https://doi.org/10.60043/2949-5938-2024-3-56-66

Check for updates

CC BY 4.0

# Формирование тканеинженерной конструкции хряща на основе микрочастиц децеллюляризованного хряща в перфузионном биореакторе

**Ю.Б. Басок[1,*], А.М. Григорьев[1], Л.А. Кирсанова[1], А.Д. Белова[1], А.М. Суббот[2], Е.А. Гусева[1], Е.А. Немец[1], В.И. Севастьянов[1,3]**

[1] ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр трансплантологии и искусственных органов имени академика В.И. Шумакова» Минздрава России, 123182, ул. Щукинская, 1, Москва, Россия

[2] ФГБНУ «Научно-исследовательский институт глазных болезней имени М.М. Краснова», 119021, ул. Россолимо, 11а, Москва, Россия

[3] АНО «Институт медико-биологических исследований», 123557, ул. Большой Тишинский переулок, 43/20, стр. 2, Москва, Россия

* Адрес для корреспонденции: bjb2005@mail.ru

**Аннотация**

Формирование тканевого эквивалента на основе инъекционной формы микродисперсного скаффолда — микрочастиц децеллюляризованного хряща свиньи (ДецХс) — представляется перспективной технологией для восстановления дефектов хрящевой ткани. **Целью** данной работы было получение и сравнительное исследование тканеинженерной конструкции (ТИК) на основе микрочастиц ДецХс и мезенхимальных стромальных клеток (МСК) в статических условиях и в перфузионном биореакторе. **Материалы и методы.** Процесс децеллюляризации включал циклы замораживания и оттаивания (-196...+37 °С), использование поверхностно-активных веществ (Triton X-100 и додецилсульфат натрия), а также обработку ДНКазой. Морфология поверхности и ближайшего подповерхностного слоя образцов была исследована с помощью сканирующей электронной микроскопии. Каждая ТИК состояла из $5\times10^5$ МСК и 5 мг ДецХс. **Результаты.** Установлено, что по сравнению со статическими условиями культивирование МСК на микрочастицах ДецХс в перфузионном биореакторе в течение 14 суток позволяет увеличить пролиферативную активность клеток с последующей хондрогенной дифференцировкой, о чем говорит способность клеточной компоненты ТИК синтезировать внеклеточный матрикс (ВКМ), гистохимический анализ которого выявил наличие коллагена и гликозаминогликанов (ГАГ). **Заключение.** Показана возможность формирования ТИК хряща на основе ДецХс и МСК в условиях 3D-культивирования как в статических условиях, так и в перфузионном биореакторе. Культивирование МСК на ДецХс в условиях потока при скорости 1 мм/мин способствовало увеличению пролиферативной активности клеток по сравнению со статическими условиями, а также поддерживало способность клеток синтезировать ВКМ, гистохимический анализ которого выявил наличие общего коллагена и ГАГ, что может являться подтверждением хондрогенной дифференцировки МСК.

**Ключевые слова**: проточный биореактор, хрящевая ткань, тканевая инженерия

**Конфликт интересов**: Севастьянов В.И. является членом редакционной коллегии журнала «Регенерация органов и тканей» с 2023 года, но не имеет отношения к решению о публикации данной статьи. Статья прошла принятую в журнале процедуру рецензирования. Об иных конфликтах интересов авторы не заявляли.

© Басок Ю.Б., Григорьев А.М., Кирсанова Л.А., Белова А.Д., Суббот А.М., Гусева Е.А., Немец Е.А, Севастьянов В.И., 2024

**Для цитирования:** Басок Ю.Б., Григорьев А.М., Кирсанова Л.А., Белова А.Д., Суббот А.М., Гусева Е.А., Немец Е.А, Севастьянов В.И. Формирование тканеинженерной конструкции хряща на основе микрочастиц децеллюляризованного хряща в перфузионном биореакторе. *Регенерация органов и тканей.* 2024;2(3):56–66. https://doi.org/10.60043/2949-5938-2024-2-56-66

Поступила 06.06.2024
Обработана 17.07.2024
Принята к публикации 23.07.2024

# Formation of a tissue-engineered cartilage structure based on decellularized cartilage microparticles in a perfusion bioreactor

**Yulia B. Basok[1,*], Alexey M. Grigor'ev[1], Liudmila A. Kirsanova[1], Alexandra D. Belova[1], Anastasia M. Subbot[2], Ekaterina A. Guseva[1], Evgeny A. Nemets[1], Victor I. Sevastianov[1,3]**

[1] Shumakov National Medical Research Center of Transplantology and Artificial Organs, 123182, Shchukinskaya St., 1, Moscow, Russia
[2] Research Institute of Eye Diseases, 119021, Rossolimo St., 11A, Moscow, Russia
[3] Institute of Biomedical Research and Technology, 123557, Bol'shoj Tishinskij pereulok, 43/20, str. 2, Moscow, Russia

## Abstract

The formation of a tissue equivalent based on injectable form of microdispersed scaffold — microparticles of decellularized porcine cartilage (DecCp) — seems to be a promising technology for repairing cartilage tissue defects. The aim of this work was to obtain and comparatively study a tissue-engineering construct (TEC) based on DecCp microparticles and mesenchymal stromal cells (MSCs) under static conditions and in perfusion bioreactor. **Materials and methods**. The decellularization process included freeze-thaw cycles (-196 °C...+37 °C), the use of surfactants (Triton X-100 and sodium dodecyl sulfate), as well as DNase treatment. The morphology of the surface and the nearest subsurface layer of the samples was studied using scanning electron microscopy. Each TEC consisted of $5\times10^5$ MSCs and 5 mg DecCp. **Results**. It was found that, compared with static conditions, the cultivation of MSCs on DecCp microparticles in a perfusion bioreactor for 14 days allows increasing the proliferative activity of cells with subsequent chondrogenic differentiation, as evidenced by the ability of the cellular component of cartilage to synthesize extracellular matrix (ECM), characteristic of cartilage tissue, histochemical analysis of which revealed the presence of collagen and glycosaminoglycans (GAG). **Conclusion**. The possibility of forming cartilage TECs based on DecCp and MSCs under 3D cultivation conditions both under static conditions and in a perfusion bioreactor was shown. Cultivation of MSCs on DecCp under flow conditions at a rate of 0.5 ml/min contributed to an increase in cell proliferative activity compared with static conditions, and also supported the ability of cells to synthesize ECM, characteristic of cartilage tissue, histochemical analysis of which revealed the presence of total collagen and GAG, which may be evidence of chondrogenic differentiation of MSCs.

**Keywords:** flow bioreactor, cartilage tissue, tissue engineering.

**Conflict of interest**: the authors declare no conflict of interest.

**For citation:** Basok Yu.B., Grigor'ev A.M., Kirsanova L.A., Belova A.D., Subbot A.M., Guseva E.A., Nemets E.A., Sevastianov V.I. Formation of a tissue-engineered cartilage structure

based on decellularized cartilage microparticles in a perfusion bioreactor. *Tissue and organ regeneration*. 2024;2(3):56–66. https://doi.org/10.60043/2949-5938-2024-2-56-66

Received 06.06.2024
Revised 17.07.2024
Accepted 23.07.2024

## 1. Введение

Гиалиновый суставной хрящ — это соединительная ткань, основными функциями которой являются амортизация при нагрузках и обеспечение гладкой поверхности сустава для облегчения подвижности. Суставной хрящ состоит из внеклеточного матрикса (ВКМ), основными компонентами которого являются различные типы коллагена и протеогликаны, и высокоспециализированных резидентных клеток — хондроцитов, которые составляют всего от 1 до 5% объема хрящевой ткани и активно участвуют в поддержании динамического равновесия между синтезом и катаболизмом ВКМ [1, 2].

Коллаген составляет приблизительно 60% сухого веса гиалинового хряща, являясь основным белком в составе ВКМ. Особенно важен коллаген II типа, составляющий 90% всего коллагена, поскольку его взаимодействие с другими белками и протеогликанами напрямую влияет на поддержание физиологического гомеостаза и обеспечение фиксации хондроцитов, молекул ВКМ и факторов роста. Коллаген II типа также является важной сигнальной молекулой, которая может регулировать пролиферацию, метаболизм и дифференцировку хондроцитов [3, 4].

В отличие от большинства тканей, в суставном хряще отсутствуют кровеносные сосуды, кроме того, хондроциты имеют низкий пролиферативный потенциал, поэтому способность хрящевой ткани к регенерации ограничена [1, 5].

Мезенхимальные стромальные клетки (МСК) представляются многообещающим клеточным материалом для восстановления дефектов суставного хряща, так как по своей природе они способны дифференцироваться в различные мезенхимальные ткани, включая хрящевую. С другой стороны, терапевтический эффект МСК при внутрисуставном введении основан на паракринной секреции широкого спектра цитокинов и факторов роста, которые стимулируют пролиферацию хондроцитов и синтез ВКМ, предотвращают апоптоз клеток и воспаление. Кроме того, иммуномодулирующие свойства МСК предоставляют возможность использования аллогенных клеток [6].

Для доставки и удержания МСК в области дефекта хрящевой ткани, а также для обеспечения жизнедеятельности клеток на достаточный для запуска процессов восстановления срок используются биорезорбируемые скаффолды (матриксы, клеточные носители), среди которых чаще всего применяются материалы на основе коллагена [7]. В настоящее время перспективными представляются также матриксы, полученные путем децеллюляризации исходных тканей и органов [8]. Процедура децеллюляризации обеспечивает разрушение и удаление клеток и клеточного детрита с максимальным сохранением состава ВКМ (основным компонентом которого является коллаген), белки которого, в отличие от клеток, не несут антигенов, вызывающих реакцию отторжения, благодаря молекулярному эволюционному консерватизму [9]. В связи с этим перспективной выглядит технология получения тканеинженерных конструкций (ТИК) хряща, основанных на коллагенсодержащих микрочастицах децеллюляризованного хряща свиньи (ДецХс). Этап микронизации ДецХс позволяет увеличить площадь контакта матрикса со средой при сохранении его общего объема, что улучшает адгезию и пролиферацию клеток. В настоящее время в клинической практике активно используются децеллюляризованные кожа, мочевой пузырь, тонкая кишка и сердечный клапан свиньи, однако хрящевые ткани пока не применяются.

Для улучшения качества ТИК, формирующихся *in vitro*, необходимо как можно точнее воспроизвести биохимические и биомеханические стимулы, обеспечивающие жизнедеятельность клеток в организме [10]. Для этого применяют метод формирования ТИК в перфузионном биореакторе, который моделирует естественные условия для клеток, обеспечивая не только питание, транспорт газов к ним и выведение метаболических

продуктов благодаря постоянной замене культурной среды, но и запускают физиологические сигналы механотрансдукции [11, 12].

Целью данной работы было получение и сравнительное изучение ТИК хряща на основе микрочастиц ДецХс и МСК в статических условиях и в перфузионном биореакторе.

## 2. Материалы и методы

### 2.1. Децеллюляризация хрящевой ткани

Бедренные и коленные суставы свиней были получены на бойне (АПК ПРОМАГРО, Россия). Для получения микрочастиц хряща свиньи применяли метод криопомола с использованием криомельницы CryoMill (Retch, Германия). Децеллюляризацию ткани проводили в соответствии с методикой, опубликованной ранее [13]. Высокая плотность ткани и отсутствие пор в суставном хряще определили включение в процесс децеллюляризации стадии микронизации исходной ткани, а также использование трех циклов замораживания/оттаивания (-196...+37 °C) в дополнение к обработке поверхностно-активными веществами (три смены раствора, включающего 0,1% додецилсульфата натрия и Triton X-100 (1, 2, 3% соответственно) (все — Sigma-Aldrich, США)) и инкубацией в растворе ДНКазы I типа («СайСторЛаб», Россия).

Диаметр микрочастиц ДецХс определяли с использованием лазерного дифракционного анализатора размеров частиц SALD-7101 (Shimadzu, Япония).

### 2.2. Сканирующая электронная микроскопия (СЭМ)

Морфологию поверхности и ближайшего подповерхностного слоя образцов исследовали с помощью СЭМ с использованием лантаноидного контрастирования BioREE («Глаукон», Россия), который позволяет наблюдать незафиксированные биологические образцы в режиме низкого вакуума после выдерживания их в насыщенном растворе редкоземельного металла. Данный метод позволяет максимально сохранить исходное состояние исследуемого объекта благодаря отсутствию повреждающей процедуры пробоподготовки, а изображение, полученное в режиме детектирования обратно рассеянных электронов, позволяет контрастировать кальций и фосфоросодержащие структуры. Наблюдения проводились с использованием сканирующего электронного микроскопа EVO LS10 (Carl Zeiss, Германия) в режиме низкого вакуума (EP, 70 Па) при ускоряющем напряжении 20 кВ.

### 2.3. Определение содержания ДНК

Количественную оценку содержания ДНК в образцах исходной ткани и ДецХс проводили с применением набора для выделения ДНК DNeasy Blood&Tissue Kit (QIAGEN, Германия) согласно инструкции производителя. Для исследования брали навеску 10 мг исходного хряща ($n = 3$) или ДецХс ($n = 3$). Для количественного определения двухцепочечной ДНК использовали набор с флуоресцентным красителем Quant-iT PicoGreen dsDNA Assay Kits and dsDNA Reagents (Invitrogen, США) в соответствии с инструкцией производителя. Для подсчета количества ДНК в образцах использовали планшетный спектрофлуориметр Tecan Spark 10M (Tecan Trading, Швейцария) при длине волны 520 нм.

### 2.4. Формирование ТИК хряща

Образцы жировой ткани массой 3–5 г ($n = 3$) получены с информированного письменного согласия здоровых доноров во время трансплантации печени под общим наркозом. Исследование проведено в соответствии с руководящими принципами Хельсинкской декларации и одобрено Локальным этическим комитетом при ФГБУ «НМИЦ ТИО им. акад. В.И. Шумакова» Минздрава России (15 ноября 2019 г., протокол № 151119-1/1e).

Ткань инкубировали в 0,1% растворе коллагеназы I типа при температуре +37 °C в течение 20 минут. После выделения МСК культивировали в питательной среде DMEM/F12 (1:1) с добавлением 10% фетальной сыворотки крупного рогатого скота, 100 ед/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина сульфата и 2 мм L-глютамина (все — Gibco, США). В эксперименте использовали клетки 3-го пассажа.

Была исследована возможность образования в биореакторе ТИК хряща из микрочастиц ДецХс, нагруженных МСК. Для проведения экспериментов по культивированию $5\times10^5$ МСК на 5 мг ДецХс в условиях потока использовали модифицированную версию перфузионного биореактора, схема которого показана на рисунке 1 [14].

Скорость потока культуральной среды составляла 1 мм/мин. Первые сутки эксперимента в системе циркулировала полная ростовая среда, которую затем заменяли на хондрогенную дифференцировочную среду в объеме 110 мл.

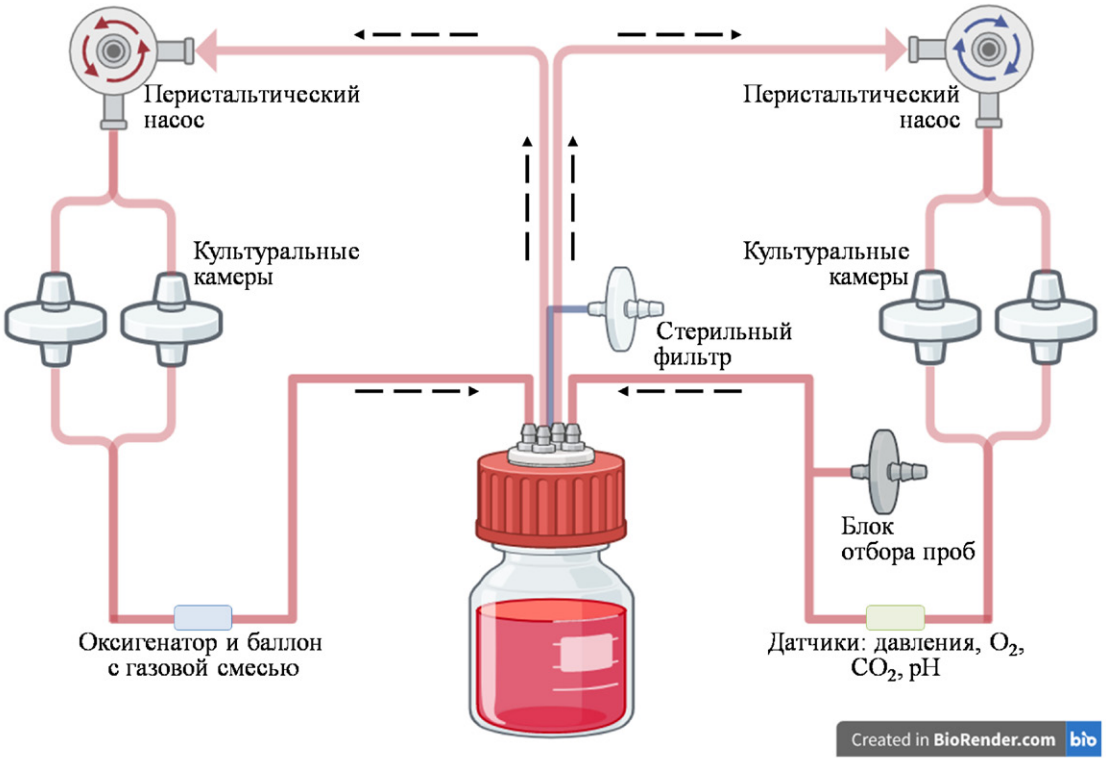


**Рис. 1**. Схема разработанного перфузионного биореактора. Создано с помощью BioRender.com

**Fig. 1.** The scheme of the developed perfusion bioreactor. Created with BioRender.com

Дифференцировочная среда включала DMEM с высоким содержанием глюкозы (Gibco, США), 10% ITS+ (Corning, США), 1% пируват натрия (Sigma-Aldrich, США), 0,25% аскорбат-2-фосфата (Sigma-Aldrich, США), 100 нМ дексаметазона (Sigma-Aldrich, США), 0,002% TGF-β1 (PeproTech, США) и 1% пенициллин-стрептомицин-глутамин (Gibco, США). Замену среды осуществляли каждые 7 суток. На 14-е сутки культуральные камеры с ТИК извлекали из биореактора. Для сравнения аналогичные ТИК культивировали в статических условиях.

### 2.5. Определение жизнеспособности клеток

Оценку жизнеспособности клеток в составе ТИК исследовали на 14-е сутки культивирования методом флуоресцентного окрашивания с применением комплекса красителей LIVE/DEAD Cell Viability Assays (Thermo Fisher Scientific, США) и микроскопа Leica DMi8 Thunder (Leica Microsystems, ФРГ).

### 2.6. Гистологическое исследование

Образцы фиксировали в 10% растворе формалина и заливали в парафин. Срезы окрашивали гематоксилином и эозином, альциановым синим на гликозаминогликаны (ГАГ) и по методу Массона на коллаген. Анализ и съемку полученных препаратов проводили с помощью микроскопа Nikon Eclipse Ti (Nikon, Япония). Для определения количества клеток на единицу площади скаффолда в ТИК, полученных в статических и динамических условиях при культивировании МСК на микрочастицах ДецХс, на микрофотографиях гистологических препаратов ТИК подсчитывали количество окрашенных гематоксилином ядер и с использованием программного обеспечения для анализа изображений ImageJ (National Institutes of Health, США) измеряли площадь скаффолда. Для подсчета использовали 15 репрезентативных микрофотографий.

## 3. Результаты и обсуждение

### 3.1. Характеристика микрочастиц ДецХс

Значительная часть лакун на поверхности микрочастиц ДецХс, средний диаметр которых не превышал 220 мкм (рис. 2А), была свободна от клеток (рис. 2Б). Количественный анализ ДНК показал значительную степень удаления ДНК из ткани ($p < 0,05$): содержание ДНК снизилось с 366,95 ± 3,0 нг/мг ткани до 9,1 ± 1,1 нг/мг ткани.

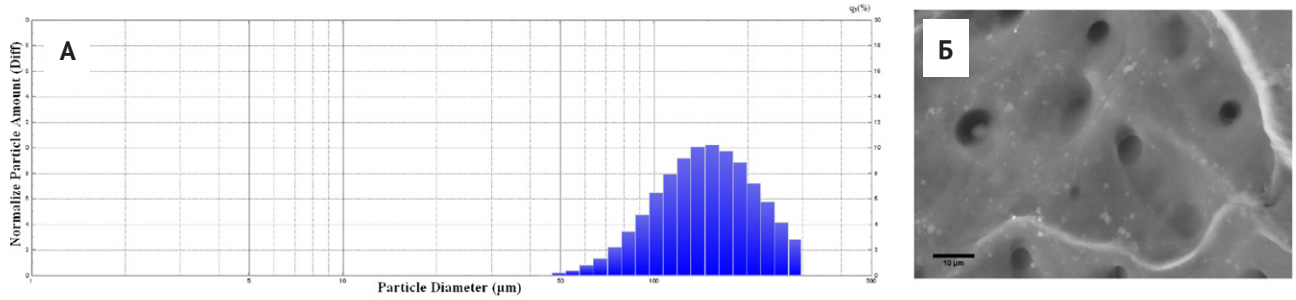


**Рис. 2**. Микрочастицы ДецХс: А — распределение частиц по размерам, Б — СЭМ

**Fig. 2.** DecCp microparticles. A — particle size distribution, B — SEM. Scale bar 10 μm. Original images (photos).

### 3.2. Культивирование ТИК в перфузионном биореакторе

Как видно на рисунках 3А и 3Б, основная масса клеток на поверхности микрочастиц ДецХс была жизнеспособна. Тем не менее небольшое количество мертвых клеток наблюдали в обоих образцах. Отметим, что доля мертвых клеток на поверхности ТИК, полученной при культивировании в биореакторе, была меньше, чем при культивировании в статических условиях, что может быть связано с наиболее эффективной доставкой питательных веществ и газов вглубь конструкции.

Заметим, что клетки прикреплялись ко всем микрочастицам ДецХс равномерно, но в случае с ТИК, сформированных в условиях биореактора, мы наблюдали более высокий уровень пролиферации клеток.

На 14 сутки культивирования было отмечено образование крупных конгломератов во всех образцах, представляющих собой микрочастицы ДецХс, соединенные клетками и наработанным ими ВКМ (рис. 4). На поверхности ДецХс визуализировался рост фибробластоподобных клеток, а соотношение количества клеток к площади скаффолда в ТИК при культивировании в биореакторе (рис. 4Б, Г, Е) было выше, чем в статических условиях (рис. 4А, В, Д). Количество клеток на единицу площади скаффолда, рассчитанное с использованием программы ImageJ, для образца, полученного в биореакторе, было в 7 раз выше по сравнению с образцом, культивированным в статических условиях (0,020 ± 0,004 и 0,003 ± 0,001 клеток/мкм$^2$ для образцов, полученных в перфузионном биореакторе и в статических условиях, соответственно).

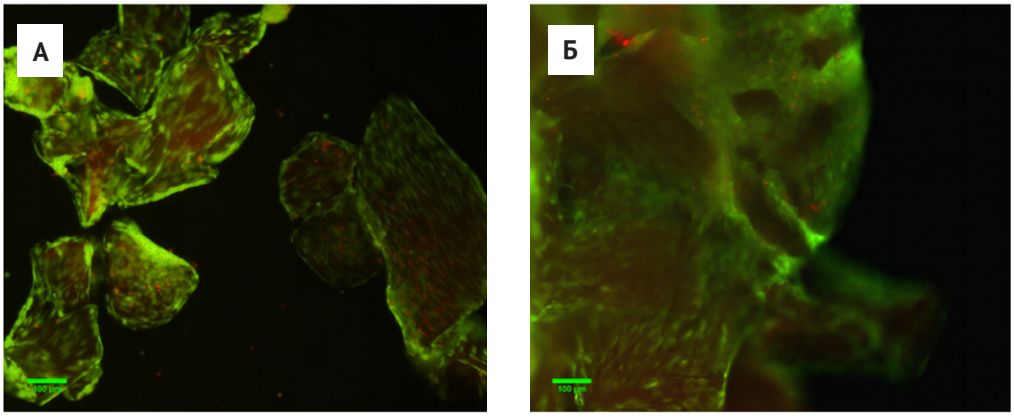


**Рис. 3**. Жизнеспособность МСК при культивировании на тканеспецифическом скаффолде из ДецХс в хондрогенной дифференцировочной среде в течение 14 суток: А — в статических условиях; Б — в проточном биореакторе при скорости потока 1 мм/мин. Окрашивание витальным красителем Live/Dead

**Fig. 3.** Viability of MSCs during cultivation on a tissue–specific scaffold from DecCp in a chondrogenic differentiation medium for 14 days: A — under static conditions, B — in a flowing bioreactor at a flow rate of 1 mm/min. Live/Dead. ×100. Original images (photos)

Формирование ВКМ наблюдали во всех изученных образцах на фоне клеточной пролиферации. В ТИК, сформированной в биореакторе, визуализировались участки, в которых объем ВКМ значительно превышал содержание клеток (рис. 4Б, Г, Е). В ВКМ всех образцов визуализировали синие коллагеновые волокна (рис. 4В, Г). При этом ВКМ равномерно окрашивался альциановым синим на ГАГ (рис. 4Д, Е). Полученные результаты указывают на дифференцировку МСК в составе ТИК в хондрогенном направлении. Это может быть связано с улучшенным транспортом питательных веществ и кислорода, а также с удалением метаболитов, что способствует созданию более благоприятной микросреды для клеточного роста и дифференцировки. Дополнительно перфузия может активировать механорецепторы МСК, что, в свою очередь, способствует их дифференцировке в хондроциты и повышает продукцию ВКМ. Внешний вид полученных ТИК представлен на рисунках 4Ж, З.

Следует отметить, что основным экспериментально определенным отличием ТИК, полученным в условиях динамического культивирования, была активная пролиферация клеток

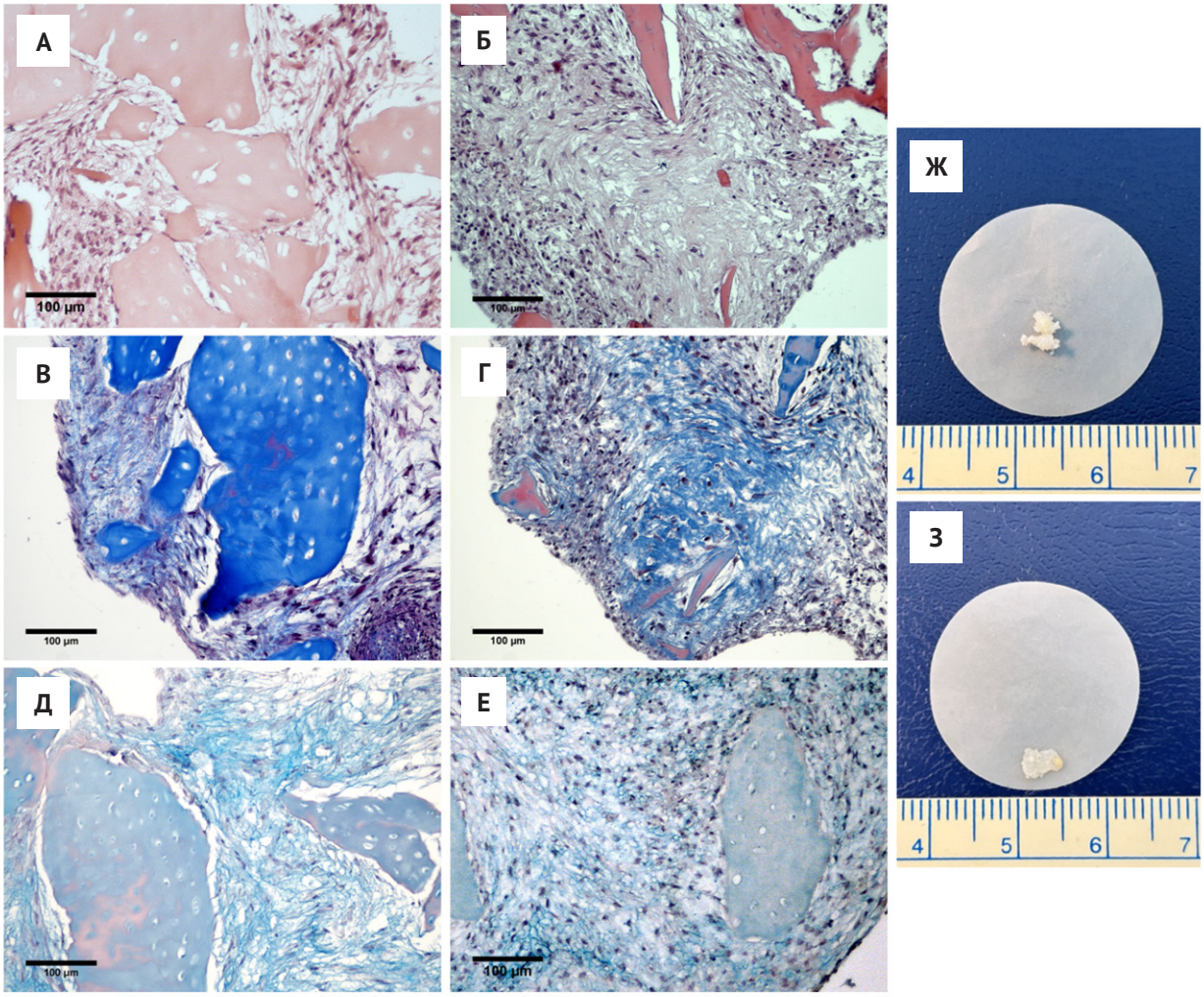


**Рис. 4**. Формирование ТИК хряща при культивировании МСК на тканеспецифическом скаффолде из ДецХс в хондрогенной дифференцировочной среде в течение 14 суток: А, В, Д, Ж — в статических условиях, Б, Г, Е, З — в перфузионном биореакторе при скорости потока 1 мм/мин. А, Б — окраска гематоксилином и эозином, В, Г — окраска по методу Массона на коллаген, Д, Е — окраска альциановым синим на ГАГ. Ж, З — внешний вид ТИК

**Fig. 4.** Formation of cartilage TEC during MSCs cultivation on a tissue–specific scaffold from DecCp in a chondrogenic differentiation medium for 14 days: А, В, Д, Ж — under static conditions, Б, Г, Е, З — in a perfusion bioreactor at a flow rate of 1 mm/min. А, Б — hematoxylin and eosin staining, В, Г –Masson's staining on collagen, Д, Е — alcian blue staining on GAG. Scale bar 100 µm. Ж, З — the appearance of the TEC. Original images (photos)

при сохранении способности синтезировать ВКМ, богатый коллагеном, и ГАГ.

Также усиленный рост клеток и колонизацию скаффолда наблюдали Theodoridis et al. при хондрогенной дифференцировке МСК жировой ткани человека [15]. Однако «разрастание» клеточной массы сопровождалось увеличением числа мертвых клеток. Авторы предположили, что это наблюдение может быть связано с высоким напряжением сдвига, создаваемым потоком жидкости [15]. Ту же гипотезу выдвинули Kock et al., объясняя снижение хондрогенеза в ТИК, включающей МСК костного мозга (КМ) и пористый поликапролактон, в результате перфузии, что выражалось в снижении синтеза ГАГ [16].

С другой стороны, во многих исследованиях было продемонстрировано, что динамическое культивирование также может способствовать хондрогенной дифференцировке [17–20]. Например, было показано, что эмбриональные МСК при культивировании на губке из фиброина шелка в условиях перфузии не только пролиферировали, но и образовывали больше ГАГ и коллагена в ВКМ. При этом авторы подчеркнули необходимость предварительной оптимизации параметров динамического культивирования.

В качестве параметров оценки Tiğli et al. предлагают подсчитывать объем клеточной массы и наработанного ВКМ в ТИК хряща [18]. Показано, что МСК КМ синтезировали в 1,8 раза больше ГАГ в ВКМ при культивировании на пористом поликапролактоне в условиях потока, при этом экспрессия генов, ответственных за хондрогенную дифференцировку (Col II, ACAN, Sox9) в ТИК, образованной в биореакторе, также была выше [20]. Усиление хондрогенеза, характеризующееся возрастанием секреции коллагена и ГАГ, наблюдали при динамическом культивировании ТИК, представляющей собой хондроциты, инкапсулированные в агарозном геле [19]. На 21-е сутки увеличение секреции ГАГ при снижении содержания ДНК наблюдали Shulz et al. в схожей ТИК хряща [17]. Описанные противоречивые исследования подчеркивают важность выбора условий культивирования для успешной разработки ТИК.

Таким образом, полученные результаты указывают на необходимость продолжения разработки технологии формирования ТИК хряща на основе ДецХс и МСК жировой ткани человека, которая должна включать: оптимизацию режима потока, количественную оценку качества ТИК (количество наработанного клетками коллагена и ГАГ), а также изучение экспрессии специфических маркеров хондрогенеза, таких как коллаген I альфа 1 (COL1A1), коллаген II альфа 1 (COL2A1), аггрекан (ACAN). В любом случае, проведенные исследования подтверждают перспективность применения перфузионных технологий для повышения эффективности и качества создаваемых ТИК для целей регенеративной медицины, что может существенно повлиять в будущем на клинические результаты в лечении заболеваний опорно-двигательного аппарата.

### 4. Заключение

Показана возможность формирования ТИК хряща на основе ДецХс и МСК в условиях 3D-культивировани как в статических условиях, так и в перфузионном биореакторе. Культивирование МСК на ДецХс в условиях потока при скорости 1 мм/мин способствовало увеличению пролиферативной активности клеток по сравнению со статическими условиями, а также поддерживало способность клеток синтезировать ВКМ, гистохимический анализ которого выявил наличие общего коллагена и ГАГ, что может являться подтверждением хондрогенной дифференцировки МСК.

## Литература

1. Alcaide-Ruggiero L, Molina-Hernández V, Granados MM, Domínguez JM. Main and Minor Types of Collagens in the Articular Cartilage: The Role of Collagens in Repair Tissue Evaluation in Chondral Defects. Int J Mol Sci. 2021;22(24):13329. DOI: 10.3390/ijms222413329
2. Almonte-Becerril M, Navarro-Garcia F, Gonzalez-Robles A, Vega-Lopez MA, Lavalle C, Kouri JB. Cell death of chondrocytes is a combination between apoptosis and autophagy during the pathogenesis of Osteoarthritis within an experimental model. Apoptosis. 2010;15(5):631–638. DOI: 10.1007/s10495-010-0458-z

3. Suh DS, Yoo JC, Woo SH, Kwak AS. Intra-Articular Atelocollagen Injection for the Treatment of Articular Cartilage Defects in Rabbit Model. Tissue Eng Regen Med. 2021;18(4):663–670. DOI: 10.1007/s13770-021-00337-0
4. Lian C, Wang X, Qiu X, Wu Z, Gao B, Liu L, et al. Collagen type II suppresses articular chondrocyte hypertrophy and osteoarthritis progression by promoting integrin β1-SMAD1 interaction. Bone Res. 2019;7:8. DOI: 10.1038/s41413-019-0046-y
5. Carneiro DC, Araújo LT, Santos GC, Damasceno PKF, Vieira JL, Santos RRD, et al. Clinical Trials with Mesenchymal Stem Cell Therapies for Osteoarthritis: Challenges in the Regeneration of Articular Cartilage. Int J Mol Sci. 2023;24(12):9939. DOI: 10.3390/ijms24129939
6. Song Y, Jorgensen C. Mesenchymal Stromal Cells in Osteoarthritis: Evidence for Structural Benefit and Cartilage Repair. Biomedicines. 2022;10(6):1278. DOI: 10.3390/biomedicines10061278
7. Lam ATL, Reuveny S, Oh SK. Human mesenchymal stem cell therapy for cartilage repair: Review on isolation, expansion, and constructs. Stem Cell Res. 2020;44:101738. DOI: 10.1016/j.scr.2020.101738
8. Nemets EA, Lazhko AE, Basok YB, Kirsanova LA, Kirillova AD, Sevastianov VI. Preparation of Tissue-Specific Matrix from Decellularized Porcine Cartilage. Russian Journal of Physical Chemistry B. 2020;14(8):1245–1251. DOI: 10.1134/S1990793120080059
9. Crapo PM, Gilbert TW, Badylak SF. An overview of tissue and whole organ decellularization processes. Biomaterials. 2011;32(12):3233–3243. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2011.01.057
10. Reina-Mahecha A, Beers MJ, van der Veen HC, Zuhorn IS, van Kooten TG, Sharma PK. A Review of the Role of Bioreactors for iPSCs-Based Tissue-Engineered Articular Cartilage. Tissue Eng Regen Med. 2023;20(7):1041–1052. DOI: 10.1007/s13770-023-00573-6
11. Ravichandran A, Liu Y, Teoh SH. Review: bioreactor design towards generation of relevant engineered tissues: focus on clinical translation. J Tissue Eng Regen Med. 2018;12(1):e7–e22. DOI: 10.1002/term.2270
12. Aprile P, Kelly DJ. Hydrostatic Pressure Regulates the Volume, Aggregation and Chondrogenic Differentiation of Bone Marrow Derived Stromal Cells. Front Bioeng Biotechnol. 2021;15:8:619914. DOI: 10.3389/fbioe.2020.619914
13. Sevastianov VI, Basok YB, Grigoriev AM, Nemets EA, Kirillova AD, Kirsanova LA, et al. Decellularization of cartilage microparticles: Effects of temperature, supercritical carbon dioxide and ultrasound on biochemical, mechanical, and biological properties. J Biomed Mater Res A. 2023;111(4):543–555. DOI: 10.1002/jbm.a.37474
14. Севастьянов ВИ, Басок ЮБ, Григорьев АМ, Кирсанова ЛА, Василец ВН. Применение технологии тканевой инженерии для формирования хрящевой ткани человека в проточном биореакторе. Вестник трансплантологии и искусственных органов. 2017;19(3):81–92. DOI: 10.15825/1995-1191-2017-3-81-92
15. Theodoridis K, Aggelidou E, Manthou M, Demiri E, Bakopoulou A, Kritis A. Assessment of cartilage regeneration on 3D collagen-polycaprolactone scaffolds: evaluation of growth media in static and in perfusion bioreactor dynamic culture. Colloids Surf B Biointerfaces. 2019;183:110403. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2019.110403
16. Kock LM, Malda J, Dhert WJ, Ito K, Gawlitta D. Flow-perfusion interferes with chondrogenic and hypertrophic matrix production by mesenchymal stem cells. J Biomech. 2014;47(9):2122–2129. DOI: 10.1016/j.jbiomech.2013.11.006
17. Schulz RM, Wüstneck N, van Donkelaar CC, Shelton JC, Bader A. Development and validation of a novel bioreactor system for load- and perfusion-controlled tissue engineering of chondrocyte-constructs. Biotechnol Bioeng. 2008;101(4):714–728. DOI: 10.1002/bit.21955
18. Tiğli RS, Cannizaro C, Gümüşderelioğlu M, Kaplan DL. Chondrogenesis in perfusion bioreactors using porous silk scaffolds and hESC-derived MSCs. J Biomed Mater Res A. 2011;96(1):21–28. DOI: 10.1002/jbm.a.32949
19. Nazempour A, Quisenberry CR, Abu-Lail NI, Van Wie BJ. Combined effects of oscillating hydrostatic pressure, perfusion and encapsulation in a novel bioreactor for enhancing extracellular matrix synthesis by bovine chondrocytes. Cell Tissue Res. 2017;370(1):179–193. DOI: 10.1007/s00441-017-2651-7

20. Silva JC, Moura CS, Borrecho G, et al. Extruded Bioreactor Perfusion Culture Supports the Chondrogenic Differentiation of Human Mesenchymal Stem/Stromal Cells in 3D Porous Poly(ε-Caprolactone) Scaffolds. Biotechnol J. 2020;15(2):e1900078. DOI: 10.1002/biot.201900078

## Об авторах

**Басок Юлия Борисовна** — д.б.н., заведующий отделом биомедицинских технологий и тканевой инженерии ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр трансплантологии и искусственных органов имени академика В.И. Шумакова» Минздрава России.

**Григорьев Алексей Михайлович** — к.б.н., старший научный сотрудник отдела биомедицинских технологий и тканевой инженерии ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр трансплантологии и искусственных органов имени академика В.И. Шумакова» Минздрава России.

**Кирсанова Людмила Анфилофьевна** — к.б.н., старший научный сотрудник отдела биомедицинских технологий и тканевой инженерии ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр трансплантологии и искусственных органов имени академика В.И. Шумакова» Минздрава России.

**Белова Александра Дмитриевна** — к.б.н., старший научный сотрудник отдела биомедицинских технологий и тканевой инженерии ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр трансплантологии и искусственных органов имени академика В.И. Шумакова» Минздрава России.

**Суббот Анастасия Михайловна** — к.м.н., руководитель лаборатории фундаментальных исследований в офтальмологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт глазных болезней имени М.М. Краснова».

**Гусева Екатерина Алексеевна** — лаборант-исследователь отдела биомедицинских технологий и тканевой инженерии ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр трансплантологии и искусственных органов имени академика В.И. Шумакова» Минздрава России.

**Немец Евгений Абрамович** — д.б.н., ведущий научный сотрудник отдела биомедицинских технологий и тканевой инженерии ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр трансплантологии и искусственных органов имени академика В.И. Шумакова» Минздрава России.

**Севастьянов Виктор Иванович** — д.б.н., профессор, главный специалист отдела подготовки научных и медицинских кадров ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр трансплантологии и искусственных органов имени академика В.И. Шумакова» Минздрава России; директор АНО «Институт медико-биологических исследований».

## Authors

**Yulia B. Basok** — Dr. Sci. (Biology), Head of the Department of Biomedical Technologies and Tissue Engineering Department, Shumakov National Medical Research Center of Transplantology and Artificial Organs.

**Alexey M. Grigor'ev** — Cand. Sci. (Biology), Senior Researcher, Department of Biomedical Technologies and Tissue Engineering, Shumakov National Medical Research Center of Transplantology and Artificial Organs.

**Liudmila A. Kirsanova** — Cand. Sci. (Biology), Senior Researcher, Department of Biomedical Technologies and Tissue Engineering, Shumakov National Medical Research Center of Transplantology and Artificial Organs.

**Alexandra D. Belova** — Cand. Sci. (Biology), Senior Researcher, Department of Biomedical Technologies and Tissue Engineering, Shumakov National Medical Research Center of Transplantology and Artificial Organs.

**Anastasia M. Subbot** — MD, Cand. Sci. (Medicine), Head of the Laboratory of Fundamental Research in Ophthalmology, Research Institute of Eye Diseases

**Ekaterina A. Guseva** — Research Laboratory Assistant, Department of Biomedical Technologies and Tissue Engineering, Shumakov National Medical Research Center of Transplantology and Artificial Organs.

**Evgeny A. Nemets** — Dr. Sci. (Biology), Leading Researcher, Department of Biomedical Technologies and Tissue Engineering, Shumakov National Medical Research Center of Transplantology and Artificial Organs.

**Victor I. Sevastianov** — Dr. Sci. (Biology), Professor of Biophysics, Senior Specialist, Department of Scientific and Medical Personnel Training, Shumakov National Medical Research Center of Transplantology and Artificial Organs; Head of the Biomedical Research and Technology Institute.

## Вклад авторов

**Ю.Б. Басок** — разработка конструкции перфузионного биореактора; сбор данных, их анализ и интерпретация; подготовка рукописи.
**А.М. Григорьев** — разработка конструкции перфузионного биореактора; проведение экспериментов по выделению МСК ЖТч и их культивированию.
**Л.А. Кирсанова** — проведение гистологического исследования образцов.
**А.Д. Белова** — определение содержания ДНК в образцах, подготовка рукописи.
**А.М. Суббот** — исследование образцов с помощью СЭМ.
**Е.А. Гусева** — проведение процедуры децеллюляризации хрящевой ткани.
**Е.А. Немец** — сбор данных, их анализ и интерпретация.
**В.И. Севастьянов** — окончательное одобрение варианта статьи для опубликования.

## Author contribution statement

**Yulia B. Basok** — development of the perfusion bioreactor design; data collection, analysis and interpretation; manuscript preparation.
**Aleksey M. Grigoriev** — development of the perfusion bioreactor design; conducting experiments on the isolation of adipose-tissue MSC and their cultivation.
**Lyudmila A. Kirsanova** — conducting histological examination of samples.
**Alexandra D. Belova** — determination of DNA content in samples, manuscript preparation.
**Anastasia M. Subbot** — SEM examination of samples.
**Ekaterina A. Guseva** — conducting the cartilage tissue decellularization procedure.
**Evgeny A. Nemets** — data collection, analysis and interpretation.
**Viktor I. Sevastyanov** — final approval of the article version for publication.