

ДИСКУССИОННЫЕ СТАТЬИ, ЛЕКЦИИ, НОВЫЕ ТРЕНДЫ МЕДИЦИНСКОЙ НАУКИ

DISCUSSION PAPERS, LECTURES, NEW TRENDS IN MEDICAL SCIENCE

DOI: 10.29413/ABS.2020-5.6.8

Клеточные технологии в травматологии: от клетки до тканевой инженерии

Дремина Н.Н., Трухан И.С., Шурыгина И.А.

ФГБНУ «Иркутский научный центр хирургии и травматологии» (664003, г. Иркутск, ул. Борцов Революции, 1, Россия)

Автор, ответственный за переписку: Дремина Наталья Николаевна, e-mail: drema76@mail.ru

Резюме

Тяжёлые травмы опорно-двигательного аппарата с повреждением костной и хрящевой тканей сопряжены с необходимостью поиска способов замещения дефектов. Современные способы лечения, в том числе включающие применение аутотрансплантатов, современных синтетических материалов, часто недостаточно эффективны. Статья посвящена перспективам разработки новых направлений в лечении травматологической патологии, основанных на применении клеточных технологий. Подробно обсуждены как медицинские, так и этические аспекты применения клеточных технологий и использования различных источников клеточного материала для трансплантации. Особое место уделено применению мезенхимальных стволовых клеток как наиболее подходящего материала для репарации костной и хрящевой тканей. Данные клетки обладают свойствами мультипотентных стволовых клеток, способных адгезироваться на пластиковые поверхности, дифференцироваться в различные клетки, включая хондробласты, остеобласты, и мигрировать в повреждённый участок. Показано, что количество и биологические характеристики выделяемых клеток зависят от ткани, метода выделения клеток и питательной среды. Во время культивирования мезенхимальных стволовых клеток, истинным маркером которых является Stro-1, необходимо следить за длительностью и количеством пассажей, так как это обратно коррелирует с дифференцирующим потенциалом клеток и может произойти спонтанная трансформация по онкогенному пути.

Таким образом, мезенхимальные стволовые клетки представляют собой современный материал для реконструкции твёрдых тканей. Несмотря на этические и технологические проблемы, клеточные технологии являются перспективным методом регенеративной медицины.

Ключевые слова: клеточные технологии, мезенхимальные стволовые клетки, репарация, травматология, кость, хрящ

Для цитирования: Дремина Н.Н., Трухан И.С., Шурыгина И.А. Клеточные технологии в травматологии: от клетки до тканевой инженерии. *Acta biomedica scientifica*. 2020; 5(6): 66-76. doi: 10.29413/ABS.2020-5.6.8

Cellular Technologies in Traumatology: from Cells to Tissue Engineering

Dremina N.N., Trukhan I.S., Shurygina I.A.

Irkutsk Scientific Center of Surgery and Traumatology (Bortsov Revolyutsii str. 1, Irkutsk 664003, Russian Federation)

Corresponding author: Natalya N. Dremina, e-mail: drema76@mail.ru

Abstract

Severe injuries of the musculoskeletal system with damage of bone and cartilaginous tissue are associated with the necessity to find ways for replacement of defects. Current methods of treatment including the usage of autografts and modern synthetic materials are often not effective enough. The article deals with the prospects for developing the new areas in the traumatological pathology treatment based on the cell technologies application. Both medical and ethical aspects of the cell technology usage and the utilizing various sources of cell material for transplantation are discussed in detail. Special attention is devoted to application of the mesenchymal stem cells as the most suitable material for bone and cartilage repair. These cells possess the properties of multipotent stem cells that can adhere to plastic surfaces, differentiate into various cells, including chondroblasts, osteoblasts, and migrate to the damaged area. It is shown that the number and biological characteristics of the isolated cells depend on the tissue, the cell isolation method, and the culture medium. During the cultivation of mesenchymal stem cells, the true marker of which is Stro-1, it is necessary to monitor the duration and number of passages, because these values are inversely correlated with the differentiating potential of cells, and spontaneous transformation according to oncogenic pathway may occur.

Thus, mesenchymal stem cells represent a current material for the reconstruction of hard tissues. Despite ethical and technological problems, cell technologies are a promising approach in regenerative medicine.

Key words: cell technologies, mesenchymal stem cells, reparation, traumatology, bone, cartilage

For citation: Dremina N.N., Trukhan I.S., Shurygina I.A. Cellular Technologies in Traumatology: from Cells to Tissue Engineering. *Acta biomedica scientifica*. 2020; 5(6): 66-76. doi: 10.29413/ABS.2020-5.6.8

ПРИНЯТЫЕ СОКРАЩЕНИЯ

ИПСК	– индуцированные плюрипотентные стволовые клетки
МСК	– мезенхимальные стволовые клетки
ТСК	– тканеспецифические стволовыми клетками
ЩФ	– щелочная фосфатаза
ЭСК	– эмбриональные стволовые клетки
CD10	– мембранная металлоэндопептидаза, кластер дифференцировки 10
CD11b	– интегрин альфа М, кластер дифференцировки 11b
CD13	– аланинаминопептидаза, миелоидный гликопротеин плазматической мембраны CD13, кластер дифференцировки 13
CD14	– кластер дифференцировки 14
CD19	– В-лимфоцитарный антиген, кластер дифференцировки 19
CD29	– интегрин бета-1, кластер дифференцировки 29
CD31	– молекула адгезии эндотелиальных клеток, кластер дифференцировки 31
CD34	– трансмембранный фосфогликопротеин, кластер дифференцировки 34
CD44	– гликопротеин клеточной поверхности, кластер дифференцировки 44
CD45	– тирозинкиназная протеинфосфатаза С рецепторного типа, кластер дифференцировки 45
CD73	– экто-5'-нуклеотидаза, кластер дифференцировки 73
CD79a	– кластер дифференцировки 79a
CD90/Thy-1	– кластер дифференцировки 90
CD105	– эндоглин, кластер дифференцировки 105
CD106 (VCAM-1)	– васкулярная молекула клеточной адгезии 1, кластер дифференцировки 106
CD117	– рецептор фактора роста тучных и стволовых клеток, кластер дифференцировки 117
CD271/NGFR	– рецептор фактора роста нервов, кластер дифференцировки 271
CD309	– рецептор фактора роста сосудистого эндотелия, тип 2, кластер дифференцировки 309
DMEM	– модифицированная среда Игла
FBS	– фетальная бычья сыворотка
FGFb	– основной фибробластический фактор роста
PDGF-BB	– тромбоцитарный фактор роста BB
Sca-1	– антиген стволовых клеток 1
Stro-1	– маркер мезенхимальных стволовых клеток
TGF β	– трансформирующий фактор роста β

ВВЕДЕНИЕ

Клеточные технологии – одна из самых динамично развивающихся научных областей XXI века. Практически не осталось ни одной отрасли медицины, где бы сегодня не применялись технологии с использованием клеток, направленные на создание биологической ткани для восстановления, поддержания, улучшения формы и функции ткани или органа [1]. Прежде всего, это имплантация ткани, выращенной *in vitro* для замещения повреждённых участков кожи при ожогах, скальпированных и долго незаживающих ранах [2, 3]. Это онкологические и гематологические [4, 5, 6], сердечно-сосудистые заболевания [7, 8, 9], различные нейродегенеративные расстройства, а также травмы головного и спинного мозга, ранее считавшиеся неизлечимыми [10]. Сюда же входит стоматология [11], офтальмология [12] и эндокринология, где для лечения сахарного диабета используют трансплантаты островковых клеток поджелудочной железы [13]. При различных формах печёночной недостаточности применяют донорские изолированные гепатоциты. Нейротрансплантация также нашла применение при лечении болезней Альцгеймера, Паркинсона, Хантингтона [14].

БИОЭТИЧЕСКИЕ ПРОБЛЕМЫ

ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ КЛЕТОЧНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ

Благодаря успешному внедрению в медицину клеточных технологий сформировалось понятие биоэтика – наука, решающая правовые и морально-этические проблемы, приоритетом которой считаются интересы пациента и общества, а не интересы науки. До сих пор остаётся открытым вопрос – является ли этическим использование эмбриональных и фетальных стволовых клеток, имеем ли мы на это право? Во многих странах зародыш, даже на ранних стадиях развития, считается потенциальным человеком, а разрушение эмбриона приравнивается к убийству [15, 16, 17]. Такого же мнения придерживается ряд международных документов, к которым относятся «Всеобщая декларация прав человека», «Международный пакт о гражданских и политических правах», а «Европейская конвенция по защите прав и достоинств человека» прямо запрещает создавать эмбрионы в научных целях.

Наряду с этим существуют и другие проблемы, касающиеся малоизвестных клиник, которые гарантируют благоприятный исход лечения практически при любой патологии. Рекламируют стволовые клетки как панацею,

приписывая им несуществующие свойства, умалчивают о побочных эффектах, подвергая пациента опасности. Люди некоторых религиозных конфессий также крайне негативно относятся к терапии с использованием стволовых клеток, порой отказываясь от медицинской помощи вовсе. Не остаётся в стороне и вопрос анонимности доноров и разрешения на использование материала, затраты и другие регуляторные аспекты [18, 19]. Не стоит забывать и о техническом оснащении самой лаборатории по выделению и культивированию клеток, требующем определённого оборудования для получения достойных результатов.

В последнее десятилетие мнение по некоторым этическим вопросам меняется [20]. Так, считается, что терапия, направленная на лечение патологий, имеющая некоторые негативные последствия, является морально приемлемой при соблюдении четырёх условий:

- Главная цель действия и само действие – это благо;
- Вредные последствия происходят не намеренно;
- Вредное воздействие не является целью действия, а хорошее воздействие не является прямым причинно-следственным результатом вредного воздействия;

• Предполагаемый положительный эффект так же велик, как и побочные эффекты, или больше, или пропорционален им.

Несмотря на вышеизложенные проблемы, клеточные технологии признаны перспективным направлением медицины сегодня. И с большой долей вероятности большинство этических проблем будут решены благодаря масштабной помощи с использованием клеточных технологий людям, потерявшим надежду на излечение традиционными методами.

Среди всех сфер медицины одним из ключевых направлений является травматология, так как болезни опорно-двигательного аппарата поражают ~50 % людей старше 18 лет и ~75 % людей в возрасте ≥ 65 лет. В травматологии клеточную инженерию формально можно разделить на инженерию костей, суставов и сухожилий.

КЛЕТочНЫЕ ТЕХНОЛОГИИ В ИНЖЕНЕРИИ КОСТНОЙ ТКАНИ

Потребность в инженерии кости чаще всего возникает в случае многооскольчатых переломов костей, замедленной консолидации костных отломков, образования ложных суставов, остеонкологических проблемах и при всех состояниях, когда резерв скелетной ткани не способен обеспечить собственный процесс репарации [1, 21, 22]. Сложнее дело обстоит с восстановлением костей свода черепа из-за биологических особенностей, риска резорбирования регенерата в зоне повреждения ввиду отсутствия постоянной механической нагрузки, а также образования спаек в субдуральном пространстве с выраженной неврологической симптоматикой.

Несмотря на внедрение современных технологий в области травматологии, замедленная консолидация при переломах варьирует от 1 до 18 % [23].

Традиционное, стандартное лечение костных дефектов, основанное на костном аутооттрансплантате или аллотрансплантате, долгое время считалось самой безопасной и эффективной процедурой трансплантации, поскольку аутооттрансплантат содержит собственные костные растущие клетки пациента (для усиления остеогенеза) и белки (для усиления остеоиндукции),

обеспечивая при этом основу для роста новой кости (остеоиндукции). Однако костный аутооттрансплантат ограничен в размере и его забор (чаще из гребня подвздошной кости) представляет собой дополнительное хирургическое вмешательство с последующими болями в зоне забора, снижением остеогенного потенциала донорского участка, отторжением трансплантата или разрастанием фиброзной ткани [24]. Аллотрансплантат, поступающий из тканевых банков, не содержит живых клеток, а некоторые матричные белки разрушаются обработкой при инактивации вирусов, замораживании, поэтому он гарантирует только остеоиндуктивные свойства.

Физиологическое сходство костной ткани между человеком и млекопитающими позволяет рассматривать минеральную ткань млекопитающих в качестве источника костных ксенотрансплантатов для использования человеком. В качестве доноров чаще используют крупный рогатый скот, лошадь, свинью. Считается, что такие трансплантаты обладают остеогенными и остеоиндуктивными свойствами. После забора ксенотрансплантаты стерилизуют и очищают при низкой температуре, сочетая механические и химические процессы удаления клеток, липидов и других источников антигенного материала [25]. После очистки ксенотрансплантаты могут быть использованы как самостоятельно, так и в сочетании с аутооттрансплантатами, чтобы уменьшить объем аутогенной кости и улучшить регенерацию по сравнению с одними ксенотрансплантатами.

Улучшению пролиферации стволовых клеток и повышению остеогенного потенциала способствует покрытие трансплантата поли(1-лактид-со-ε-капролактоном) и полисахаридами [26]. Остеогенной дифференцировке способствует добавление к ксенотрансплантатам фторид-ионов [27]. Для повышения гидрофильности и улучшения механических свойств к биокерамическим ксенотрансплантатам добавляют полимеры и белки, а использование высокомолекулярной гиалуроновой кислоты способствует процессу костной регенерации [28]. Однако в ряде экспериментальных работ отмечалось отторжение, медленная или частичная интеграция.

Учитывая негативные последствия ауто-, алло- и ксенотрансплантатов, учёные продолжают искать различные биосовместимые материалы с использованием клеток вместо пересаженной кости [29].

Наиболее широко используемыми биоматериалами являются кальций-фосфатная керамика, которая обычно объединяет гидроксипатит и трикальцийфосфат с порами. Эти материалы способствуют адгезии, пролиферации и остеобластической дифференцировке мезенхимальных стволовых клеток – МСК, а также выработке коллагенового матрикса, который впоследствии подвергается минерализации. Широко используются также коллагеновые губки и биоразлагаемые полимеры.

Идеального биоразлагаемого носителя в качестве каркаса на сегодняшний день не существует из-за ряда проблем, включающих недостаточную биологическую активность, иммуногенность и воспалительные реакции, нестабильную скорость деградации и неконтролируемые взаимодействия клетки и биоматериала, а также низкую эффективность прикрепления клеток и гетерогенное клеточное распределение [30].

Перспективным направлением в этой сфере является исследование биокерамики морского происхождения,

которое обеспечивает взаимосвязанную пористость в иерархической структуре, аналогичной трабекулярной кости человека, что делает материал подходящим в качестве костных трансплантатов с остеокондуктивными свойствами [31].

Одним из примеров является экзоскелет некоторых видов кораллов, в основном состоящий из кристаллической керамической структуры арагонита (карбоната кальция). Учитывая доступность больших количеств, чаще используют такие кораллы, как пориты и гониопоры. Однако они не обладают достаточной прочностью при сжатии, а поглощение карбоната кальция происходит слишком быстро, что ограничивает применение этих трансплантатов. Для повышения прочности коралловых скелетов возможно провести химическую трансформацию из нативного состава карбоната кальция в гидроксипатит путём гидротермальной конверсии [32]. Эта процедура увеличивает долговечность трансплантата, поскольку полученный гидроксипатит медленно разлагается, а полная резорбция достигается через год и дольше. При тестировании данного материала выяснилось, что у всех пациентов наблюдалась экструзия, т. е. трансплантат перемещался, а скорость резорбции была слишком медленной.

Помимо кораллов другими традиционно изучаемыми морскими биокерамическими источниками являются морские раковины, скелеты губок, шипы морских ежей, кости рыб и зубы акул [31]. При получении в виде порошков эта керамика демонстрировала частицы стержневой формы и хорошую биосовместимость *in vitro* независимо от источника.

Из всех источников карбоната кальция наиболее изученным в качестве костного трансплантата является перламутр. Он состоит из высококристаллического ацеллюлярного карбоната кальция в виде псевдогексагональных наноэзерн арагонита, инкапсулированных во внутрикристаллическую органическую матрицу. Органический материал содержит около 1,7% или менее и может быть удалён термической обработкой при высокой температуре, при которой арагонит превращается в кальцит. По данным исследований, перламутр имеет остеоиндуктивный потенциал, а также обладает остеокондуктивностью, биосовместимостью и своевременной биодеградиремостью [33]. Стимуляция формирования новой кости наблюдалась при имплантации в верхнечелюстную альвеолярную кость человека, при наполнении несущих участков, дефектов черепа, а также при межпозвоночном сращении. Таким образом, перламутр является перспективным источником с соблюдением необходимых требований к костным наполнителям.

Хотя большинство доступных костных заменителей обладают остеокондуктивными свойствами, ещё ни один из них не сочетает в себе все преимущества собственной кости. Для развития в направлении новых остеоиндуктивных и остеогенных решений, которые смогут безопасно и эффективно конкурировать с существующими стандартами, предложена клеточная терапия. Именно применение стволовых клеток играет одну из основных ролей в восстановлении костной ткани и может служить альтернативой костной пластике [23].

Осознав большую перспективу использования клеточных технологий в травматологии, исследователи старались получить культуры клеток непосредственно из тканей, которые необходимо восстановить.

Для получения первичной культуры остеобластов на начальном этапе использовали периост (надкостницу) или эмбриональные закладки костей, однако полученная популяция дифференцировалась по хондрогенному пути [21]. Культивирование непосредственно костных фрагментов позволило получить небольшое количество остеогенных клеток. И только спустя годы в качестве источника были использованы стромальные клетки костного мозга, преимуществом которых явилась способность адгезироваться к поверхности культуральной посуды. А усовершенствование питательной среды и создание оптимальных условий микроокружения позволило получить достаточный объём дифференцированных клеток из малого количества исходного материала [34].

СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ КАК ИСТОЧНИК РЕГЕНЕРАЦИИ КОСТНОЙ И ХРЯЩЕВОЙ ТКАНИ

Для индуцирования репарации костей, хряща и сухожилий наиболее подходящими клетками в настоящее время считаются МСК костного мозга, поскольку они обладают высоким остеогенным, хондрогенным и теногенным потенциалом [35].

По происхождению стволовые клетки можно разделить на три основные группы: эмбриональные стволовые клетки (ЭСК), отличающиеся отсутствием антигенов тканевой совместимости; взрослые стволовые клетки (также называемые тканеспецифическими стволовыми клетками, ТСК) и индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (ИПСК).

Стромальные клетки костного мозга впервые идентифицированы Александром Яковлевичем Фриденштейном, описавшем адгезивную фибробластоподобную популяцию, способную дифференцироваться в костную ткань, которую он назвал остеогенными клетками-предшественниками [36]. Позднее, благодаря Арнольду Каплану (Arnold Caplan), стромальные стволовые клетки костного мозга стали называть мезенхимальными стволовыми клетками – МСК [37], которые в настоящее время представляют наибольший интерес, так как обладают свойством мультипотентных стволовых клеток, способных дифференцироваться в различные клетки, включая фибробласты, хондробласты, остеобласты, адипоциты, гепатоциты, глиальные клетки и нейроны, а также мигрировать в повреждённый участок [1, 38, 39]. Кроме того, МСК обладают иммуномодулирующим свойством, действуя как иммуносупрессоры, подавляя пролиферацию Т-лимфоцитов и угнетая дифференцировку дендритных клеток, что позволяет достаточно широко использовать их в трансплантологии [40].

В клеточных технологиях существуют определённые этапы, включающие:

- 1) выделение и культивирование первичных культур клеток;
- 2) получение клеточных линий и создание клеточных банков;
- 3) модификацию структуры и функции клеток, цитокиновая и генотерапия;
- 4) практическое применение в медицине, биологии, биоинженерии, био-, нанотехнологии.

Сегодня стволовые клетки получают практически из любой ткани: из кожи, плаценты, периферической и пуповинной крови, жировой и хрящевой ткани, амниотической и синовиальной жидкости, трабекулярной

кости, стенки сосудов, предстательной железы, а также фетальных печени и лёгких [34, 38]. Сама процедура выделения в настоящее время считается рутинной. Однако, несмотря на лёгкость выделения, культивирования и стабильность фенотипа, количество выделяемых клеток и биологические характеристики первичной культуры МСК напрямую зависят от многих параметров, включая источник ткани, метод выделения клеток и питательной среды [41]. Несмотря на то, что источником МСК могут быть различные ткани, чаще всего клетки выделяют из жировой и пуповинной тканей. Именно из этих тканей получают наибольшее количество МСК, а процедура при этом является минимально инвазивной [42].

Начальный этап извлечения МСК из донорской ткани определяет дальнейшую популяцию клеток, которая будет размножаться *in vitro*. Как правило, клетки выделяют с помощью простых процедур, включающих измельчение тканей, ферментирования и рост клеток на пластиковой поверхности [41].

Результат получения МСК зависит от донора материала. Например, клетки, полученные от больных гепатитом В, сначала были похожи на клетки здоровых доноров, но впоследствии наблюдались явные различия в соотношении культур, кривой роста, количестве поколений и изменении внешнего вида после нескольких субкультивирований, свидетельствующее о том, что их труднее культивировать *in vitro*. Растут такие клетки медленно с быстрым процессом старения [43]. В то же время МСК, полученные из костного мозга у женщин с множественной травмой, имели высокую пролиферативную способность, в сравнении с остальными донорами. Это свидетельствует о том, что тяжесть травмы и пол также влияют на резервный и пролиферативный потенциал [44]. А МСК от пожилых доноров демонстрировали снижение максимальной продолжительности жизни клеточной культуры по сравнению с клетками от молодых доноров, о чем свидетельствовало увеличение количества бета-галактозидазных позитивных клеток [45].

Для идентификации МСК используют маркеры клеток, которые подразделяют на негативные и позитивные [41]. Считается, что МСК не экспрессируют гликофорин А (маркер эритроидного происхождения), CD11b (маркер иммунных клеток), CD31 (маркер эндотелиальных и гематопозитических клеток), CD34 (маркер гемопоэтических стволовых клеток), CD117 (маркер гемопоэтических стволовых/прогениторных клеток) и CD45 (маркер всех гемопоэтических стволовых клеток). CD11b, CD14, CD19, CD31, CD45, CD79a и CD117 определённо являются негативными маркерами как человеческих, так и мышиных МСК, в то время как CD34, являясь негативным маркером для человеческих МСК, всегда экспрессируется на мышиных.

К позитивным маркерам относятся Stro-1 (маркер мезенхимальных стволовых клеток), CD10 (маркер пре-В-лимфоцитов или маркер острого лимфобластного лейкоза), CD13 (панмиелоидный маркер), CD29, CD44 и CD73 (маркеры мезенхимальных стволовых клеток), CD90/Thy-1 (маркер стволовых и опухолевых клеток), CD105 или эндоглин и CD106 (VCAM-1) (маркеры активированного эндотелия), CD271/NGFR (специфический маркер мезенхимальных стволовых клеток костного мозга человека), CD309 (маркер ангиогенеза), Sca-1 (маркер гемопоэтических стволовых клеток). Самым изученным

и распространённым среди данных маркеров считается Stro-1 с молекулярной массой 75 кДа, экспрессию которого можно наблюдать и в эндотелии [1, 46, 47]. Несмотря на то, что в процессе культивирования клеток его экспрессия снижается, Stro-1 является истинным позитивным маркером мезенхимальных стволовых клеток [48].

После получения первичной культуры клетки следует содержать в среде Игла, модифицированной Dulbecco (DMEM). При этом необходимо следить за длительностью культивирования и количеством пассажей, так как это обратно коррелирует с дифференцирующим потенциалом клеток. В условиях длительного культивирования (~10 пассажей) средняя численность популяции удваивается, а средняя длина теломера уменьшается, дифференцировочный потенциал при этом снижается уже после 6-го пассажа, развивается апоптоз, а в некоторых случаях возникает спонтанная трансформация МСК по онкогенному типу [1, 49].

Непосредственное применение МСК имело большой успех при исследовании дегенерации межпозвоночных дисков. Сам процесс дегенерации связан с уменьшением числа клеток и изменением фенотипа клеток диска. По мере прогрессирования дегенерации отмечается изменение объёма и формы диска, а также перегрузка соседних структур [50]. Для восстановления утраченных клеток, внеклеточного матрикса, а также для увеличения содержания протеогликанов МСК вводят непосредственно в диск. Далее МСК реплицируются и дифференцируются в сторону клеток центрального студенистого пульпозного ядра, стимулируют эндогенные клетки к пролиферации, способствуя тем самым восстановлению межпозвоночного диска. Применение МСК демонстрирует более стойкое и последовательное качество регенеративного эффекта.

Для успешной дифференцировки особое значение имеет питательная среда и наличие в ней растворённых веществ. Например, для остеогенной дифференцировки в питательную среду, дополненную 20%-ной фетальной бычьей сывороткой (FBS), необходимо добавить дексаметазон, В-глицерофосфат, фосфат витамина С и культивировать МСК в монослойной среде 2–3 недели. Затем клетки приобретают костную морфологию, повышается активность щелочной фосфатазы (ЩФ) с накоплением кальция во внеклеточном матриксе. При добавлении в питательную среду основного фактора роста фибробластов (fibroblast growth factor basic, FGFb) повышаются остеогенный и адипогенный потенциалы, в то время как способность к нейрогенной трансформации снижается.

ТЕХНИКА КУЛЬТИВИРОВАНИЯ В КЛЕТОЧНОЙ ИНЖЕНЕРИИ

На клеточный потенциал также влияет техника культивирования. Так, при наиболее распространённом и экономичном однослойном культивировании остеогенный потенциал снижается, о чем свидетельствует понижение как активности ЩФ, так и содержание остеокальцина. В то же время при однослойном культивировании невозможно создать микроокружение для клетки, идентичное условиям *in vivo*. При однослойном культивировании хондроциты быстро становятся фибробластоподобными клетками со сниженной способностью продуцировать протеогликаны, изменяется структура синтезируемого коллагена (вместо коллагена II типа синтезируется

коллаген I типа) [34]. При этом контролировать форму, размер и расположение привитых клеток практически невозможно [51, 52].

Наряду с однослойным существует также культивирование в биореакторах: перфузионных, цилиндрических и ротационных. В биореакторах микроокружение имитирует условия *in vivo*, происходит микрогравитация, периодическое поступление (обновление) питательной среды в клеточной культуре и удаление продуктов метаболизма [53]. В биореакторах клетки способны расти и пролиферировать на микро- и макроносителях, а также в суспензиях.

В тканевой инженерии альтернативным считается метод так называемого «клеточного листа», заключающийся в культивировании клеток до тех пор, пока они не сформируют обширные межклеточные взаимодействия и не выработают собственный внеклеточный матрикс, с помощью которого они приобретут форму клеточного листа. При этом «клеточный лист» с культуральной посуды снимают при пониженной температуре (20 °C) и накладывают один лист на другой для реконструкции гомогенной и гетерогенной 3D-тканей. Однако при этом методе возможно появление некроза внутри листа из-за отсутствия васкуляризации, и этой проблеме в настоящее время уделяется большое внимание.

Несмотря на это, благодаря данному методу проведены успешные работы на миокарде и кровеносных сосудах, сетчатке и роговице глаза, пищеводе, а также костях, сухожилиях и хряще [54, 55, 56]. Методом клеточного листа культивированы кератиноциты, пигментные эпителиальные клетки, уротелиальные клетки, клетки периодонтальной связки, эндотелиальные клетки аорты [57], кардиомиоциты [58] и эпителиальные клетки почек [59].

Проводились исследования по остеогенной дифференцировке МСК с дальнейшей трансплантацией экспериментальным животным. Полученные клеточные листы сворачивали, формируя трубчатую структуру, и помещали подкожно в область бедра. Через 6 недель после трансплантации листа исследователи выявили эктопическую кальцификацию бедренной кости, а дальнейшее гистологическое исследование подтвердило костеобразование [1]. Таким образом, пришли к выводу, что МСК можно культивировать как листовые структуры, и полученные листы представляют собой остеогенные имплантаты, которые могут быть использованы для реконструкции твёрдых тканей.

КЛЕТОЧНЫЕ ТЕХНОЛОГИИ В РЕГЕНЕРАЦИИ ХРЯЩЕВОЙ ТКАНИ

Наряду с инженерией костей активно развивается и инженерия хрящей, дефект которых, как правило, возникает при травме, дегенеративных расстройствах и повреждении субхондральной кости, что в свою очередь приводит к серьёзным осложнениям. Во-первых, развивается остеоартроз, которым страдает до 25 % населения, а лечение терапевтическими и хирургическими способами только облегчает симптомы. А во-вторых, повреждение приводит к катаболическому разрушению суставного хряща, деструкция которого поражает преимущественно суставную поверхность, в результате чего пациент нуждается в протезировании сустава [60].

Дефект хряща по толщине может быть частичным или полным. Повреждение лишь поверхностного гиалинового хряща, снижающего трение, способно восстановиться из-за синтеза собственных клеток. Проблема частичного повреждения заключается в сложности лечения, так как эта зона плохо васкуляризована, не проникает в субхондральную кость и не имеет доступа к клеткам-предшественникам [61].

Современные методы лечения направлены на восстановление хрящевых дефектов путём первичной репарации, включающей жёсткую фиксацию, стимуляцию прилегающих тканей и имплантацию трансплантата. Микротрещины и субхондральное сверление нарушают субхондральную кость, позволяя мигрировать стволовым клеткам в место повреждения. При этом дефект заполняется репаративной тканью, а положительный результат может быть получен при соблюдении режима длительной реабилитации [62]. При этом существенным недостатком также является длительная болезненность донорского участка.

Аллогенная трансплантация позволяет восстановить более крупные дефекты, однако считается сложной из-за необходимости подбора размера донора-реципиента, тестирования на инфекционные заболевания и имплантации в короткие сроки для обеспечения жизнеспособности хондроцитов. При этом хорошие клинические результаты обеспечивают свежие аллотрансплантаты, хранящиеся при температуре 4 °C. Использование замороженных аллотрансплантатов резко ухудшает результаты [63].

Существуют различные методы имплантации, эффективно заполняющие дефекты суставов, улучшая их функцию. Однако предлагаемые методы требуют, как минимум, двух инвазивных хирургических вмешательств [64]. Восстановить хрящевые дефекты, избегая многократных инвазивных процедур и повреждения хряща донора, потенциально может клеточная стратегия с использованием стволовых клеток.

Стратегии получения клеток хряща различны, но в целом содержат ряд общих черт. Хрящ отделяют от субхондральной кости, промывают, измельчают и ферментируют в коллагеназе (12–16 часов). Для получения МСК материал необходимо центрифугировать с трансформирующим фактором роста β (transforming growth factor, TGF) [65]. Затем осадок промывают и перемещают в культуральную посуду с плотностью клеток 20 000 клеток/см² (высокая плотность снижает клеточную пролиферацию, сохраняя фенотип в кратковременных культурах). Культивировать полученную массу клеток необходимо в бессывороточной среде с добавлением дексаметазона, фосфата витамина C, TGF- β и пролина [34, 60, 66]. Примерно через 10 дней культивирования клетки формируют монослой, прикрепляясь к культуральному пластику, и активно пролиферируют. Несмотря на положительный результат, через несколько пассажей происходит изменение генотипа и хондрогенного фенотипа, характеризующееся потерей округлой формы, снижением синтеза внеклеточного матрикса, повышением экспрессии фибробластических генов. Данные изменения могут быть обратимыми. Лишь добавление ростовых факторов (PDGF-BB (тромбоцитарного фактора роста BB), TGF β 1, FGF β) увеличивает скорость клеточной пролиферации, восстанавливая фенотип в хондрогенной культуре [67].

Также хондрогенной дифференцировке способствует циклоастраниол – тритерпеноидное сапониновое соединение и продукт гидролиза основного ингредиента мембранного астрагала. При этом улучшаются конденсация и пролиферация клеток, наблюдается более высокое содержание гликозаминогликанов. Стабильный активный фенотип хондроцитов поддерживался *in vitro* в течение 28 дней [68].

Для стимуляции оптимальной хондрогенной дифференцировки МСК созданы двуслойные клеточные пластинки, состоящие из сферической популяции МСК человека, заключённой в слой ювенильных хондроцитов. В ходе эксперимента выяснилось, что и ювенильные хондроциты продуцируют больше протеогликанов, чем МСК человека, обработанные TGF β , а также демонстрировали более высокую экспрессию хондрогенных генов Sox9, протеогликанового хондроитинсульфата 1 – агрекана и коллагена 2A1, а также более низкую экспрессию гипертрофических генов матриксной металлопротеиназы-13, ключевого транскрипционного фактора, связанного с дифференцировкой остеобластов – Runx2, коллагена 1A1 и коллагена 10A1 [69].

Гистологические анализы показывали, что ювенильные хондробласты способствуют хондрогенной дифференцировке клеток в двуслойные клеточные пластинки без гипертрофии. Кроме того, при культивировании в гипоксических и воспалительных условиях они вырабатывали значительно больше протеогликанов, чем ювенильные хондробласты или МСК.

Однако применение МСК при восстановлении суставного хряща имеет и некоторые недостатки. Так, МСК-производные хондроцитов экспрессируют гены, связанные с гипертрофией, что приводит к гибели клеток или кальцификации с последующей васкуляризацией при имплантации данных клеток подкожно или внутримышечно [61].

Клинические исследования по применению МСК для восстановления хрящевой ткани продолжаются. До сих пор остаётся неизвестным, заполняют ли трансплантированные МСК непосредственно очаг поражения и регенерируют дефектный суставной хрящ или же они косвенно стимулируют секрецию биоактивных факторов, таких как цитокины и факторы роста. Поэтому, хотя во многих исследованиях были получены многообещающие результаты о потенциале МСК в регенерации хрящевых тканей, необходимы дополнительные исследования.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Тканевая инженерия по своей сути является уникальной наукой, она объединяет клетки костного мозга или мезенхимальные стволовые клетки, синтетические каркасы и молекулярные сигналы для формирования гибридных конструкций. В классическом подходе тканевая инженерия состоит из сбора ткани у пациента, выделения МСК путём присоединения культуры ткани к пластику культуральной посуды, пролиферации и дифференцировки данных клеток в культуре до достаточного количества, а затем имплантации тому же пациенту [23]. Преимуществом использования МСК является то, что клетки могут быть выделены из большого количества взрослых тканей, они активно пролиферируют без потери их многолинейной дифференцировочной способности, включая остеогенный и хондрогенный дифференцировочный потенциал. Клинические исследования по примене-

нию МСК для регенерации костной и хрящевой тканей проводятся до сих пор. Несмотря на многообещающие результаты многочисленных работ в регенеративной медицине, необходимы дополнительные исследования для установления соответствующих условий и методов применения МСК у человека.

ЛИТЕРАТУРА

1. Yorukoglu AC, Kiter AE, Akkaya S, Satiroglu-Tufan NL, Tufan AC. A concise review on the use of mesenchymal stem cells in cell sheet-based tissue engineering with special emphasis on bone tissue regeneration. *Stem Cells Int.* 2017; 2017: 2374161. doi: 10.1155/2017/2374161
2. Bhardwaj N, Chouhan D, Mandal BB. Tissue engineered skin and wound healing: Current strategies and future directions. *Curr Pharm Des.* 2017; 23(24): 3455-3482. doi: 10.2174/1381612823666170526094606
3. Tarassoli SP, Jessop ZM, Al-Sabah A, Gao N, Whitaker S, Doak S, Whitaker IS. Skin tissue engineering using 3D bioprinting: An evolving research field. *Plast Reconstr Aesthet Surg.* 2018; 71(5): 615-623. doi: 10.1016/j.bjps.2017.12.006
4. Modugno FD, Colosi C, Trono P, Antonacci G, Ruocco G, Nisticò P. 3D models in the new era of immune oncology: focus on T cells, CAF and ECM. *J Exp Clin Cancer Res.* 2019; 38(1): 117. doi: 10.1186/s13046-019-1086-2
5. Schmidt SK, Schmid R, Arkudas A, Kengelbach-Weigand A, Bosserhoff AK. Tumor cells develop defined cellular phenotypes after 3D-bioprinting in different bioinks. *Cells.* 2019; 8(10): 1295. doi: 10.3390/cells8101295
6. Sun Q, Barz M, De Geest BG, Diken M, Hennink WE, Kiessling F, Lammers T, Shi Y. Nanomedicine and macroscale materials in immuno-oncology. *Chem Soc Rev.* 2019; 48(1): 351-381. doi: 10.1039/c8cs00473k
7. Shevchenko IL. Cellular technologies in cardiology. *Vestn Ross Akad Med Nauk.* 2003; 11: 6-10.
8. Duran AG, Reidell O, Stachelscheid H, Klose K, Gossen M, Falk V, Röhl W, Stamm C. Regenerative medicine/cardiac cell therapy: Pluripotent stem cells. *Thorac Cardiovasc Surg.* 2018; 66(1): 53-62. doi: 10.1055/s-0037-1608761
9. Goradel NH, Ghiyami-Hour F, Negahdari B, Malekshahi ZV, Hashemzahi M, Masoudifar A, Mirzaei H. Stem cell therapy: A new therapeutic option for cardiovascular diseases. *J Cell Biochem.* 2018; 119(1): 95-104. doi: 10.1002/jcb.26169
10. Taoufik E, Kouroupi G, Zygogianni O, Matsas R. Synaptic dysfunction in neurodegenerative and neurodevelopmental diseases: an overview of induced pluripotent stem-cell-based disease models. *Open Biol.* 2018; 8(9): 180138. doi: 10.1098/rsob.180138
11. Nuñez J, Vignoletti F, Caffesse RG, Sanz M. Cellular therapy in periodontal regeneration. *Periodontol 2000.* 2019; 79(1): 107-116. doi: 10.1111/prd.12250
12. Shan LH, An XY, Xu MM, Fan SP, Zhong H, Ni P, Chi H. Analysis on the trend of innovation and development in the field of ophthalmology. *Zhonghua Yan Ke Za Zhi.* 2018; 54(6): 452-463. doi: 10.3760/cma.j.issn.0412-4081.2018.06.012
13. Millman JR, Pagliuca FW. Autologous pluripotent stem cell-derived β -like cells for diabetes cellular therapy. *Diabetes.* 2017; 66(5): 1111-1120. doi: 10.2337/db16-1406
14. Arber C, Lovejoy C, Wray S. Stem cell models of Alzheimer's disease: Progress and challenges. *Alzheimers Res Ther.* 2017; 9(1): 42. doi: 10.1186/s13195-017-0268-4
15. Акопян А.С., Белоусов Д.Ю., Рысулы М.Р., Куликов А.В. Некоторые актуальные проблемы клинических исследований стволовых клеток. *Качественная клиническая практика.* 2010; (1): 22-28.
16. Miguel-Berriain I. The ethics of stem cells revisited. *Adv Drug Deliv Rev.* 2015; 82-83: 176-80. doi: 10.1016/j.addr.2014.11.011
17. Lavazza A, Massimini M. Cerebral organoids: ethical issues and consciousness assessment. *J Med Ethics.* 2018; 44(9): 606-610. doi: 10.1136/medethics-2017-104555

18. Petrini C. Bioethics of clinical applications of stem cells. *Int J Mol Sci*. 2017; 18(4): 814. doi: 10.3390/ijms18040814
19. Zheng YL. Some ethical concerns about human induced pluripotent stem cells. *Sci Eng Ethics*. 2016; 22(5): 1277-1284. doi: 10.1007/s11948-015-9693-6
20. Aulisio MP. Double effect, principle or doctrine of. In: Jennings B. (editor) *Bioethics*. Gale: Farmington Hills, MI, USA. 2014; 2: 889-894.
21. Деев Р.В., Исаев А.А., Кочиш А.Ю., Тихилов Р.М. Клеточные технологии в травматологии и ортопедии: пути развития. *Клеточная трансплантология и тканевая инженерия*. 2007; 2(4): 18-30.
22. Mills LA, Aitken SA, Simpson RWAH. The risk of non-union per fracture: Current myths and revised figures from a population of over 4 million adults. *Acta Orthop*. 2017; 88(4): 434-439. doi: 10.1080/17453674.2017.1321351
23. Gómez-Barrena E, Rosset P, Lozano D, Stanovici J, Ermtthaller C, Gerbhard F. Bone fracture healing: Cell therapy in delayed unions and nonunions. *Bone*. 2015; 70: 93-101. doi: 10.1016/j.bone.2014.07.033
24. Fernández-Hernández O. Terapias para el hueso: Sustitutos óseos. *Mon Act Soc Esp Med Cir Pie Tobillo*. 2017; 9: 45-53.
25. Kemper N, Davison N, Fitzpatrick D, Marshall R, Lin A, Mundy K, Cobb RR. Characterization of the mechanical properties of bovine cortical bone treated with a novel tissue sterilization process. *Cell Tissue Bank*. 2011; 12(4): 273-279. doi: 10.1007/s10561-010-9191-7
26. Mayer Y, Ginesin O, Khutaba A, Machtei EE, Giladi HZ. Biocompatibility and osteoconductivity of PLCL coated and non-coated xenografts: An in vitro and preclinical trial. *Clin Implant Dent Relat Res*. 2018; 20(3): 294-299. doi: 10.1111/cid.12596
27. Qiao W, Liu R, Li Z, Luo X, Huang B, Liu Q, Chen Z, Tsoi JKH, Su Y-X, Cheung KMC, Matinlinna JP, Yeung KWK, Chen Z. Contribution of the in situ release of endogenous cations from xenograft bone driven by fluoride incorporation toward enhanced bone regeneration. *Biomater Sci*. 2018; 6(11): 2951-2964. doi: 10.1039/c8bm00910d
28. Arpağ OF, Damlar I, Altan A, Tatli U, Günay A. To what extent does hyaluronic acid affect healing of xenografts? A histomorphometric study in a rabbit model. *J Appl Oral Sci*. 2018; 26: 20170004. doi: 10.1590/1678-7757-2017-0004
29. Laurencin C, Khan Y, El-Amin SF. Bone graft substitutes (Review). *Expert Review of Medical Devices*. 2006; 3(1): 49-57. doi: 10.1586/17434440.3.1.49.
30. Ma D, Ren L, Liu Y, Chen F, Zhang J, Xue Z, Mao T. Engineering scaffold-free bone tissue using bone marrow stromal cell sheets. *J Orthop Res*. 2010; 28(5): 697-702. doi: 10.1002/jor.21012
31. Diaz-Rodriguez P, López-Álvarez M, Serra J, González P, Landín M. Current stage of marine ceramic grafts for 3D bone tissue regeneration. *Mar Drugs*. 2019; 17(8): 471. doi: 10.3390/md17080471
32. Fu K, Xu Q, Czernuszka J, Triffitt JT, Xia Z. Characterization of a biodegradable coralline hydroxyapatite/calcium carbonate composite and its clinical implementation. *Biomater*. 2013; 34(6): 065007. doi: 10.1088/1748-6041/8/6/065007
33. Zhang G, Brion A, Willemin A-S, Piet M-H, Moby V, Bianchi A, Mainard D, Galois L, Gillet P, Rousseau M. Nacre, a natural, multi-use, and timely biomaterial for bone graft substitution. *J Biomed Mater Res A*. 2017; 105(2): 662-671. doi: 10.1002/jbm.a.35939
34. Шаманская Т.В., Осипова Е.Ю., Румянцев С.А. Технологии культивирования мезенхимальных стволовых клеток ex vivo для клинического использования. *Онкогематология*. 2009; 3: 69-76.
35. Koga H, Engebretsen L, Brinchmann JE, Muneta T, Sekiya I. Mesenchymal stem cell-based therapy for cartilage repair: A review. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*. 2009; 17(11): 1289-1297. doi: 10.1007/s00167-009-0782-4
36. Friedenstein AJ, Gorskaja JF, Kulagina NN. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Exp Hematol*. 1976; 4: 267-274.
37. Caplan AL. Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res*. 1991; 9: 641-650.
38. Лупатов А.Ю., Вдовин А.С., Вахрушев И.В., Полтавцева Р.А., Ярыгин К.Н. Сравнительный анализ экспрессии поверхностных маркеров на фибробластах и фибробластоподобных клетках, выделенных из различных тканей человека. *Клеточные технологии в биологии и медицине*. 2014; 4: 221-228.
39. Shurygin MG, Shurygina IA, Dremina NN, Kanya OV. Endogenous progenitors as the source of cell material for ischemic damage repair in experimental myocardial infarction under conditions of changed concentration of vascular endothelial growth factor. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2015; 158(4): 528-531.
40. Nauta AJ, Fibbe WE. Immunomodulatory properties of mesenchymal stromal cells. *Blood*. 2007; 110(10): 3499-3506. doi: 10.1182/blood-2007-02-069716
41. Mushahary D, Spittler A, Kasper C, Weber V, Charwat V. Isolation, cultivation, and characterization of human mesenchymal stem cells. *Cytometry A*. 2018; 93(1): 19-31. doi: 10.1002/cyto.a.23242
42. Kolaparthi LK, Sanivarapu S, Moogla S, Kutcham RS. Adipose tissue-adequate, accessible regenerative material. *Int J Stem Cells*. 2015; 8: 121-127.
43. Peng L, Li H, Gu L, Peng X-M, Huang Y-S, Gao Z-L. Comparison of biological characteristics of marrow mesenchymal stem cells in hepatitis B patients and normal adults. *World J Gastroenterol*. 2007; 13(11): 1743-1746. doi: 10.3748/wjg.v13.i11.1743
44. Seebach C, Henrich D, Tewksbury R, Wilhelm K, Marzi I. Number and proliferative capacity of human mesenchymal stem cells are modulated positively in multiple trauma patients and negatively in atrophic nonunions. *Calcif Tissue Int*. 2007; 80(4): 294-300. doi: 10.1007/s00223-007-9020-6
45. Stenderup K, Justesen J, Clausen C, Kassem M. Aging is associated with decreased maximal life span and accelerated senescence of bone marrow stromal cells. *Bone*. 2003; 33(6): 919-926. doi: 10.1016/j.bone.2003.07.005
46. Gronthos S, Zannettino AC, Hay SJ, Shi S, Graves SE, Kortesisid A, Simmons PJ. Molecular and cellular characterisation of highly purified stromal stem cells derived from human bone marrow. *J Cell Sci*. 2003; 116(9): 1827-1835. doi: 10.1242/jcs.00369
47. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop D, Horwitz E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells: the International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006; 8(4): 315-317. doi: 10.1080/14653240600855905
48. Ning H, Lin G, Lue TF, Lin C-S. Mesenchymal stem cell marker Stro-1 is a 75kd endothelial antigen. *Biochem Biophys Res Commun*. 2011; 413(2): 353-357. doi: 10.1016/j.bbrc.2011.08.104
49. Nakamura A, Akahane M, Shigematsu H, Tadokoro M, Morita Y, Ohgushi H, Dohi Y, Imamura T. Cell sheet transplantation of cultured mesenchymal stem cells enhances bone formation in a rat nonunion model. *Bone*. 2010; 46(2): 418-424. doi: 10.1016/j.bone.2009.08.048
50. Yim RL-H, Lee JT-Y, Bow CH, Meij B, Leung V, Cheung KMC, Vavken P, Samartzis D. A systematic review of the safety and efficacy of mesenchymal stem cells for disc degeneration: Insights and future directions for regenerative therapeutics. *Stem Cells Dev*. 2014; 23(21): 2553-2567. doi: 10.1089/scd.2014.0203
51. Shimizu T, Yamato M, Kikuchi A, Okano T. Cell sheet engineering for myocardial tissue reconstruction. *Biomaterials*. 2003; 24(13): 2309-2316. doi: 10.1016/s0142-9612(03)00110-8
52. Owaki T, Shimizu T, Yamato M, Okano T. Cell sheet engineering for regenerative medicine: Current challenges and strategies. *Biotechnol J*. 2014; 9(7): 904-914. doi: 10.1002/biot.201300432
53. Радева И.Ф., Думченко Н.Б., Нечаева Е.А. Культивирование клеток на микроносителях в биореакторах. *Вестник ПНИПУ. Химическая технология и биотехнология*. 2019; 2: 22-32. doi: 10-15593/2224-9400/2019.2.02
54. Kwon OH, Kikuchi A, Yamato M, Sakurai Y, Okano T. Rapid cell sheet detachment from poly(N-isopropylacrylamide)-

grafted porous cell culture membranes. *J Biomed Mater Res*. 2000; 50(1): 82-89. doi: 10.1002/(sici)1097-4636(200004)50:1<82::aid-jbm12>3.0.co;2-7

55. Calve S, Dennis RG, Kosnik PE, Baar K, Grosh K, Arruda EM. Engineering of functional tendon. *Tissue Eng*. 2004; 10(5-6): 755-761. doi: 10.1089/1076327041348464

56. Murdoch AD, Grady LM, Ablett MP, Katopodi T, Meadows RS, Hardingham TE. Chondrogenic differentiation of human bone marrow stem cells in transwell cultures: generation of scaffold-free cartilage. *Stem Cells*. 2007; 25(11): 2786-2796. doi: 10.1634/stemcells.2007-0374

57. Sakaguchi K, Shimizu T, Okano T. Construction of three-dimensional vascularized cardiac tissue with cell sheet engineering. *J Control Release*. 2015; 205: 83-88. doi: 10.1016/j.jconrel.2014.12.016

58. L'Heureux N, McAllister TN, de la Fuente LM. Tissue-engineered blood vessel for adult arterial revascularization. *N Engl J Med*. 2007; 357(14): 1451-1453. doi: 10.1056/NEJMc071536

59. Masuda S, Shimizu T, Yamato M, Okano T. Cell sheet engineering for heart tissue repair. *Adv Drug Deliv Rev*. 2008; 60(2): 277-285. doi: 10.1016/j.addr.2007.08.031

60. Bornes TD, Adesida AB, Jomha NM. Mesenchymal stem cells in the treatment of traumatic articular cartilage defects: a comprehensive review. *Arthritis Res Ther*. 2014; 16(5): 432. doi: 10.1186/s13075-014-0432-1

61. Lubis AMT, Lubis VK. Adult bone marrow stem cells in cartilage therapy. *Acta Medica Indonesiana*. 2012; 44(1): 62-68.

62. Gudas R, Gudaite A, Pocius A, Gudiene A, Cekanauskas E, Monastyreckiene E, Basevicius A. Ten-year follow-up of a prospective, randomized clinical study of mosaic osteochondral autologous transplantation versus microfracture for the treatment of osteochondral defects in the knee joint of athletes. *Am J Sports Med*. 2012; 40(11): 2499-508. doi: 10.1177/0363546512458763

63. Levy YD, Görtz S, Pulido PA, McCauley JC, Bugbee WD. Do fresh osteochondral allografts successfully treat femoral condyle lesions? *Clin Orthop Relat Res*. 2013; 471(1): 231-237. doi: 10.1007/s11999-012-2556-4

64. Kon E, Filardo G, Berruto M, Benazzo F, Zanon G, Villa SD, 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(12): 2549-2557. doi: 10.1177/0363546511420688

65. Chavez RD, Serra R. Scaffoldless tissue-engineered cartilage for studying transforming growth factor beta-mediated cartilage formation. *Biotechnol Prog*. 2020; 36(1): 2897. doi: 10.1002/btpr.2897

66. Johnstone B, Hering TM, Caplan AI, Goldberg VM, Yoo JU. In vitro chondrogenesis of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells. *Exp Cell Res*. 1998; 238: 265-272. doi: 10.1006/excr.1997.3858

67. Tew SR, Murdoch AD, Rauchenberg RP, Hardingham TE. Cellular methods in cartilage research: Primary human chondrocytes in culture and chondrogenesis in human bone marrow stem cells. *Methods*. 2008; 45(1): 2-9. doi: 10.1016/j.ymeth.2008.01.006

68. Szychlinska MA, Calabrese G, Ravalli S, Parrinello NL, Forte S, Castrogiovanni P, Pricoco E, Imbesi R, Castorina S, Leonardi R, Rosa MD, Musumeci G. Cycloastragenol as an exogenous enhancer of chondrogenic differentiation of human adipose-derived mesenchymal stem cells. A morphological study. *Cells*. 2020; 9(2): 347. doi: 10.3390/cells9020347

69. Cooke ME, Allon AA, Cheng T, Kuo AC, Kim HT, Vail TP, Marcucio RS, Schneider RA, Lotz JC, Alliston T. Structured three-dimensional co-culture of mesenchymal stem cells with chondrocytes promotes chondrogenic differentiation without hypertrophy. *Osteoarthritis Cartilage*. 2011; 19(10): 1210-1218. doi: 10.1016/j.joca.2011.07.005

REFERENCES

1. Yorukoglu AC, Kiter AE, Akkaya S, Satiroglu-Tufan NL, Tufan AC. A concise review on the use of mesenchymal stem cells

in cell sheet-based tissue engineering with special emphasis on bone tissue regeneration. *Stem Cells Int*. 2017; 2017: 2374161. doi: 10.1155/2017/2374161

2. Bhardwaj N, Chouhan D, Mandal BB. Tissue engineered skin and wound healing: Current strategies and future directions. *Curr Pharm Des*. 2017; 23(24): 3455-3482. doi: 10.2174/1381612823666170526094606

3. Tarassoli SP, Jessop ZM, Al-Sabah A, Gao N, Whitaker S, Doak S, Whitaker IS. Skin tissue engineering using 3D bioprinting: An evolving research field. *Plast Reconstr Aesthet Surg*. 2018; 71(5): 615-623. doi: 10.1016/j.bjps.2017.12.006

4. Modugno FD, Colosi C, Trono P, Antonacci G, Ruocco G, Nisticò P. 3D models in the new era of immune oncology: focus on T cells, CAF and ECM. *J Exp Clin Cancer Res*. 2019; 38(1): 117. doi: 10.1186/s13046-019-1086-2

5. Schmidt SK, Schmid R, Arkudas A, Kengelbach-Weigand A, Bosserhoff AK. Tumor cells develop defined cellular phenotypes after 3D-bioprinting in different bioinks. *Cells*. 2019; 8(10): 1295. doi: 10.3390/cells8101295

6. Sun Q, Barz M, De Geest BG, Diken M, Hennink WE, Kiessling F, Lammers T, Shi Y. Nanomedicine and macroscale materials in immuno-oncology. *Chem Soc Rev*. 2019; 48(1): 351-381. doi: 10.1039/c8cs00473k

7. Shevchenko IL. Cellular technologies in cardiology. *Vestn Ross Akad Med Nauk*. 2003; 11: 6-10.

8. Duran AG, Reidell O, Stachelscheid H, Klose K, Gossen M, Falk V, Röhl W, Stamm C. Regenerative medicine/cardiac cell therapy: Pluripotent stem cells. *Thorac Cardiovasc Surg*. 2018; 66(1): 53-62. doi: 10.1055/s-0037-1608761

9. Goradel NH, Ghiyami-Hour F, Negahdari B, Malekshahi ZV, Hashemzahi M, Masoudifar A, Mirzaei H. Stem cell therapy: A new therapeutic option for cardiovascular diseases. *J Cell Biochem*. 2018; 119(1): 95-104. doi: 10.1002/jcb.26169

10. Taoufik E, Kouroupi G, Zygogianni O, Matsas R. Synaptic dysfunction in neurodegenerative and neurodevelopmental diseases: an overview of induced pluripotent stem-cell-based disease models. *Open Biol*. 2018; 8(9): 180138. doi: 10.1098/rsob.180138

11. Nuñez J, Vignoletti F, Caffesse RG, Sanz M. Cellular therapy in periodontal regeneration. *Periodontol 2000*. 2019; 79(1): 107-116. doi: 10.1111/prd.12250

12. Shan LH, An XY, Xu MM, Fan SP, Zhong H, Ni P, Chi H. Analysis on the trend of innovation and development in the field of ophthalmology. *Zhonghua Yan Ke Za Zhi*. 2018; 54(6): 452-463. doi: 10.3760/cma.j.issn.0412-4081.2018.06.012

13. Millman JR, Pagliuca FW. Autologous pluripotent stem cell-derived β -like cells for diabetes cellular therapy. *Diabetes*. 2017; 66(5): 1111-1120. doi: 10.2337/db16-1406

14. Arber C, Lovejoy C, Wray S. Stem cell models of Alzheimer's disease: Progress and challenges. *Alzheimers Res Ther*. 2017; 9(1): 42. doi: 10.1186/s13195-017-0268-4

15. Akopyan AS, Belousov DYU, Rysuly MR, Kulikov AV. Some current problems of stem cell clinical research. *Kachestvennaya klinicheskaya praktika*. 2010; (1): 22-28. (In Russ.)

16. Miguel-Beriaín I. The ethics of stem cells revisited. *Adv Drug Deliv Rev*. 2015; 82-83: 176-80. doi: 10.1016/j.addr.2014.11.011

17. Lavazza A, Massimini M. Cerebral organoids: ethical issues and consciousness assessment. *J Med Ethics*. 2018; 44(9): 606-610. doi: 10.1136/medethics-2017-104555

18. Petrin C. Bioethics of clinical applications of stem cells. *Int J Mol Sci*. 2017; 18(4): 814. doi: 10.3390/ijms18040814

19. Zheng YL. Some ethical concerns about human induced pluripotent stem cells. *Sci Eng Ethics*. 2016; 22(5): 1277-1284. doi: 10.1007/s11948-015-9693-6

20. Aulisio MP. Double effect, principle or doctrine of. In: Jennings B. (editor) *Bioethics*. Gale: Farmington Hills, MI, USA. 2014; 2: 889-894.

21. Deev RV, Isaev AA, Kochish AY, Tikhilov RM. Cellular technologies in traumatology and orthopedics: ways of development. *Kletochnaya transplantologiya i tkanevaya inzheneriya*. 2007; 2(4): 18-30. (In Russ.)

22. Mills LA, Aitken SA, Simpson RWAH. The risk of non-union per fracture: Current myths and revised figures from a population of over 4 million adults. *Acta Orthop*. 2017; 88(4): 434-439. doi: 10.1080/17453674.2017.1321351
23. Gómez-Barrena E, Rosset P, Lozano D, Stanovici J, Ernthaller C, Gerbhard F. Bone fracture healing: Cell therapy in delayed unions and nonunions. *Bone*. 2015; 70: 93-101. doi: 10.1016/j.bone.2014.07.033
24. Fernández-Hernández O. Terapias para el hueso: Sustitutos óseos. *Mon Act Soc Esp Med Cir Pie Tobillo*. 2017; 9: 45-53.
25. Kemper N, Davison N, Fitzpatrick D, Marshall R, Lin A, Mundy K, Cobb RR. Characterization of the mechanical properties of bovine cortical bone treated with a novel tissue sterilization process. *Cell Tissue Bank*. 2011; 12(4): 273-279. doi: 10.1007/s10561-010-9191-7
26. Mayer Y, Ginesin O, Khutaba A, Machtei EE, Giladi HZ. Biocompatibility and osteoconductivity of PLCL coated and non-coated xenografts: An in vitro and preclinical trial. *Clin Implant Dent Relat Res*. 2018; 20(3): 294-299. doi: 10.1111/cid.12596
27. Qiao W, Liu R, Li Z, Luo X, Huang B, Liu Q, Chen Z, Tsoi JKH, Su Y-X, Cheung KMC, Matinlinna JP, Yeung KWK, Chen Z. Contribution of the in situ release of endogenous cations from xenograft bone driven by fluoride incorporation toward enhanced bone regeneration. *Biomater Sci*. 2018; 6(11): 2951-2964. doi: 10.1039/c8bm00910d
28. Arpağ OF, Damlar I, Altan A, Tatli U, Günay A. To what extent does hyaluronic acid affect healing of xenografts? A histomorphometric study in a rabbit model. *J Appl Oral Sci*. 2018; 26: 20170004. doi: 10.1590/1678-7757-2017-0004
29. Laurencin C, Khan Y, El-Amin SF. Bone graft substitutes (Review). *Expert Review of Medical Devices*. 2006; 3(1): 49-57. doi: 10.1586/17434440.3.1.49.
30. Ma D, Ren L, Liu Y, Chen F, Zhang J, Xue Z, Mao T. Engineering scaffold-free bone tissue using bone marrow stromal cell sheets. *J Orthop Res*. 2010; 28(5): 697-702. doi: 10.1002/jor.21012
31. Diaz-Rodriguez P, López-Álvarez M, Serra J, González P, Landín M. Current stage of marine ceramic grafts for 3D bone tissue regeneration. *Mar Drugs*. 2019; 17(8): 471. doi: 10.3390/md17080471
32. Fu K, Xu Q, Czernuszka J, Triffitt JT, Xia Z. Characterization of a biodegradable coralline hydroxyapatite/calcium carbonate composite and its clinical implementation. *Biomater*. 2013; 8(6): 065007. doi: 10.1088/1748-6041/8/6/065007
33. Zhang G, Brion A, Willemin A-S, Piet M-H, Moby V, Bianchi A, Mainard D, Galois L, Gillet P, Rousseau M. Nacre, a natural, multi-use, and timely biomaterial for bone graft substitution. *J Biomed Mater Res A*. 2017; 105(2): 662-671. doi: 10.1002/jbm.a.35939
34. Shamanskaya TV, Osipova EYu, Rummyantsev SA. Ex vivo mesenchymal stem cell culture technologies for clinical use. *Onkogematologiya*. 2009; 3: 69-76. (In Russ.)
35. Koga H, Engebretsen L, Brinchmann JE, Muneta T, Sekiya I. Mesenchymal stem cell-based therapy for cartilage repair: A review. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*. 2009; 17(11): 1289-1297. doi: 10.1007/s00167-009-0782-4
36. Friedenstain AJ, Gorskaja JF, Kulagina NN. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Exp Hematol*. 1976; 4: 267-274.
37. Caplan AI. Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res*. 1991; 9: 641-650.
38. Lupatov AYU, Vdovin AS, Vakhrushev IV, Poltavtseva RA, Yarygin KN. Comparative analysis of the expression of surface markers on fibroblasts and fibroblast-like cells isolated from various human tissues. *Kletochnyye tekhnologii v biologii i meditsine*. 2014; 4: 221-228. (In Russ.)
39. Shurygin MG, Shurygina IA, Dremina NN, Kanya OV. Endogenous progenitors as the source of cell material for ischemic damage repair in experimental myocardial infarction under conditions of changed concentration of vascular endothelial growth factor. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2015; 158(4): 528-531.
40. Nauta AJ, Fibbe WE. Immunomodulatory properties of mesenchymal stromal cells. *Blood*. 2007; 110(10): 3499-3506. doi: 10.1182/blood-2007-02-069716
41. Mushahary D, Spittler A, Kasper C, Weber V, Charwat V. Isolation, cultivation, and characterization of human mesenchymal stem cells. *Cytometry A*. 2018; 93(1): 19-31. doi: 10.1002/cyto.a.23242
42. Kolaparthi LK, Sanivarapu S, Moogla S, Kutcham RS. Adipose tissue-adequate, accessible regenerative material. *Int J Stem Cells*. 2015; 8: 121-127.
43. Peng L, Li H, Gu L, Peng X-M, Huang Y-S, Gao Z-L. Comparison of biological characteristics of marrow mesenchymal stem cells in hepatitis B patients and normal adults. *World J Gastroenterol*. 2007; 13(11): 1743-1746. doi: 10.3748/wjg.v13.i11.1743
44. Seebach C, Henrich D, Tewksbury R, Wilhelm K, Marzi I. Number and proliferative capacity of human mesenchymal stem cells are modulated positively in multiple trauma patients and negatively in atrophic nonunions. *Calcif Tissue Int*. 2007; 80(4): 294-300. doi: 10.1007/s00223-007-9020-6
45. Stenderup K, Justesen J, Clausen C, Kassem M. Aging is associated with decreased maximal life span and accelerated senescence of bone marrow stromal cells. *Bone*. 2003; 33(6): 919-926. doi: 10.1016/j.bone.2003.07.005
46. Gronthos S, Zannettino AC, Hay SJ, Shi S, Graves SE, Kortessidis A, Simmons PJ. Molecular and cellular characterisation of highly purified stromal stem cells derived from human bone marrow. *J Cell Sci*. 2003; 116(9): 1827-1835. doi: 10.1242/jcs.00369
47. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop D, Horwitz E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells: the International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006; 8(4): 315-317. doi: 10.1080/14653240600855905
48. Ning H, Lin G, Lue TF, Lin C-S. Mesenchymal stem cell marker Stro-1 is a 75kd endothelial antigen. *Biochem Biophys Res Commun*. 2011; 413(2): 353-357. doi: 10.1016/j.bbrc.2011.08.104
49. Nakamura A, Akahane M, Shigematsu H, Tadokoro M, Morita Y, Ohgushi H, Dohi Y, Imamura T. Cell sheet transplantation of cultured mesenchymal stem cells enhances bone formation in a rat nonunion model. *Bone*. 2010; 46(2): 418-424. doi: 10.1016/j.bone.2009.08.048
50. Yim RL-H, Lee JT-Y, Bow CH, Meij B, Leung V, Cheung KMC, Vavken P, Samartzis D. A systematic review of the safety and efficacy of mesenchymal stem cells for disc degeneration: Insights and future directions for regenerative therapeutics. *Stem Cells Dev*. 2014; 23(21): 2553-2567. doi: 10.1089/scd.2014.0203
51. Shimizu T, Yamato M, Kikuchi A, Okano T. Cell sheet engineering for myocardial tissue reconstruction. *Biomaterials*. 2003; 24(13): 2309-2316. doi: 10.1016/s0142-9612(03)00110-8
52. Owaki T, Shimizu T, Yamato M, Okano T. Cell sheet engineering for regenerative medicine: Current challenges and strategies. *Biotechnol J*. 2014; 9(7): 904-914. doi: 10.1002/biot.201300432
53. Radeeva IF, Dumchenko NB, Nechaeva EA. Cell culture on microcarriers in bioreactors. *Vestnik PNIPU. Khimicheskaya tekhnologiya i biotekhnologiya*. 2019; 2: 22-32. doi: 10-15593/2224-9400/2019.2.02
54. Kwon OH, Kikuchi A, Yamato M, Sakurai Y, Okano T. Rapid cell sheet detachment from poly(N-isopropylacrylamide)-grafted porous cell culture membranes. *J Biomed Mater Res*. 2000; 50(1): 82-89. doi: 10.1002/(sici)1097-4636(200004)50:1<82::aid-jbm12>3.0.co;2-7
55. Calve S, Dennis RG, Kosnik PE, Baar K, Grosh K, Arruda EM. Engineering of functional tendon. *Tissue Eng*. 2004; 10(5-6): 755-761. doi: 10.1089/1076327041348464
56. Murdoch AD, Grady LM, Ablett MP, Katopodi T, Meadows RS, Hardingham TE. Chondrogenic differentiation of human bone marrow stem cells in transwell cultures: generation of scaffold-free cartilage. *Stem Cells*. 2007; 25(11): 2786-2796. doi: 10.1634/stemcells.2007-0374
57. Sakaguchi K, Shimizu T, Okano T. Construction of three-dimensional vascularized cardiac tissue with cell sheet engineering. *J Control Release*. 2015; 205: 83-88. doi: 10.1016/j.jconrel.2014.12.016

58. L'Heureux N, McAllister TN, de la Fuente LM. Tissue-engineered blood vessel for adult arterial revascularization. *N Engl J Med.* 2007; 357(14): 1451-1453. doi: 10.1056/NEJMc071536
59. Masuda S, Shimizu T, Yamato M, Okano T. Cell sheet engineering for heart tissue repair. *Adv Drug Deliv Rev.* 2008; 60(2): 277-285. doi: 10.1016/j.addr.2007.08.031
60. Bornes TD, Adesida AB, Jomha NM. Mesenchymal stem cells in the treatment of traumatic articular cartilage defects: a comprehensive review. *Arthritis Res Ther.* 2014; 16(5): 432. doi: 10.1186/s13075-014-0432-1
61. Lubis AMT, Lubis VK. Adult bone marrow stem cells in cartilage therapy. *Acta Medica Indonesiana.* 2012; 44(1): 62-68.
62. Gudas R, Gudaite A, Pocius A, Gudiene A, Cekanauskas E, Monastyreckiene E, Basevicius A. Ten-year follow-up of a prospective, randomized clinical study of mosaic osteochondral autologous transplantation versus microfracture for the treatment of osteochondral defects in the knee joint of athletes. *Am J Sports Med.* 2012; 40(11): 2499-508. doi: 10.1177/0363546512458763
63. Levy YD, Görtz S, Pulido PA, McCauley JC, Bugbee WD. Do fresh osteochondral allografts successfully treat femoral condyle lesions? *Clin Orthop Relat Res.* 2013; 471(1): 231-237. doi: 10.1007/s11999-012-2556-4
64. Kon E, Filardo G, Berruto M, Benazzo F, Zanon G, Villa SD, 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(12): 2549-2557. doi: 10.1177/0363546511420688
65. Chavez RD, Serra R. Scaffoldless tissue-engineered cartilage for studying transforming growth factor beta-mediated cartilage formation. *Biotechnol Prog.* 2020; 36(1): 2897. doi: 10.1002/btpr.2897
66. Johnstone B, Hering TM, Caplan AI, Goldberg VM, Yoo JU. In vitro chondrogenesis of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells. *Exp Cell Res.* 1998; 238: 265-272. doi: 10.1006/excr.1997.3858
67. Tew SR, Murdoch AD, Rauchenberg RP, Hardingham TE. Cellular methods in cartilage research: Primary human chondrocytes in culture and chondrogenesis in human bone marrow stem cells. *Methods.* 2008; 45(1): 2-9. doi: 10.1016/j.jymeth.2008.01.006
68. Szychlinska MA, Calabrese G, Ravalli S, Parrinello NL, Forte S, Castrogiovanni P, Pricoco E, Imbesi R, Castorina S, Leonardi R, Rosa MD, Musumeci G. Cycloastragenol as an exogenous enhancer of chondrogenic differentiation of human adipose-derived mesenchymal stem cells. A morphological study. *Cells.* 2020; 9(2): 347. doi: 10.3390/cells9020347
69. Cooke ME, Allon AA, Cheng T, Kuo AC, Kim HT, Vail TP, Marcucio RS, Schneider RA, Lotz JC, Alliston T. Structured three-dimensional co-culture of mesenchymal stem cells with chondrocytes promotes chondrogenic differentiation without hypertrophy. *Osteoarthritis Cartilage.* 2011; 19(10): 1210-1218. doi: 10.1016/j.joca.2011.07.005

Сведения об авторах

Дремина Наталья Николаевна – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории клеточных технологий и регенеративной медицины, ФГБНУ «Иркутский научный центр хирургии и травматологии», e-mail: drema76@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-2540-4525>

Трухан Ирина Сергеевна – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории клеточных технологий и регенеративной медицины, ФГБНУ «Иркутский научный центр хирургии и травматологии», e-mail: prede14@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0002-0270-404X>

Шурыгина Ирина Александровна – доктор медицинских наук, профессор РАН, заместитель директора по научной работе, ФГБНУ «Иркутский научный центр хирургии и травматологии», e-mail: irinashurygina@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0003-3980-050X>

Information about the authors

Natalya N. Dremina – Cand. Sc. (Biol.), Senior Research Officer at the Laboratory of Cell Technologies and Regenerative Medicine, Irkutsk Scientific Centre of Surgery and Traumatology, e-mail: drema76@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-2540-4525>

Irina S. Trukhan – Cand. Sc. (Biol.), Senior Research Officer at the Laboratory of Cell Technologies and Regenerative Medicine, Irkutsk Scientific Centre of Surgery and Traumatology, e-mail: prede14@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0002-0270-404X>

Irina A. Shurygina – Dr. Sc. (Med.), Professor of the Russian Academy of Sciences, Deputy Director for Science, Irkutsk Scientific Centre of Surgery and Traumatology, e-mail: irinashurygina@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0003-3980-050X>

Статья получена: 05.11.2020. Статья принята: 11.11.2020. Статья опубликована: 26.12.2020.

Received: 05.11.2020. Accepted: 11.11.2020. Published: 26.12.2020.