS, Hu YC, Zhao B, Zhang L, Wang AY, Xu WJ, Miao J, Liu Y. In vitro cartilage production using an extracellular matrix-derived scaffold and bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Chin Med J (Engl)*. 2013; 126:3130-3137. doi.org/10.1007/s12015-013-9456-1
68. Zeifang F, Oberle D, Nierhoff C, Richter W, Moradi B, Schmitt H. Autologous chondrocyte implantation using the original periosteum-cover technique versus matrix-associated autologous chondrocyte implantation: a randomized clinical trial. *Am J Sports Med*. 2009; 38(5): 924-933. doi.org/10.1177/0363546509351499

---

#### INFORMATION ABOUT AUTHORS:

*Bozhokin Mikhail S.* – assistant researcher, Vreden Russian Research Institute of Traumatology and Orthopedics

*Bozhkova Svetlana A.* – head of the research Department of prevention and treatment of wound infection and Department of clinical pharmacology, Vreden Russian Research Institute of Traumatology and Orthopedics

*Netylko Georgy I.* – head of the research Department of experimental morphology, Vreden Russian Research Institute of Traumatology and Orthopedics