

РЕЗУЛЬТАТЫ ПРИМЕНЕНИЯ ЦИТОКИНА TGF β 3 ДЛЯ МОДИФИКАЦИИ КЛЕТОЧНО-ИНЖЕНЕРНОЙ КОНСТРУКЦИИ ПРИ ЗАМЕЩЕНИИ ДЕФЕКТА СУСТАВНОГО ГИАЛИНОВОГО ХРЯЩА В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

Божокин М.С.^{1,2}, Божкова С.А.¹, Нетылько Г.И.¹, Анисимова Л.О.¹, Наконечный Д.Г.¹, Нащекина Ю.А.², Блинова М.И.², Жеребцова Ю.В.², Бенгардт Е.А.³

¹ ФГБУ «НМИЦ ТО им. Р.Р. Вредена» Минздрава России, Санкт-Петербург, e-mail writeback@mail.ru;

² Институт цитологии Российской академии наук, Санкт-Петербург;

³ Российский государственный педагогический университет им. А.И. Герцена, Санкт-Петербург

Восстановление гиалинового слоя суставной поверхности является важной и актуальной задачей медицины, которая полностью не решена до настоящего времени. Одним из перспективных направлений ее решения является трансплантация специализированной клеточно-инженерной конструкции (КИК) из биodeградируемого полимера (скаффолда) и культуры аутологичных клеток. Цель исследования: оценить влияние цитокина Tgf β 3 на экспрессию генов хондрогенеза (*col2a1*, *tgfb3*, *sox9*) и динамику перифокальных реакций при замещении дефекта суставного хряща клеточно-инженерной конструкцией в эксперименте. Методом РВ-ПЦР в эксперименте *in vitro* была выполнена оценка экспрессии генов *col2a1*, *tgfb3*, *sox9* в культуре ММСК при воздействии цитокина Tgf β 3. В эксперименте *in vivo* на 27 половозрелых крысах изучали динамику гистологических изменений на 14-е, 30-е и 90-е сутки после формирования дефекта суставного хряща в 3 группах экспериментальных животных: без замещения дефекта, с трансплантацией клеточно-инженерной конструкции с культурой мезенхимных мультипотентных стромальных клеток (ММСК) без модификации и с модификацией цитокином Tgf β 3. Установлено относительное увеличение экспрессии генов *col2a1*, *Tgfb3*, *sox9* в 800, 20 и 120 раз соответственно под действием цитокина Tgf β 3 на культуру ММСК *in vitro*.

Ключевые слова: ММСК, гиалиновый хрящ, Tgf β 3, клеточно-инженерная конструкция, дефект.

RESULTS OF THE USE TGF β 3 FOR MODIFY CELL ENGINEERING CONSTRUCT RECOVERY THE DEFECT OF THE ARTICULAR HYALINE CARTILAGE

Bozhokin M.S.^{1,2}, Bozhkova S.A.¹, Netylko G.I.¹, Anisimova L.O.¹, Nakonechnyj D.G.¹, Nashchekina Yu.A.², Blinova M.I.², Zerebzova Yu.V.², Bengardt E.A.³

¹ Russian Scientific Research Institute of Traumatology and Orthopedics named after R.R. Vreden, St. Petersburg, e-mail writeback@mail.ru;

² Institute of Cytology, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg;

³ Herzen State Pedagogical University of Russia, St. Petersburg

The recovery of the hyaline cartilage is an important and urgent task of medicine, which has not yet been completely resolved. One of the promising method for it is the transplantation of a specialized cell engineering construct (CEC) with a biodegradable polymer (scaffold) and a culture of autologous cells. Objective: to evaluate the effect of the Tgf β 3 cytokine on the expression of chondrogenesis genes (*col2a1*, *tgfb3*, *sox9*) and the perifocal reactions when a defect in articular cartilage is replaced by a cell engineering construct. By the method of RT-PCR in an *in vitro* experiment, the expression of the genes *col2a1*, *tgfb3*, *sox9* was evaluated in the MMSC culture when exposed to the cytokine Tgf β 3. In an *in vivo* experiment on 27 Wistar rats, the dynamics of histological changes was studied on the 14th, 30th, 90th days after the formation of a defect in the articular cartilage in 3 groups of experimental animals: without defect replacement, with transplantation of a cell engineering construct with a mesenchymal stem cells (MSC) without modification and with the modification of the cytokine Tgf β 3. Preliminary modification of the MSC cell culture used with the cytokine Tgf β 3. A relative increase in the expression of the *col2a1*, *tgfb3*, *sox9* genes was found to be 800, 20 and 120 times, respectively, under the action of the Tgf β 3 cytokine on MSC culture *in vitro*.

Keywords: MSC, gyaline cartilage, tgfb3, CEC, defect.

В настоящее время в мире около 40% населения имеют проблемы, связанные с заболеваниями или травмами суставов, которые сопровождаются нарушением целостности гиалинового хряща и развитием остеоартроза [1, 2]. Большую часть среди больных

остеоартрозом составляют пациенты с патологией крупных суставов – коленного и тазобедренного [3]. Характерные для данной патологии болевой синдром и двигательные нарушения со временем прогрессируют и приводят к необходимости выполнения серьезного и дорогостоящего оперативного вмешательства по замене поврежденного сустава на искусственный эндопротез [4, 5].

Недостаточная регенеративная способность гиалинового хряща обусловлена его структурой: полярным и зональным расположением хондроцитов [6-8]. Еще в 1783 г. было отмечено, что, будучи однажды поврежденным, такой хрящ не способен к регенерации [9-11]. В настоящее время большое количество работ посвящены разработке новых перспективных методов восстановления гиалинового хряща [12-14]. Основной задачей при этом является обеспечение оптимальных условий для регенерации или репарации хрящевой ткани [15, 16]. Малое количество высокодифференцированных клеток (5% по сухой массе), окруженных высокогидратированным внеклеточным матриксом, позволяет хрящевой ткани выдерживать значительные механические воздействия и обратимо восстанавливать свой объем [17, 18]. Несмотря на большое количество доступных современным хирургам методов, используемых для восстановления повреждений хряща, данная проблема до сих пор не решена в полном объеме [1]. По разработанной методике аутологичной хондропластики в большинстве случаев не удается полностью заместить поврежденный участок из-за недостатка донорского материала и инвазивности его забора [19, 20]. Метод микрофрактурирования показывает положительные результаты лишь в краткосрочной перспективе, так как образующийся из волокнистого хряща регенерат обладает отличными от гиалинового хряща упруго-прочностными характеристиками [21-23].

В 1987 г. группой шведских ученых во главе с М. Brittberg была предложена принципиально новая методика предварительного культивирования хондроцитов с последующей их трансплантацией в область повреждения [24]. Затем данный метод видоизменили, и клеточные элементы (хондроциты, ММСК, iPSC или другие клетки) начали трансплантировать в область дефекта в составе биodeградируемого скаффолда [25-27]. Применение таких клеточно-инженерных конструкций (КИК) показывает хорошие результаты, но лишь в среднесрочной перспективе [28, 29, 30]. Однако при длительном наблюдении и они также проявляют признаки деградирования [14, 25]. В настоящее время одним из наиболее отработанных подходов является белковая модификация клеточной культуры цитокином Tgf β 3, играющим ключевую роль в хондрогенной пролиферации клеточной культуры. Механизм действия данного цитокина подробно описан в научных публикациях [31-33].

Целью данного исследования было оценить влияние цитокина Tgfβ3 на экспрессию генов хондрогенеза (*col2a1*, *tgfb3*, *sox9*) и динамику перифокальных реакций при замещении дефекта суставного хряща клеточно-инженерной конструкцией в эксперименте.

Материал и методы исследования. *Эксперимент in vivo.* Исследование выполнено на 27 половозрелых самках крысы линии Wistar весом 260±40 г. Экспериментальная работа прошла этическую экспертизу и соответствовала международным рекомендациям по проведению медико-биологических исследований с использованием животных. Все животные случайным образом были разделены на 3 группы по 9 животных в каждой: Контрольная («D») – просто дефект, без трансплантации КИК; Без Tgfβ3 («C») – дефект с трансплантацией КИК, без модификации клеточной культуры цитокином Tgfβ3; С Tgfβ3 («ТС») – дефект с трансплантацией КИК, с модификацией клеточной культуры цитокином Tgfβ3.

Животным формировали поверхностный дефект гиалинового хряща проксимального конца большеберцовой кости глубиной 0,5 мм и диаметром 1,0 мм с помощью специально разработанного нами устройства [34], после чего животным групп С и ТС в область сформированного дефекта трансплантировали КИК. После послойного закрытия раны крыс помещали в одинаковые условия с принудительной вентиляцией при 20°C и относительной влажностью 40–75%. На 14-е, 30-е и 90-е сутки после операции животных выводили из эксперимента и забирали блок тканей для гистологического исследования.

Культивирование и дифференцировка клеток. Культуру мезенхимных мультипотентных стромальных клеток (ММСК) выделяли из костного мозга половозрелых крыс. Культивирование клеток проводили в среде DMEM («Биолот», Россия) с 10% сыворотки FBS («Биолот», Россия) и пенициллин-стрептомицином («Биолот», Россия) в концентрации 25 мкг/мкл при стандартных условиях (температура 37°C, 5% CO₂). Смену среды осуществляли каждые 3 суток. Контроль пролиферации проводили с помощью светового микроскопа Leica (Германия). Принадлежность клеточной культуры к ММСК (CD90+, CD45–) была подтверждена цитофлюориметрическим анализом, который выполняли после третьего пассажа с помощью прибора BDFACS Aria III (BDBiosciences, США). Для дифференцировки ММСК в хондрогенном направлении использовали цитокин Tgfβ3 (Sigma, USA) в концентрации 10 нг/мкл с добавлением его при каждой смене среды.

Изготовление биодеградируемого скаффолда и КИК. Для изготовления скаффолдов на основе поли (D,L-лактида) (PLA) готовили растворы полимера в DMSO с 10% воды для инъекций. Образцы замораживали при –20°C в течение 24 часов, а затем замороженные образцы помещали в лиофилизатор при температуре –50°C и давлении 1 Торр для полного

удаления растворителя. КИК получали статическим совмещением биodeградируемого носителя и культуры ММСК.

Проведение гистологических исследований. Для гистологических исследований блоки тканей оперированного сустава помещали в 10%-ный формалин, после чего декальцинировали при помощи препарата «ТрилонБ» («Нижегородхимпродукт», Россия) и готовили парафиновые блоки. Срезы толщиной 5–10 мкм получали с помощью микротомы Leica (Германия). Окраску проводили гематоксилин-эозином («Био-Витрум», Россия) и альциановым синим («Био-Витрум», Россия) согласно прилагаемым производителем протоколам. Исследование образцов осуществляли с помощью микроскопа Leica (Германия).

Проведение полимеразной цепной реакции. Для оценки экспрессии основных генов, ответственных за хондрогенез, применяли полимеразную цепную реакцию в реальном времени. С ее помощью оценивали изменение экспрессии ответственных за хондрогенез генов: *col2a1* – ген, кодирующий коллаген II типа, один из основных белков внеклеточного матрикса гиалинового хряща, *tgfb3* – ген, кодирующий белок Tgfb3 – один из основных цитокинов, ответственных за хондрогенез, *sox9* – ген, кодирующий один из основных транскрипционных факторов участвующий в хондрогенезе. Относительное увеличение высчитывали по методу $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Для нормировки использовали ген *18S*. Последовательности праймеров самостоятельно подбирали по базе PubMed.

Результаты исследования и их обсуждение. В ходе исследования установлено, что экспрессия тестируемых генов в клеточной культуре ММСК под действием цитокина Tgfb3 превышала таковую в культуре без ММСК без дополнительной стимуляции (табл. 1).

Таблица 1

Увеличение экспрессии генов под действием белка Tgfb3

Название гена	Увеличение (раз)
<i>col2a1</i>	800
<i>tgfb3</i>	20
<i>sox9</i>	120

За время проведения эксперимента у подопытных животных отсутствовали воспалительные реакции, летальные исходы не зарегистрированы, что подтверждает безопасность применяемой КИК и соответствует опубликованным ранее результатам.

На 14-е сутки после формирования дефектов контрольной группе животных «D» в месте повреждения суставной поверхности визуализировали чашеобразный дефект, заполненный детритом – рыхлой, отечной волокнистой тканью с небольшим количеством мононуклеаров и фибробластов (рис 1, А, В, С). В группе «С» – с применением

немодифицированной КИК – дефект определялся в виде углубления, заполненного массой КИК с крупными светлыми клетками внутри мембраны, с небольшим количеством фибробластов и волокон (рис. 1 D). Костная пластинка прерывалась в области дна дефекта, местами заполнялась волокнистой тканью (рис. 1 E). Визуализировались краевые некрозы хряща (кариолизис) после повреждения. Область дефекта была заполнена фрагментами КИК с крупными светлыми клетками и волокнистой тканью (рис. 1 F).

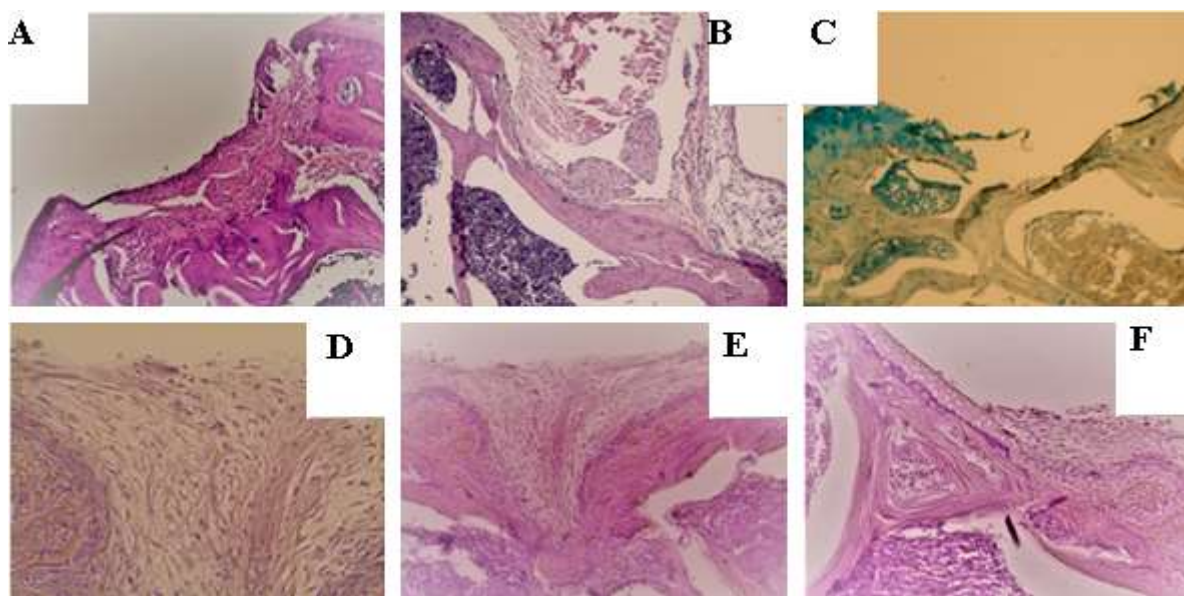


Рис. 1. Микрофотография препаратов области дефекта на 14-е сутки: А – группа «D»: чашеобразный дефект заполнен волокнистой тканью с мононуклеарами и фибробластами (окраска гематоксилин-эозином, ув. x40); В – группа «D»: дно дефекта – костная пластинка (окраска гематоксилин-эозином, ув. x100); С – группа «D»: деструкция, кариорексис и кариолизис хондроцитов в крае хряща (окраска альтиановым синим, ув. x100); D – группа «С»: дефект заполнен массой КИК, представлен крупными светлыми клетками в сетке мембраны (окраска гематоксилин-эозином, ув. x400, конденсор опущен); E – группа «С»: прерывистая субхондральная пластинка в дне дефекта, группы хондроцитов на ней (окраска гематоксилин-эозином, ув. x200); F – группа «ТС»: в крае хряща – кариолизис, дефект заполнен скаффолдом с ММСК (окраска гематоксилин-эозином, ув. x200)

На 30-е сутки после операции в группе «D» дефект суставной поверхности визуализировали в форме более плоской чаши, заполненной примерно наполовину волокнистой тканью, местами с сосудами и четко очерченными краями (рис. 2 А, В). Дно дефекта было образовано прерывистой костной пластинкой, местами покрыто волокнистой тканью. В зоне дефекта хрящевая ткань или хондроциты отсутствовали. В суставном хряще по краям дефекта сохранялись некробиотические изменения. В указанные сроки в группе

«С» область дефекта была заполнена волокнистой тканью с очагами хондроцитов, дно дефекта представляло собой прерывистую костную пластинку с очагами хондрального остеогенеза (рис. 2 С). В группе «ТС» на 30-е сутки в зоне дефекта также располагалась волокнистая ткань, среди коллагеновых волокон определялась КИК в виде сетки и группы больших округлых хондроцитоподобных клеток со светлой цитоплазмой и округлыми ядрами в ней. Глубже располагалась субхондральная костная пластинка с прослойкой хрящевой ткани разной толщины (рис. 2 D).

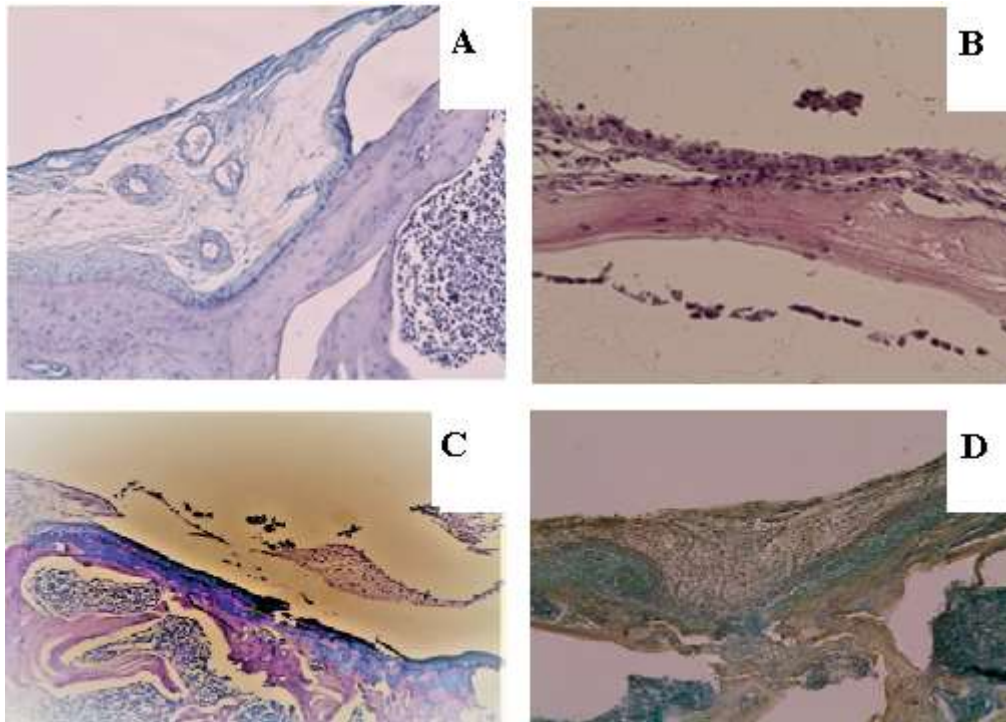


Рис. 2. Микрофотография препаратов области дефекта на 30-е сутки: А – группа «D»: волокнистая ткань с сосудами, заполняющая дефект (окраска альциановым синим, ув. x200); В – группа «D»: покрытое дно дефекта (окраска гематоксилин-эозином, ув. x400); С – группа «С»: хондральный остеогенез в дне дефекта, слой хондроцитов на его поверхности (окраска альциановым синим, ув. x200); D – группа «ТС»: КИК с крупными хондроцитоподобными клетками со светлой цитоплазмой и группами хондроцитов в дне дефекта (окраска альциановым синим, ув. x200, конденсор опущен)

К 90-м суткам дефект суставной поверхности в группе «D» стал более плоским в сравнении с ранними сроками наблюдения. Примерно четверть его поверхности покрывала волокнистая ткань. Глубокая чаша дефекта сохранялась (рис. 3 А). Дно дефекта было представлено зрелой пластинчатой костью без хрящевых клеток и признаков остеогенеза, под ней располагалась губчатая кость с кроветворным костным мозгом между костными балками. В группе «С» в суставной поверхности выявлялся плоский дефект, заполненный волокнисто-хрящевой тканью (рис. 3 В). В ней были заметны очаги хондрального

остеогенеза вокруг групп хондроцитов. В группе «ТС» определялась область повреждения с неровной поверхностью, дно было образовано прерывающейся костной пластинкой с широкой прослойкой хрящевой ткани на ней (рис. 3 С, D). Их окружали скопления хондроцитов.

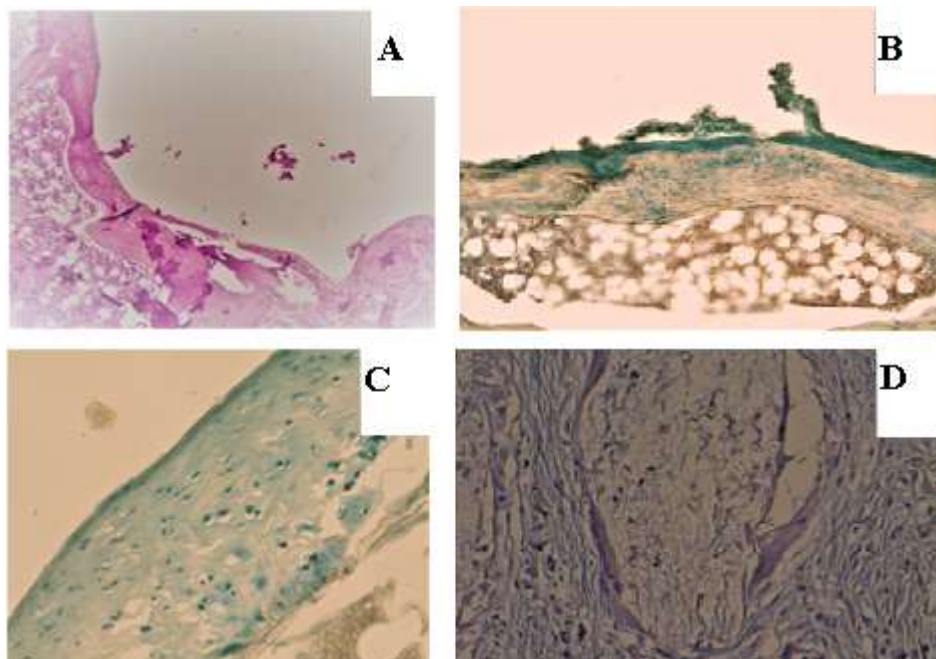


Рис. 3. Микрофотография препаратов области дефекта на 90-е сутки: А – группа «D»: костная пластинка в дне дефекта, покрыта волокнистой тканью разной толщины без элементов гиалинового хряща (окраска гематоксилин-эозином, ув. x100); В – группа «С»: волокнисто-хрящевая ткань с группами хондроцитов и участками хондрального остеогенеза в дне дефекта (окраска альциановым синим, ув. x200); С – группа «ТС»: хондронидная ткань на поверхности дефекта, хондроциты изолированные и в виде изогенных групп (окраска альциановым синим, ув. x400); D – группа «ТС»: сохранившиеся инкапсулированные фрагменты КИК в зоне дефекта (окраска альциановым синим, ув. x400, конденсор опущен)

В настоящее время активно развиваются методики, связанные с применением различных КИК, состоящих из биodeградируемого скаффолда, заселенного культурой клеток [28], однако многие молекулярные механизмы, связанные с клеточной пролиферацией, остаются неясными [35]. В нашей работе была изучена целесообразность применения цитокина Tgf β 3 для модификации КИК при замещении поверхностного дефекта гиалинового хряща с помощью гистологической методики, что согласуется с литературными данными как по выбору модели эксперимента, так и по использованию гистологического метода анализа результатов [36].

Ранее в эксперименте *in vitro* нами было показано, что применение цитокина Tgfβ3 при культивировании ММСК с 7-х суток наблюдения приводит к агрегации клеточной культуры, что было расценено как начало хондрогенной дифференцировки. Данное предположение подтвердили полученные нами результаты об относительном увеличении экспрессии генов *col2a1*, *tgfb3*, *sox9* в 800, 20 и 120 раз соответственно при культивировании ММСК в присутствии цитокина Tgfβ3, а также данные научных публикаций [33, 37].

Установленная в ходе эксперимента хорошая биосовместимость тестируемых КИК на ранних сроках наблюдения (14 суток) подтвердила полученные ранее результаты об отсутствии негативных тканевых реакций на трансплантацию биоматериалов из полимолочной кислоты [38, 39]. В указанный срок гистологическая картина в области дефекта была схожей во всех исследуемых группах, за исключением визуализации скаффолда в обеих опытных группах. Однако на 30-е сутки у животных группы «С» область дефекта частично заполнялась хондроцитами, в отличие от животных контрольной группы. В то же время после трансплантации КИК область дефекта в группе «С» была покрыта волокнистой тканью, тогда как в группе «ТС» – тканью с хондроцитоподобными клетками, что свидетельствует о положительном влиянии дифференцированных клеток на регенерацию гиалинового хряща. По нашему мнению, увеличение экспрессии ответственных за хондрогенез генов, согласно результатам РВ-ПЦР, под действием цитокина Tgfβ3 привело к увеличению синтеза белков внеклеточного матрикса гиалинового хряща, что косвенно подтверждается при окраске срезов тканей в области дефекта альциановым синим для выявления ГАГ. По-видимому, появление хондроцитоподобных клеток в области регенерата также связано с применением модифицированной цитокином Tgfβ3 культуры ММСК, что подтверждается данными Yamagata с соавт. [40]. При этом дальнейшее увеличение дефекта в контрольной группе является следствием низкой регенеративной способности гиалинового хряща [41-43].

К концу эксперимента (90-е сутки) гистологические различия области повреждения между исследуемыми группами были еще более выражены. У животных в контрольной группе в области латерального мышелка определялась зона деструкции субхондральной кости, без каких-либо признаков регенераторного процесса. В то же время у крыс в группе «С» область дефекта была заполнена волокнисто-хрящевой тканью (рис. 3 С), а у животных в группе «ТС» четко визуализировалась прослойка хрящевой ткани с инкапсулированными остатками полилактидной мембраны в виде нитей, окруженных скоплениями хондроцитов (рис. 3D). В ходе исследования было выявлено, что в процессе приготовления гистологических препаратов отмечается частичная деградация трансплантированного полимерного носителя, что, на наш взгляд, говорит о необходимости разработки другого

эффективного способа приготовления срезов для анализа регенеративных изменений в области созданного повреждения. По данным гистологических материалов не удалось однозначно определить полное замещение области повреждения в экспериментальных группах, что было показано ранее методом СЭМ [38]. Мы связываем этот факт с погрешностями при ориентации среза относительно центра дефекта и малым объемом исследуемого материала (экспериментальное животное – крыса), что требует дальнейшего исследования на более крупных моделях.

Заключение. Таким образом, применение цитокина Tgfβ3 способствует экспрессии генов хондрогенеза (*col2a1*, *tgfb3*, *sox9*) и хондрогенной дифференцировке ММСК в культуре. По-видимому, заселение такой модифицированной культуры в скаффолд и трансплантация полученной КИК в область дефекта суставного хряща стимулируют перифокальные регенераторные процессы за счет увеличения синтеза белков внеклеточного матрикса гиалинового хряща, таких как ГАГ. Созданная технология получения модифицированной клеточно-инженерной конструкции представляется перспективной для дальнейшего изучения на более крупных моделях животных, включающего не только гистологические исследования, но и изучение физико-механических свойств полученных регенератов.

Список сокращений: КИК – клеточно-инженерная конструкция. ММСК – мезенхимные стромальные стволовые клетки. Tgfβ – трансформирующий ростовой фактор роста β. iPSC – индуцированные плюрипотентные стволовые клетки. PLA – полимолочная кислота. ГАГ – гликозаминоглинаны. РВ-ПЦР – полимеразная цепная реакция в реальном времени.

Список литературы

1. 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. Т. 22. № 3. С. 122-134. DOI:10.21823/2311-2905-2016-22-3-122-134.
2. Bornes T.D., Adesida A.B., Jomha N.M. Mesenchymal stem cells in the treatment of traumatic articular cartilage defects: A comprehensive review. *Arthritis. Res. Ther.* 2014. Vol. 16. no. 5. P. 432. DOI:10.1186/s13075-014-0432-1.
3. Hawellek T., Hubert J., Hischke S., Krause M., Bertrand J., Pap T., Püschel K., Rütter W., Niemeier A. Articular cartilage calcification of the hip and knee is highly prevalent, independent of

age but associated with histological osteoarthritis: evidence for a systemic disorder. *Osteoarthr. Cartil.* 2016. Vol. 24. no. 12. P. 2092-2099. DOI:10.1016/j.joca.2016.06.020.

4. Becher C., Cantiller E.B. Focal articular prosthetic resurfacing for the treatment of full-thickness articular cartilage defects in the knee: 12-year follow-up of two cases and review of the literature. *Arch. Orthop. Trauma Surg.* 2017. Vol. 137. no. 9. P. 1307-1317. DOI:10.1007/s00402-017-2717-8

5. Uchida S., Noguchi M., Utsunomiya H., Kanezaki Sh., Mori T., Matsuda D.K., Sakai A. Hip arthroscopy enables classification and treatment of precollapsesubchondral insufficiency fracture of the femoral head associated intra-articular pathology. *Knee Surgery. Sport. Traumatol. Arthrosc.* 2018. Vol. 26. no. 8. P. 2527-2535. DOI:10.1007/s00167-017-4722-4.

6. Carballo C.B., Nakagawa Y., Sekiya I., Rodeo S.A. Basic Science of Articular Cartilage. *Clin. Sports Med.* 2017. Vol. 36. no. 3. P. 413-425. DOI:10.1016/j.csm.2017.02.001.

7. Decker R.S., Koyama E., Pacifici M. Articular Cartilage: Structural and Developmental Intricacies and Questions. *Curr. Osteoporos Rep.* 2015. Vol. 13. no. 6. P. 407-414. DOI: 10.1007/s11914-015-0290-z.

8. 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.* 2015. Vol. 11. no. 1. P. 21-34. DOI:10.1038/nrrheum.2014.157.

9. Walter S.G., Ossendorff R., Schildberg F.A. Articular cartilage regeneration and tissue engineering models: a systematic review. *Arch. Orthop. Trauma Surg.* 2019. Vol. 139. no. 3. P. 305-316. DOI:10.1007/s00402-018-3057-z.

10. Aleksandrov V.N., Sokolova M.O., Komarov A.V, Mikhailova E.V., Kokorina A.A., Kriventsov A.V. Cell technologies in cartilage regeneration. *Tsitologiya.* 2019. Vol. 62. no. 3. P. 160-172. DOI:10.31857/S0041377120030025.

11. Zhang Sh., Hu B., Liu W., Wang P., Lv X., Chen S., Liu H., Shao Z. Articular Cartilage Regeneration: The Role of Endogenous Mesenchymal Stem/Progenitor Cell Recruitment and Migration. *Rev. Semin. Arthritis. Rheum.* 2020. Vol. 50. no. 2. P. 198-208. DOI:10.1016/j.semarthrit.2019.11.001.

12. Zheng P, Hu X, Lou Y, Tang K. A rabbit model of osteochondral regeneration using three-dimensional printed polycaprolactone-hydroxyapatite scaffolds coated with umbilical cord blood mesenchymal stem cells and chondrocytes. *Med. Sci. Monit.* 2019. Vol. 25. P. 7361-7369. DOI:10.12659/MSM.915441.

13. Gigante A., Cecconi S., Calcagno S., Busilacchi A., Enea D. Arthroscopic Knee Cartilage Repair With Covered Microfracture and Bone Marrow Concentrate. *Arthrosc. Tech.* 2012. Vol. 1. no. 2. P. 175-180. DOI:10.1016/j.eats.2012.07.001.

14. Bryanskiy A.I., Kulyaba T.A., Kornilov N.N., Rumakin V.P., Gornostaev V.S. Arthroplasty Using Autologous Multipotent Mesenchymal Cells and Collagen Membrane Chondro-Gide. *Vestn. Travmatol. i Ortop. im N.N. Priorova*. 2014. Vol. 1. P. 62-66. DOI:10.32414/0869-8678-2014-1-62-66.
15. Grigorian A.S., Deev R.V., Kruglyakov P.V., Bilibina A.A., Sokolova I.B., Pavlichenko N.N. The use of transplants containing multipotentmesenchymal stromal cells for the repair of the articular surface in experiment. *Cell Transplantology Tissue Eng*. 2010. Vol. 5. no. 2. P. 44-55.
16. Luo Y., Sinkeviciute D., He Y., Karsdal M., Henrotin Y., Mobasher A., Önerfjord P., Bay-Jensen A. The minor collagens in articular cartilage. *Protein Cell*. 2017. Vol. 8. No. 8. P. 560-572. DOI:10.1007/s13238-017-0377-7.
17. Lahm A., Kasch R., Mrosek E., Spank H., Erggelet Ch., Esser J., Merk H. Semiquantitative analysis of ECM molecules in the different cartilage layers in early and advanced osteoarthritis of the knee joint. *Histol. Histopathol*. 2012. Vol. 57. no. 5. P. 609-615. DOI:10.14670/HH-27.609.
18. 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. Vol. 39. no. 12. P. 2549-2557. DOI:10.1177/0363546511420688.
19. Dewan A.K., Gibson M.A., Elisseeff J.H., Trice M.E. Evolution of autologous chondrocyte repair and comparison to other cartilage repair techniques. *Biomed. Res. Int*. 2014. P. 2724-2781. DOI:10.1155/2014/272481.
20. 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. *Osteoarthr. Cartil*. 2007. Vol. 15. no. 2. P. 226-231. DOI:10.1016/j.joca.2006.08.008.
21. Medvedeva E.V., Grebenik E.A., Gornostaeva S.N., Telpuhov V.I., Lychagin A.V., Timashev P.A., Chagin A.S. Repair of damaged articular cartilage: Current approaches and future directions. *Int. J. Mol. Sci*. 2018. Vol. 19. no. 8. DOI:10.3390/ijms19082366.
22. Becher C., Ettinger M., Ezechieli M., Kaps C., Ewig M., Smith T. Repair of retropatellar cartilage defects in the knee with microfracture and a cell-free polymer-based implant. *Arch. Orthop. Trauma Surg*. 2015. Vol. 135. no. 7. P. 1003-1010. DOI:10.1007/s00402-015-2235-5.
23. Niethammer T., Valentin S., Ficklscherer A., Gülecyüz M., Pietschmann M., Müller P. Revision surgery after third generation autologous chondrocyte implantation in the knee. *Int. Orthop*. 2015. Vol. 39. no. 8. P. 1615-1622. DOI:10.1007/s00264-015-2792-9.

24. Brittberg M., Lindahl A., Nilsson A., Ohlsson C., Isaksson O., Peterson L. Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation. *New Engl. J. Med.* 1994. Vol. 331. no. 14. P. 889-895. DOI:10.1056/NEJM199410063311401.
25. Madry H., Orth P., Kaul G., Zurakowski D., Menger M.D., Kohn D., Cucchiarini 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. Vol. 130. no. 10. P. 1311-1322. DOI:10.1007/s00402-010-1130-3.
26. 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. Vol. 138. no. 10. P. 4456-4462. DOI:10.1210/endo.138.10.5425.
27. Barlian A., Judawisastra H., Alfarafisa N.M., Wibowo U.A., Rosadi I. Chondrogenic differentiation of adipose-derived mesenchymal stem cells induced by L-ascorbic acid and platelet rich plasma on silk fibroin scaffold. *Peer J.* 2018. P. e5809. DOI:10.7717/peerj.5809.
28. Chen G., Kawazoe N. Porous Scaffolds for Regeneration of Cartilage, Bone and Osteochondral Tissue. *Advances in Experimental Medicine and Biology.* 2018. Vol. 1058. P. 171-191. DOI:10.1007/978-3-319-76711-6_8.
29. Li Ming, Yuan Zhipeng, Yu Fei, RaoFeng, Weng Jian, Jiang Baoguo, Wen Yongqiang, Zhang Peixun. Microfluidic-based screening of resveratrol and drug-loading PLA/Gelatinenano-scaffold for the repair of cartilage defect. *Artif Cells, Nanomedicine Biotechnol.* 2018. Vol. 46. Sup. 1. P. 336-346. DOI:10.1080/21691401.2017.1423498.
30. Saghebasl S., Davaran S., Rahbarghazi R., Montaseri A., Salehi R., Ramazani A. Synthesis and in vitro evaluation of thermosensitive hydrogel scaffolds based on (PNIPAAm-PCL-PEG-PCL-PNIPAAm)/Gelatin and (PCL-PEG-PCL)/Gelatin for use in cartilage tissue engineering. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* 2018. Vol. 29. no. 10. P. 1185-1206. DOI:10.1080/09205063.2018.1447627.
31. Mahboudi H., Soleimani M., Enderami S.E., Kehtari M., Ardeshirylajimi A., Eftekhary M., Kazemi B. Enhanced chondrogenesis differentiation of human induced pluripotent stem cells by MicroRNA-140 and transforming growth factor beta 3 (TGFβ3). *Biologicals.* 2018. Vol. 52. P. 30-36. DOI:10.1016/j.biologicals.2018.01.005.
32. Chijimatsu R., Yano F., Saito T., Kobayashi M., Hamamoto Sh., Kaito T., Kushioka J., Hart D.A., Chung U.-I., Tanaka S., Yoshikawa H., Nakamura N. Effect of the small compound TD-198946 on glycosaminoglycan synthesis and transforming growth factor β3-associated chondrogenesis of human synovium-derived stem cells in vitro. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* 2019. Vol. 13. no. 3. P. 446-458. DOI:10.1002/term.2795.

33. Bozhokin M.S., Sopova Y.V., Kachkin D.V., Rubel A.A., Khotin M.G. Mechanisms of TGFβ3 Action as a Therapeutic Agent for Promoting the Synthesis of Extracellular Matrix Proteins in Hyaline Cartilage. *Biochemistry (Moscow)*. 2020. Vol. 85. no. 4. P. 436-447. DOI:10.1134/S0006297920040045.
34. Божокин М.С., Божкова С.А., Волков А.А. Устройство для формирования стандартизированных дефектов хрящевой поверхности суставов в эксперименте // 2017. Патент РФ 175628U1. 2017. Бюл. № 35.
35. De Bari C., Roelofs A.J. Stem cell-based therapeutic strategies for cartilage defects and osteoarthritis. *Curr. Opin. Pharmacol.* 2018. Vol. 40. P. 74-80. DOI:10.1016/j.coph.2018.03.009.
36. Maglio M., Brogini S., Pagani S., Giavaresi G., Tschon M. Current Trends in the Evaluation of Osteochondral Lesion Treatments: Histology, Histomorphometry, and Biomechanics in Preclinical Models. *Biomed. Res. Int.* 2019. Vol. 2019. Article ID 4040236. DOI:10.1155/2019/4040236.
37. Ruiz M., Maumus M., Fonteneau G., Pers Y.-M., Ferreira R., Dagneaux L., Delfour C., Houard X., Berenbaum F., Rannou F., Jorgensen C., Noël D. TGFβi is involved in the chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells and is dysregulated in osteoarthritis. *Osteoarthr. Cartil.* 2019. Vol. 27. no. 3. P. 493-503. DOI:10.1016/j.joca.2018.11.005.
38. Божокин М.С., Божкова С.А., Нетылько Г.И., Наконечный Д.Г., Блинова М.И., Нащекина Ю.А. Результаты замещения поверхностного дефекта гиалинового хряща крысы клеточно-инженерной конструкцией в эксперименте. // Труды Карельского научного центра РАН. 2018. №4. С. 13-22. DOI:10.17076/them815.
39. Narayanan G., Vernekar V.N., Kuyinu E.L., Laurencin C.T. Poly (lactic acid)-based biomaterials for orthopaedic regenerative engineering. *Adv. Drug. Deliv. Rev.* 2016. Vol. 107. P. 247-276. DOI:10.1016/j.addr.2016.04.015.
40. Yamagata K., Nakayamada S., Tanaka Y. Use of mesenchymal stem cells seeded on the scaffold in articular cartilage repair. *Inflamm. Regen.* 2018. Vol. 38. P. 4. DOI:10.1186/s41232-018-0061-1.
41. Божокин М.С., Божкова С.А., Нетылько Г.И., Румакин В.П., Наконечный Д.Г., Чепурненко М.Н. Морфофункциональная характеристика хондрорегенераторного процесса в экспериментальном локальном дефекте поверхности суставного хряща // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. 2017. Т. 8. №2. С. 302-306. DOI:10.1126/science.139.3549.32.
42. Kondo M., Yamaoka K., Tanaka Y. Acquiring chondrocyte phenotype from human mesenchymal stem cells under inflammatory conditions. *Int. J. Mol. Sci.* 2014. Vol. 15. no. 11. P. 21270-21285. 2014. DOI:10.3390/ijms151121270.

43. Finnon K.W., Chi Y., Bou-Gharios G., Leask A., Philip A. TGF-beta signaling in cartilage homeostasis and osteoarthritis. *Front. Biosci.-Sch.* 2012. no. 4. P. 251-268. DOI:10.2741/s266.