ФОРМИРОВАНИЕ ТКАНЕИНЖЕНЕРНОЙ КОНСТРУКЦИИ ХРЯЩЕВОЙ ТКАНИ В УСЛОВИЯХ *IN VITRO*

Сургученко В.А.[1, 3], Пономарева А.С.[1, 3], Кирсанова Л.А.[2], Бубенцова Г.Н.[2], Скалецкий Н.Н.[2], Севастьянов В.И.[1, 3]

[1] Лаборатория биоматериалов и систем доставки (зав. – д. б. н., проф. В.И. Севастьянов) ФГБУ «Федеральный научный центр трансплантологии и искусственных органов им. ак. В.И. Шумакова» Минздрава РФ (директор – академик РАМН, проф. С.В. Готье), Москва, Российская Федерация

[2] Лаборатория клеточной трансплантации (зав. – д. м. н. Н.Н. Скалецкий) ФГБУ «Федеральный научный центр трансплантологии и искусственных органов им. ак. В.И. Шумакова» Минздрава РФ (директор – академик РАМН, проф. С.В. Готье), Москва, Российская Федерация

[3] АНО «Институт медико-биологических исследований и технологий» (директор – д. б. н., проф. В.И. Севастьянов), Москва, Российская Федерация

Цель. Доказательство возможности формирования в условиях *in vitro* тканеинженерной конструкции хрящевой ткани на основе клеточно-инженерной конструкции, состоящей из биополимерного гидрогелевого матрикса и мезенхимальных стромальных клеток жировой ткани человека. **Материалы и методы.** В качестве биодеградируемого матрикса был выбран биополимерный материал – композиция гетерогенного имплантируемого геля *Сферо*®ГЕЛЬ (производитель ЗАО «БИОМИР сервис», г. Краснознаменск, Московская обл.). Для получения тканеинженерной конструкции мезенхимальные стромальные клетки из подкожно-жировой клетчатки человека смешивали с биополимерным матриксом и культивировали в индукционной хондрогенной среде. **Результаты.** Показано, что под воздействием индукционной хондрогенной среды культуры мезенхимальных стромальных клеток жировой ткани человека в сочетании с биополимерным матриксом образуют трехмерные структуры и синтезируют компоненты внеклеточного матрикса, характерные для хрящевой ткани: коллаген II типа и гликозаминогликаны. **Заключение.** В процессе культивирования клеточно-инженерных конструкций хрящевой ткани образуются трехмерные структуры, которые начинают продуцировать компоненты собственного внеклеточного матрикса. Это свидетельствует о начальных стадиях формирования тканеинженерных конструкций хрящевой ткани в условиях *in vitro*.

Ключевые слова: биополимерный матрикс, гидрогель, мезенхимальные стромальные клетки, жировая ткань, хондрогенная дифференцировка, тканеинженерная конструкция.

FORMATION OF TISSUE-ENGINEERED CONSTRUCT OF CARTILAGE *IN VITRO*

Surguchenko V.A.[1, 3], Ponomareva A.S.[1, 3], Kirsanova L.A.[2], Bubentsova G.N.[2], Skaletskij N.N.[2], Sevastianov V.I.[1, 3]

[1] Laboratory of biomaterials and delivery systems (Head – doct. of biol. sci., prof. V.I. Sevastianov) Academician V.I. Schumakov Federal Research Center of Transplantology and Artificial Organs (Head – academician of RAMSci, prof. S.V. Gautier), Moscow, Russian Federation

[2] Laboratory of cell transplantation (Head – doct. of med. sci. N.N. Skaletskiy) Academician V.I. Schumakov Federal Research Center of Transplantology and Artificial Organs, (Head – academician of RAMSci, prof. S.V. Gautier), Moscow, Russian Federation

[3] Institute of Biomedical Research and Technology (ANO) (Head – doct. of biol. sci., prof. V.I. Sevastianov), Moscow, Russian Federation

Aim. The goal of this study was to demonstrate the possibility of *in vitro* formation of tissue-engineered construct of cartilage on the basis of cell-engineered construct composed of biopolymer hydrogel matrix and human adipose-derived mesenchymal stromal cells. **Materials and methods.** As a biodegradable matrix, the heterogeneous composition of the implantable gel *Sphero*®GEL (Biomir Service, Krasnoznamensk, Moscow Region) was selected. To generate cell-engineered construct of cartilaginous tissue human adipose-derived mesenchymal stromal cells were mixed with biopolymer matrix *Sphero*®GEL and cultured in chondrogenesis medium.

Results. It was revealed that human adipose-derived mesenchymal stromal cells with biopolymer matrix under chondrogenic conditions generate three-dimensional structures and produce cartilaginous extracellular matrix components: collagen type II and glycosaminoglycans. **Conclusion.** It was discovered that 3-D structures formed in the process of culture of cell-engineered constructs, began to synthesize the components of the cartilage extracellular matrix. This indicates the initial stage of *in vitro* formation of tissue-engineered cartilage construct.

Key words: biopolymer matrix, hydrogel, mesenchymal stromal cells, adipose tissue, chondrogenic differentiation, tissue-engineered construct.

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время дегенеративные заболевания суставов приобретают все большую социально-медицинскую значимость. Заболеваемость остеоартрозом занимает в мире лидирующее место среди болезней суставов и наблюдается практически во всех возрастных группах.

Отсутствие в суставном хряще кровоснабжения, а также низкий уровень метаболизма из-за малого количества клеток в единице объема ткани приводят к тому, что полноценная репаративная регенерация хряща возможна лишь при небольших по площади повреждениях [1]. При обширных повреждениях хрящевой ткани, сопровождающихся разрушением надхрящницы, регенерацию хрящевой ткани опережает развитие грануляционной ткани в месте дефекта [2]. Консервативное лечение патологий сустава, а также применение таких оперативных техник, как стимуляция костного мозга, субхондральное просверливание кости, микропереломы и закрытие дефекта надкостничными или перехондриальными трансплантатами, а также частичное или полное эндопротезирование не всегда приводит к приемлемым результатам [3–6]. Метод лечения хряща, основанный на аутохондротрансплантации, получил большое коммерческое развитие [7, 8]. Однако этот метод также не лишен недостатков, основные из которых – травматичность биопсии здорового участка хряща, возможность дедифференцировки хондроцитов в условиях *in vitro*, включая фибробластоподобную перестройку [9] и неполное восстановление хрящевой ткани. В связи с этим в качестве альтернативы данному методу были рассмотрены варианты замены хондроцитов на мезенхимальные стромальные клетки (МСК), которые присутствуют во всех органах и тканях человеческого организма и обладают мультилинейным потенциалом дифференцировки в адипогенном, остеогенном и хондрогенном направлениях [10, 11]. Одним из перспективных источников МСК, благодаря простоте технологии выделения, достаточному выходу клеток и минимальной травматичности для пациента, является жировая ткань (ЖТ). Было показано, что МСК ЖТ адгезивны к поверхности культурального пластика, фибробластоподобны, по совокупности поверхностных антигенов соответствуют фенотипу мезенхимальных стромальных клеток, обладают способностью к мультилинейной дифференцировке в мезенхимальные линии [12, 13]. Применение подходов клеточной и тканевой инженерии, заключающихся в трансплантации МСК на матриксах-носителях, представляет собой перспективный способ лечения дефектов хряща с использованием функциональных тканевых заменителей.

Сургученко Валентина Александровна – к. ф.-м. н., старший научный сотрудник лаборатории биоматериалов и систем доставки (зав. – д. б. н., проф. В.И. Севастьянов) ФГБУ «Федеральный научный центр трансплантологии и искусственных органов им. ак. В.И. Шумакова» Минздрава РФ (директор – академик РАМН, проф. С.В. Готье), Москва, Российская Федерация. *Севастьянов Виктор Иванович* – д. б. н., профессор, заведующий лабораторией биоматериалов и систем доставки того же центра; директор АНО «Институт медико-биологических исследований и технологий», Москва, Российская Федерация. *Пономарева Анна Сергеевна* – научный сотрудник той же лаборатории. *Скалецкий Николай Николаевич* – д. м. н., заведующий лабораторией клеточной трансплантации того же центра. *Кирсанова Людмила Анфилофьевна* – к. б. н., старший научный сотрудник той же лаборатории. *Бубенцова Галина Николаевна* – научный сотрудник той же лаборатории.

Для корреспонденции: Севастьянов Виктор Иванович. Адрес: 123182, г. Москва, ул. Щукинская, д. 1.
Телефон: раб. 8 (499) 196-88-74; моб. 8 (926) 275-61-90. E-mail: viksev@yandex.ru.

Surguchenko Valentina Aleksandrovna – cand. of phys.-math. sci., senior research fellow of laboratory of biomaterials and delivery systems (Head – doct. of biol. sci., prof. V.I. Sevastianov) Academician V.I. Schumakov Federal Research Center of Transplantology and Artificial Organs (Head – academician of RAMSci, prof. S.V. Gautier), Moscow, Russian Federation. *Sevastianov Viktor Ivanovich* – doct. of biol. sci., prof., head of laboratory of biomaterials and delivery systems at the same center; Head of Institute of Biomedical Research and Technology (ANO), Moscow, Russian Federation. *Ponomareva Anna Sergeevn*a – research fellow at the same laboratory. *Skaletskiy Nikolay Nikolaevich* – doct. of med. sci., head of laboratory of cell transplantation the same center. *Kirsanova Lyudmila Anfilofievna* – cand. of biol. sci., senior research fellow at the same laboratory. *Bubentsova Galina Nikolaevna* – research fellow at the same laboratory.

For correspondence: Sevastianov Viktor Ivanovich. Adress: 123182, Moscow, Schukinskaya, 1.
Phone: work: 8 (499) 196-88-74; cell.: 8 (926) 275-61-90. E-mail: viksev@yandex.ru.

Основная цель применения матриксов – это доставка и удержание клеток в месте повреждения, а также обеспечение клеткам необходимого трехмерного окружения для формирования хрящевой ткани [14]. Матриксы для хрящевой ткани изготавливают из полимерных материалов синтетического или природного происхождения в виде гидрогелей, губок или волокнистых сеток [15].

Целью работы являлось доказательство возможности формирования в условиях *in vitro* тканеинженерной конструкции хрящевой ткани (ТИК ХТ) на основе клеточно-инженерной конструкции (КИК), состоящей из биополимерного гидрогелевого матрикса и мезенхимальных стромальных клеток жировой ткани человека (МСК ЖТч).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Получение и культивирование МСК ЖТч

Мезенхимальные стромальные клетки получали из образцов подкожно-жировой клетчатки человека по стандартной методике, описанной ранее [13]. Кратко, жировую ткань отмывали от крови в фосфатно-солевом растворе с добавлением антибиотиков, механически измельчали до получения гомогенной массы, которую затем обрабатывали раствором коллагеназы Type IA (Sigma, # C98891, США) из расчета 600 ед./г ткани. Фермент инактивировали ростовой средой (РС) для мезенхимальных стволовых клеток человека MesenPRO RS™ без глютамина, с ростовыми добавками MesenPRO RS™ Growth Supplement (Gibco® by Life Technologies™, USA). Клетки осаждали центрифугированием при 400 g, в течение 15 мин. Осадок фильтровали через набор фильтров с диаметром пор 100 мкм и 70 мкм, ресуспендировали в РС и рассеивали в культуральные флаконы (Corning-Costar, США). Культивирование осуществляли в стандартных условиях: при температуре 37 °С во влажной атмосфере, содержащей (5 ± 1)% CO_2. Замену РС проводили каждые 3 суток. Визуально культуру оценивали с помощью инвертированного микроскопа (Micros MC700, Австрия). В экспериментах использовали МСК ЖТч 2–3 пассажей.

Биополимерный гидрогелевый матрикс

В качестве биодеградируемого матрикса был выбран зарегистрированный в России биополимерный гидрогель – композиция гетерогенного имплантируемого геля *Сферо*®ГЕЛЬ (производитель ЗАО «БИОМИР сервис», г. Краснознаменск, Московская область). *Сферо*®ГЕЛЬ изготовлен на основе компонентов внеклеточного матрикса тканей сельскохозяйственных животных, обладает высокими биосовместимыми и биостимулирующими свойствами и предназначен для замещения дефектов мягких тканей, включая применение в клеточных технологиях. Инъекционная форма матрикса *Сферо*®ГЕЛЬ выпускается в шприцах. Время биорезорбции составляет от нескольких недель до нескольких месяцев в зависимости от условий и места имплантации [14].

Дифференцировка МСК ЖТч в хондрогенном направлении

Индукцию хондрогенной дифференцировки МСК ЖТч в условиях *in vitro* осуществляли с использованием набора для хондрогенной дифференцировки STEMPRO® Chondrogenesis Differentiation Kit (Invitrogen, USA) в 3-D-культуре методом «микросфер» в соответствии с инструкцией производителя. Для этого проводили посев МСК ЖТч в концентрации 16×10^6 кл/мл в стандартной РС, добавляя по 10 мкл полученной суспензии на дно лунок 96-луночного культурального планшета, через 2 ч инкубации в лунки вносили хондрогенную дифференцировочную среду и культивировали при температуре 37 °С во влажной атмосфере, содержащей (5 ± 1) % CO_2. Замену среды осуществляли каждые 3 суток.

Получение клеточно-инженерной конструкции хрящевой ткани

Для получения клеточно-инженерной конструкции хрящевой ткани (КИК ХТ) МСК ЖТч послойно смешивали с биополимерным матриксом *Сферо*®ГЕЛЬ в концентрации 2×10^6 кл/мл матрикса и культивировали в индукционной хондрогенной среде при температуре 37 °С во влажной атмосфере, содержащей (5 ± 1) % CO_2. Замену среды осуществляли каждые 3 суток. Время инкубации в дифференцировочной среде составило 14, 28 и 42 суток.

Гистология

Образцы микросфер и ТИК ХТ фиксировали в 10% растворе формалина в течение 4 ч, промывали в проточной воде и обезвоживали в этаноле с восходящими концентрациями, обезжиривали в смеси абсолютного этанола с хлороформом или ксилолом и заливали в парафин с добавлением пчелиного воска. Срезы толщиной 4–5 мкм получали с помощью микротома Leica (модель RM 3255, Германия). Гистологические препараты депарафинизировали и окрашивали гематоксилином и эозином, альциановым синим, по методу Маллори согласно стандартным методикам.

Иммуногистохимическое окрашивание антителами к коллагену человека II типа

Визуализацию окрашивания препаратов на коллаген человека II типа осуществляли с использо-

ванием Novocastra™ Concentrated Peroxidase Detection System (RE7130-K, Leica Microsystems), следуя инструкции производителя. Перед окрашиванием депарафинизованные гистологические срезы подвергали ретривизации инкубацией в 0,1% растворе трипсина при 37 °С в течение 30 мин. После инкубации с Novocastra™ Peroxidase Block, Novocastra™ Protein Block, оптимально разведенными первичными антителами к коллагену человека II типа, вторичными антителами и Novocastra™ Concentrated Streptavidin-HRP, срезы каждый раз дважды промывали в течение 5 мин раствором 0,5 М трис-буфера, pH = 7,6 (Sigma, США). Затем срезы промывали дистиллированной водой, докрашивали Novocastra™ Hematoxylin (RE7107, Leica Microsystems), проводили по восходящим концентрациям этанола, инкубировали с ксилолом и заключали в канадский бальзам. Реакция с пероксидазой вызывает видимый коричневый осадок в области местоположения антигена.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Хондрогенная дифференцировка МСК ЖТч в 3D-культуре

Через 5 суток в хондрогенной среде МСК ЖТч образовывали трехмерные структуры в виде непрозрачных микросфер диаметром ~ 1 мм. Гистологическая оценка полученных структур показала, что микросферы на 5-е сутки дифференцировки имеют рыхлую неоформленную структуру и не дают специфического окрашивания по Маллори и альциановым синим на коллаген и ГАГ, соответственно. Уже через 7 суток дифференцировки периферия каждой микросферы представлена 1–2 слоями фибробластоподобных жизнеспособных клеток, появляются тонкие волокна коллагена и сине-зеленое окрашивание, характеризующее появление ГАГ во внеклеточном матриксе. Через 10 суток наблюдается прогрессивное врастание фибробластоподобных клеток внутрь микросфер и заполнение ими центральной части, заметное и явное увеличение коллагеновых волокон, а также ГАГ. Через 14 суток хондрогенной дифференцировки МСК ЖТч (рис. 1, а) наблюдается прогрессивное образование ГАГ (рис. 1, б), коллагена (рис. 1, в), в сферах появляются отдельные локусы, заполненные внеклеточным матриксом, синтезированном клетками, составляющими микросферу. Матрикс в поверхностной зоне представлен пучками коллагеновых волокон, расположенных параллельно поверхности микросферы, что характерно для нормальной хрящевой ткани. Иммуногистохимическое окрашивание антителами показало, что коллагеновые волокна в микросферах являются коллагеном II типа – основной тип коллагена хрящевой ткани (рис. 1, г).

Морфологические изменения КИК ХТ

Через 14 суток дифференцировки МСК ЖТч, послойно смешанных с матриксом *Сферо*®ГЕЛЬ, наблюдали образование трехмерных структур размером ~ 6 мм. Результаты гистологической оценки полученных структур показали, что через 14 дней в толще биополимерного матрикса присутствуют клетки с различными морфологическими характеристиками: фибробластоподобные с вытянутым ядром и овальные с округлым ядром (рис. 2, а); точно установить тип клеток затруднительно. Показано образование собственного внеклеточного матрикса, имеющего волокнистую структуру, коллагеновая природа которой подтверждается при специфическом окрашивании по методу Маллори (рис. 2, б). Через 28 суток количество клеток овальной формы с округлым ядром в срезах значительно увеличивается, клеточная популяция становится более однородной, встречаются хондробластоподобные клетки. Обнаружено заметное увеличение количества внеклеточного матрикса, вырабатываемого клетками в процессе культивирования. Собственный внеклеточный матрикс имеет волокнистую структуру (рис. 3, а, б).

К сожалению, на сроках 14 и 28 суток нам не удалось выявить наличие коллагена II типа в полученных конструкциях, возможно, вследствие недостаточного количества клеток или слишком малого времени дифференцировки. К 42-м суткам хондрогенной дифференцировки наблюдали продолжение увеличения клеточной массы, прорастание клеток в толщу матрикса *Сферо*®ГЕЛЬ и увеличение количества внеклеточного матрикса, вырабатываемого клетками. Наблюдали спонтанное образование сфероподобных структур, сходных с микросферами, полученными из МСК ЖТч в 3D-культуре (рис. 3, в, г). Также было обнаружено цитоплазматическое окрашивание клеток антителами к коллагену человека II типа, что может говорить о начале синтеза клетками коллагена II типа (рис. 4).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, показано, что образующиеся в процессе культивирования КИК ХТ трехмерные структуры, состоящие из дифференцированных в хондрогенном направлении МСК ЖТч, начинают продуцировать компоненты собственного внеклеточного матрикса. Это свидетельствует о начальных стадиях формирования ТИК ХТ в условиях *in vitro*. Можно предположить, что на более поздних

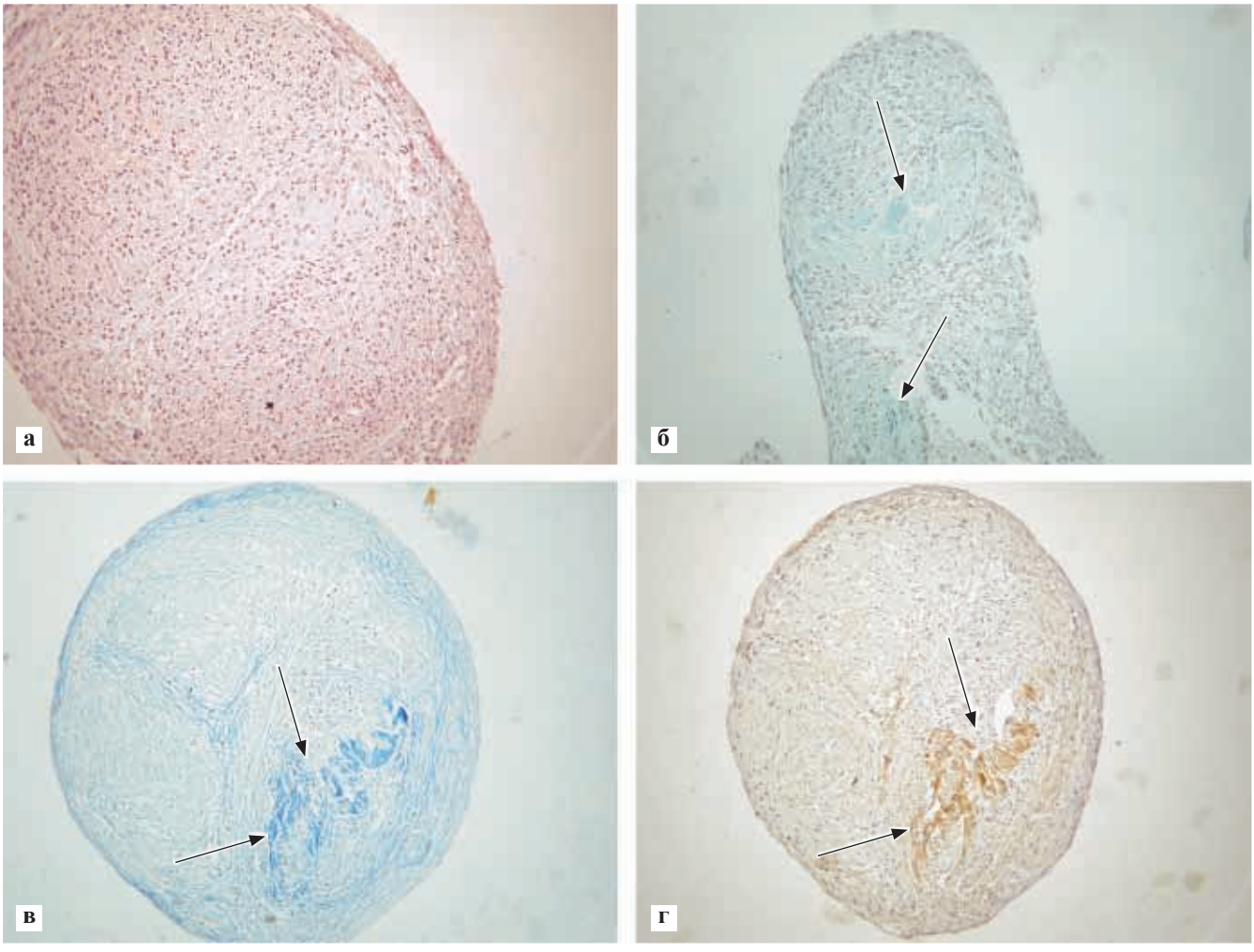

Рис. 1. Хондрогенная дифференцировка МСК ЖТч в 3-D-культуре (микросферы), 14 дней: а – окрашивание гематоксилином и эозином; б – окрашивание альциановым синим на гликозаминогликаны (указано стрелками); в – окрашивание на коллаген по методу Маллори (указано стрелками); г – иммуногистохимическое окрашивание антителами к коллагену человека II типа (указано стрелками). ×200

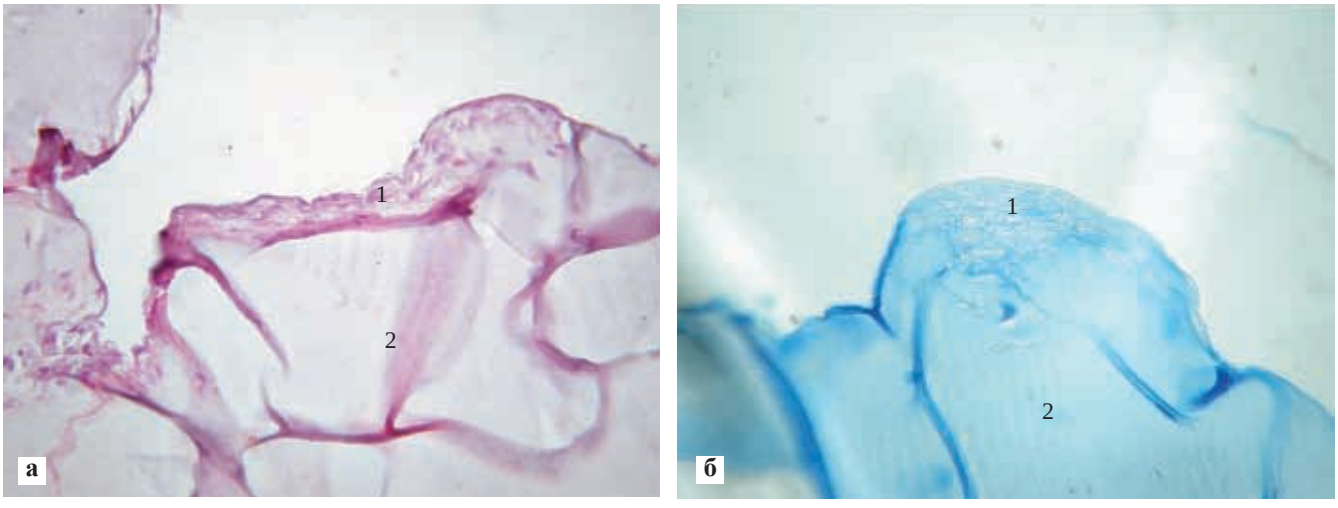

Рис. 2. ТИК ХТ, 14 дней: а – окрашивание гематоксилином и эозином; б – окрашивание по методу Маллори; 1 – МСК ЖТч; 2 – биополимерный матрикс *Сферо*®ГЕЛЬ. ×400

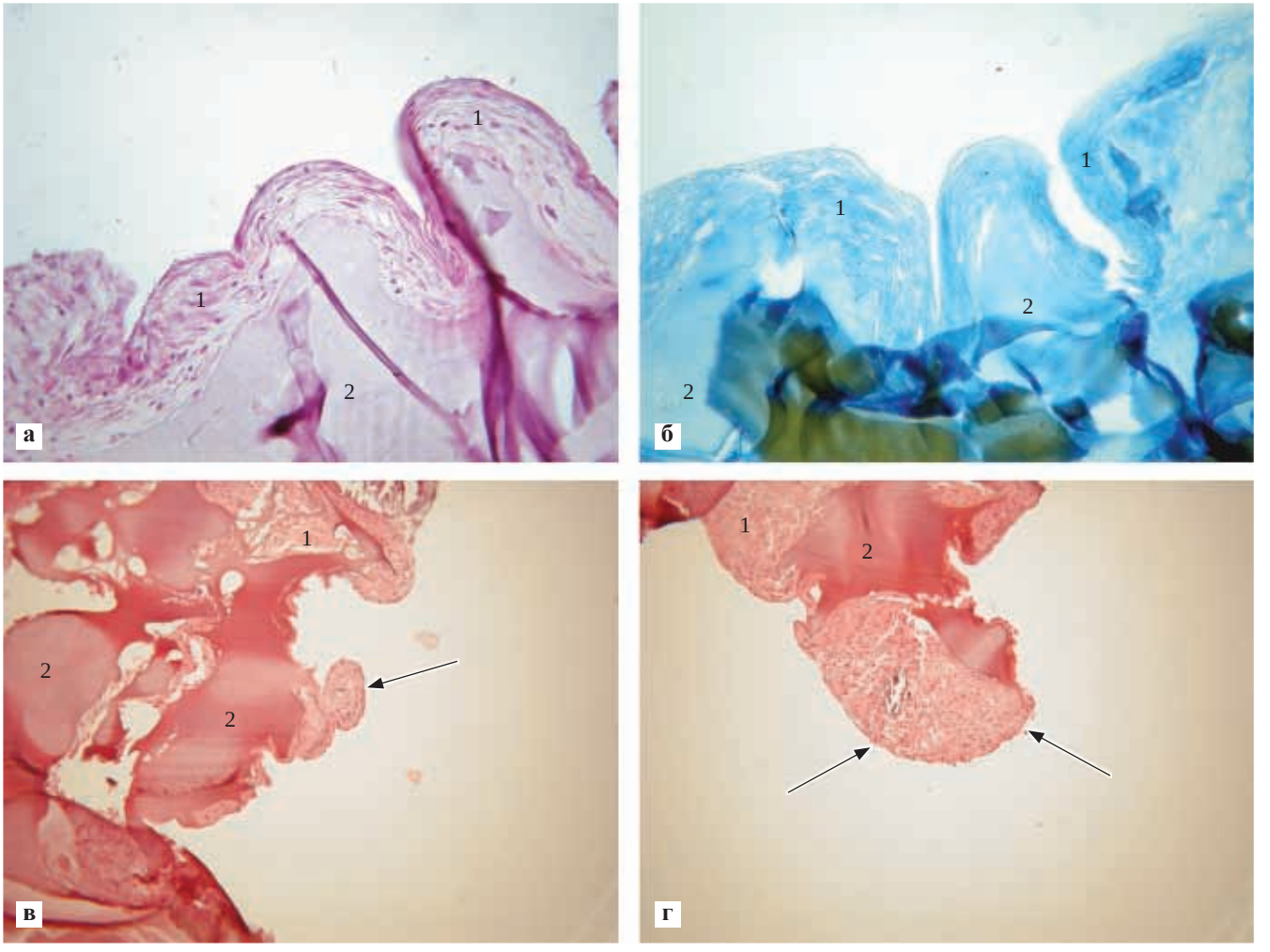

Рис. 3. ТИК ХТ: a – 28 дней хондрогенной дифференцировки. Окрашивание гематоксилином и эозином. B – 28 дней хондрогенной дифференцировки. Окрашивание по методу Маллори. C, D – 42 дня хондрогенной дифференцировки. Окрашивание гематоксилином и эозином. Микросфероподобные структуры указаны стрелками; 1 – МСК ЖТч; 2 – биополимерный матрикс *Сферо*®ГЕЛЬ. ×200

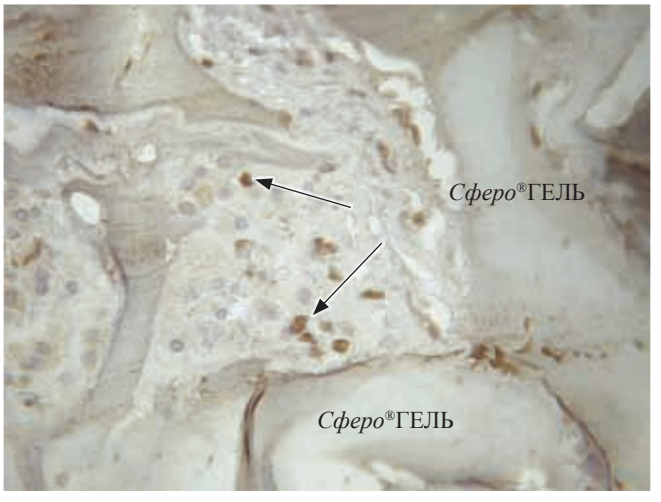

Рис. 4. ТИК ХТ, 42 дня хондрогенной дифференцировки. Иммуногистохимическое окрашивание антителами к коллагену человека II типа (указано стрелками). ×1000

сроках внеклеточный матрикс ТИК ХТ начнет постепенно замещать резорбирующийся биополимерный матрикс *Сферо*®ГЕЛЬ с образованием хрящевой ткани.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Melero-Martin J.M., Al-Rubeai M.* In vitro expansion of chondrocytes. *Topics in Tissue Engineering*. 2007; 3: 37.
2. *Мазуров В.И.* Болезни суставов. СПб.: «СпецЛит», 2008: 27–31.
3. *Drakos M.C., Allenin A.A.* Nonoperative Treatment Options for Symptomatic Cartilage Lesions. Williams R.J., editor. Cartilage repair strategies. Totowa, New Jersey: Humana Press, 2007: 55–68.
4. *Деев Р.В.* Анализ рынка клеточных препаратов для коррекции патологии скелетных тканей. *Клеточная трансплантология и тканевая инженерия*. 2006; 2 (4): 78–83.

5. *Solomon D.J., Williams R.J., Warren R.F.* Marrow Stimulation and Microfracture for the Repair of Articular Cartilage Lesions. Williams R.J., editor. Cartilage repair strategies. Totowa, New Jersey: Humana Press, 2007: 69–84.
6. *Miniaci A., Jambor C., Petrigliano F.A.* Autologous Osteochondral Transplantation. Williams RJ, editor. Cartilage repair strategies. Totowa, New Jersey: Humana Press, 2007: 105–114.
7. *Redman S.N., Oldfield S.F., Archer C.W.* Current strategies for articular cartilage repair. *European Cells and Materials*. 2005; 9: 23–32.
8. *Jones D.G., Peterson L.* Autologous Chondrocyte Implantation. Williams R.J., editor. Cartilage repair strategies. Totowa, New Jersey: Humana Press, 2007: 137–166.
9. *Marlovits S., Hombauer M., Truppe M., Vecsei V., Schlegel W.* Changes in the ratio of type-I and type-II collagen expression during monolayer culture of human chondrocytes. *J. Bone Joint Surg*. 2004; 86B (2): 286–295.
10. *Mehlhorn A.T., Schmal H., Kaiser S., Lepski G., Finkenzeller G., Stark G.B., Sudkamp N.P.* Mesenchymal Stem Cells Maintain TGF-b-Mediated Chondrogenic Phenotype in Alginate Bead Culture. *Tissue Engineering*. 2006; 12 (6): 1393–1403.
11. *Danišovič Ľ., Lesný P., Havlas V., Teyssler P., Syrová Z., Kopáni M., Fujeríková G., Trč T., Syková E., Jendelová P.* Chondrogenic differentiation of human bone marrow and adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. *Applied Biomedicine*. 2007; 5: 139–150.
12. *Zuk P.A., Zhu M., Mizuno H., Huang J., Futrell W., Katz A.J., Benhaim P., Lorenz P., Hedrik M.H.* Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue engineering*. 2001; 17: 211–228.
13. *Егорова В.А., Пономарева А.С., Богданова Н.Б., Абрамов В.Ю., Севастьянов В.И.* Характеристика фенотипа МСК из жировой ткани человека методом проточной цитометрии. *Технологии живых систем*. 2009; 5: 40–46.
14. *Севастьянов В.И., Перова Н.В., Немец Е.А., Сургученко В.А., Пономарева А.С.* Примеры экспериментально-клинического применения биосовместимых материалов в регенеративной медицине. В книге: Биосовместимые материалы (учебное пособие) / Под ред. В.И. Севастьянова и М.П. Кирпичникова. М.: Изд-во «МИА», 2011; II (3): 237–252.
15. *Chung C., Burdick J.A.* Engineering Cartilage Tissue, Adv. Drug. Deliv. Rev. 2008; 60 (2): 243–260.

REFERENCES

1. *Melero-Martin J.M., Al-Rubeai M.* In vitro expansion of chondrocytes. *Topics in Tissue Engineering*. 2007; 3: 37.
2. Mazurov V.I. Joint diseases. SPb.: «SpetsLit», 2008: 27–31 (in rus).
3. *Drakos M.C., Allenin A.A.* Nonoperative Treatment Options for Symptomatic Cartilage Lesions. Williams R.J., editor. Cartilage repair strategies. Totowa, New Jersey: Humana Press, 2007: 55–68.
4. *Deev R.V.* Market analysis of cell substances for skeletal tissue pathologies correction. *Kletochnaja transplantologija i tkanevaja inzhenerija*. 2006; 2 (4): 78–83. (in rus).
5. *Solomon D.J., Williams R.J., Warren R.F.* Marrow Stimulation and Microfracture for the Repair of Articular Cartilage Lesions. Williams R.J., editor. Cartilage repair strategies. Totowa, New Jersey: Humana Press, 2007: 69–84.
6. *Miniaci A., Jambor C., Petrigliano F.A.* Autologous Osteochondral Transplantation. Williams RJ, editor. Cartilage repair strategies. Totowa, New Jersey: Humana Press, 2007: 105–114.
7. *Redman S.N., Oldfield S.F., Archer C.W.* Current strategies for articular cartilage repair. *European Cells and Materials*. 2005; 9: 23–32.
8. *Jones D.G., Peterson L.* Autologous Chondrocyte Implantation. Williams R.J., editor. Cartilage repair strategies. Totowa, New Jersey: Humana Press, 2007: 137–166.
9. *Marlovits S., Hombauer M., Truppe M., Vecsei V., Schlegel W.* Changes in the ratio of type-I and type-II collagen expression during monolayer culture of human chondrocytes. *J. Bone Joint Surg*. 2004; 86B (2): 286–295.
10. *Mehlhorn A.T., Schmal H., Kaiser S., Lepski G., Finkenzeller G., Stark G.B., Sudkamp N.P.* Mesenchymal Stem Cells Maintain TGF-b-Mediated Chondrogenic Phenotype in Alginate Bead Culture. *Tissue Engineering*. 2006; 12 (6): 1393–1403.
11. *Danišovič Ľ., Lesný P., Havlas V., Teyssler P., Syrová Z., Kopáni M., Fujeríková G., Trč T., Syková E., Jendelová P.* Chondrogenic differentiation of human bone marrow and adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. *Applied Biomedicine*. 2007; 5: 139–150.
12. *Zuk P.A., Zhu M., Mizuno H., Huang J., Futrell W., Katz A.J., Benhaim P., Lorenz P., Hedrik M.H.* Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue engineering*. 2001; 17: 211–228.
13. *Egorova V.A., Ponomareva A.S., Bogdanova N.B., Abramov V.Ju., Sevastianov V.I.* Characterization of human adipose-derived stem cells phenotype by flow cytometry. *Tehnologii zhivyh sistem*. 2009; 5: 40–46 (in rus).
14. *Sevastianov V.I., Perova N.V., Nemec E.A., Surguchenko V.A., Ponomareva A.S.* Examples of experimental and clinical use of biocompatible materials in regenerative medicine / Sevastianov V.I. and Kirpichnikov M.P., editors. Biosovmestimje materialy (Uchebnoe posobie). M.: «MIA», 2011; II (3): 237–252 (in rus).
15. *Chung C., Burdick J.A.* Engineering Cartilage Tissue, Adv. Drug. Deliv. Rev. 2008; 60 (2): 243–260.