

DOI: 10.15825/1995-1191-2016-4-102-122

# ТЕХНОЛОГИИ ТКАНЕВОЙ ИНЖЕНЕРИИ И РЕГЕНЕРАТИВНОЙ МЕДИЦИНЫ В ЛЕЧЕНИИ ДЕФЕКТОВ ХРЯЩЕВОЙ ТКАНИ СУСТАВОВ

*Ю.Б. Басок<sup>1, 2</sup>, В.И. Севастьянов<sup>1</sup>*<sup>1</sup> ФГБУ «Федеральный научный центр трансплантологии и искусственных органов имени академика В.И. Шумакова» Минздрава России, Москва, Российская Федерация<sup>2</sup> АНО «Институт медико-биологических исследований и технологий», Москва, Российская Федерация

Важнейшими проблемами здравоохранения в индустриальном обществе являются повреждение и дегенерация суставного хряща, что связано с ограниченными возможностями ткани к регенерации. В обзоре подробно описаны существующие и разрабатываемые технологии восстановления и замещения поврежденных хрящевых тканей суставов. Дан анализ полученных результатов по двум основным направлениям: стимулирование регенерации поврежденной хрящевой ткани и выращивание элементов хрящевой ткани в биореакторах.

*Ключевые слова:* суставной хрящ, клеточно- и тканеинженерные конструкции, регенеративная медицина, биореакторы.

## TISSUE ENGINEERING AND REGENERATIVE MEDICINE TECHNOLOGIES IN THE TREATMENT OF ARTICULAR CARTILAGE DEFECTS

*Yu.B. Basok<sup>1, 2</sup>, V.I. Sevastianov<sup>1</sup>*<sup>1</sup> V.I. Shumakov Federal Research Center of Transplantology and Artificial Organs of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Moscow, Russian Federation<sup>2</sup> ANO «Institute of Biomedical Research and Technology», Moscow, Russian Federation

Some of the most pressing health problems of the industrial society are the damage and degeneration of articular cartilage associated with the limited capacity of tissues to regenerate. The review describes the existing and developing technologies for the recovery and replacement of damaged joint cartilage tissue. The results obtained are analyzed covering two major areas: the stimulation of regeneration of damaged cartilage tissue and the growing of cartilage tissue elements in bioreactors.

*Key words:* articular cartilage, cell and tissue-engineering, regenerative medicine, bioreactors.

### ВВЕДЕНИЕ

Болезни, связанные с поражением хрящевой ткани сустава – важнейшая проблема здравоохранения, особенно в странах с высокой продолжительностью жизни.

Выделяют три типа хрящевой ткани (эластический, волокнистый и гиалиновый), различающиеся по биохимическому составу и структуре внеклеточного матрикса (ВКМ), определяющих механические свойства и локализацию этого вида соединительной ткани в организме [1].

Наиболее распространённым в организме является третий тип – гиалиновый хрящ с его уникальными механическими и функциональными свойствами [2, 3], что обусловлено его особой структурой – переплетенными волокнами коллагена II типа в комбинации с высоким содержанием протеогликанов. Гиалиновый хрящ участвует в образовании наружного носа, трахеи, бронхов и большинства суставов. Суставной хрящ взрослого человека имеет ограниченные возможности восстановления как после дегенеративных и ревмати-

**Для корреспонденции:** Басок Юлия Борисовна. Адрес: 123182, Москва, ул. Щукинская, д. 1.  
Тел. (499) 193-86-62. E-mail: bjb2005@mail.ru.

**For correspondence:** Basok Yulia Borisovna. Address: 1, Shchukinskaya st., Moscow, 123182, Russian Federation.  
Tel. (499) 193-86-62. E-mail: bjb2005@mail.ru

ческих заболеваний, так и после травматических повреждений [4]. В настоящее время в широкой клинической практике надежных методов лечения поврежденных суставных хрящей, обеспечивающих длительный терапевтический эффект, нет.

Описанная ситуация явилась движущей силой многочисленных исследований по разработке новых подходов к восстановлению поврежденных хрящевых тканей, в том числе основанных на использовании технологий тканевой инженерии и регенеративной медицины [5].

Отсутствие кровоснабжения и низкий уровень метаболизма из-за малого количества клеток в единице объема ткани приводят к тому, что полноценная репаративная регенерация суставного хряща возможна лишь при небольших по площади повреждениях [6].

Известен ряд хирургических методов для восстановления поврежденных хрящевых тканей суставов (табл. 1) [5, 7–14].

Целью данного обзора является анализ состояния и перспектив исследований, направленных на разработку и экспериментально-клиническое применение клеточно- и тканеинженерных конструкций для восстановления поврежденного суставного хряща или полной его замены.

## ТЕХНОЛОГИИ ВОССТАНОВЛЕНИЯ И ЗАМЕЩЕНИЯ ПОВРЕЖДЕННЫХ ХРЯЩЕВЫХ ТКАНЕЙ

Существует два основных подхода к использованию клеточно- или тканеинженерных конструкций (КИК и ТИК соответственно), относящихся к био-

медицинским клеточным продуктам, для лечения различных патологических состояний хрящевой ткани. В обоих случаях для создания КИК хрящевой ткани клеточный компонент предварительно культивируют *in vitro* на трехмерном биорезорбируемом/биodeградируемом матриксе (рис. 1 и 2).

Один из подходов – стимулирование регенерации поврежденного хряща путем имплантации *in situ* КИК хрящевой ткани, состоящей из биорезорбируемого матрикса, аутологичных хондроцитов (АХ) и/или стволовых клеток, а также индукционной хондрогенной среды, содержащей необходимые сигнальные биомолекулы (рис. 1).

Второй подход заключается в формировании ТИК хряща в биореакторе (рис. 2), обеспечивающей *in vitro* необходимые условия (микроокружение, ниша) для жизнедеятельности, дифференцировки и пролиферации для клеточной компоненты КИК хрящевой ткани. Полученные в биореакторе ТИК хрящевой ткани при необходимости моделируют с последующей имплантацией пациенту для полной или частичной замены поврежденного хряща.

При использовании КИК хрящевой ткани для стимулирования регенерации поврежденного хряща основная функция матрикса сводится к доставке и удержанию клеток в месте повреждения хряща, а также обеспечению клеткам условий для их жизнедеятельности в течение времени, достаточного для запуска процессов восстановления хрящевой ткани.

При создании КИК хряща в биореакторе матрикс играет роль временного искусственного внеклеточного матрикса, обеспечивающего вместе с сигналь-

Таблица 1

### Хирургические методы для восстановления поврежденных хрящевых тканей суставов

#### Surgical methods for repairing damaged articular cartilage

Методики	Особенности
Эндопротезирование	Наиболее часто используемая техника. Способ имеет такие недостатки, как ограниченный срок службы имплантата и многочисленные противопоказания (возраст и сопутствующие патологии)
Шейвинг	Основаны на стимуляции пролиферации мультипотентных мезенхимальных клеток-предшественников костного мозга субхондральной кости для формирования волокнистого хряща, значительно уступающего гиалиновому по механическим свойствам
Абразивная хондропластика	
Операция создания «микропереломов»	
Туннелизация субхондральной кости	
Трансплантация надкостницы	Методики непосредственного замещения хряща. В этом случае волокнистый хрящ образуется только на переходах. Аллотрансплантация снижает приживаемость трансплантата, а аутоотрансплантация ограничивается недостатком материала и требует биопсии, повреждающей здоровый хрящ
Трансплантация костно-хрящевых аллотрансплантатов	
Мозаичная хондропластика	
Аутоотрансплантация хряща	Свойства созданной таким способом хрящевой ткани определяются многими параметрами, в том числе источником клеток, типом скаффолда для прикрепления клеток, методом посева клеток, составом культуральной среды, доступом питательных веществ, факторами дифференцировки и механической стимуляцией
Способы лечения с использованием технологий тканевой инженерии и регенеративной медицины	

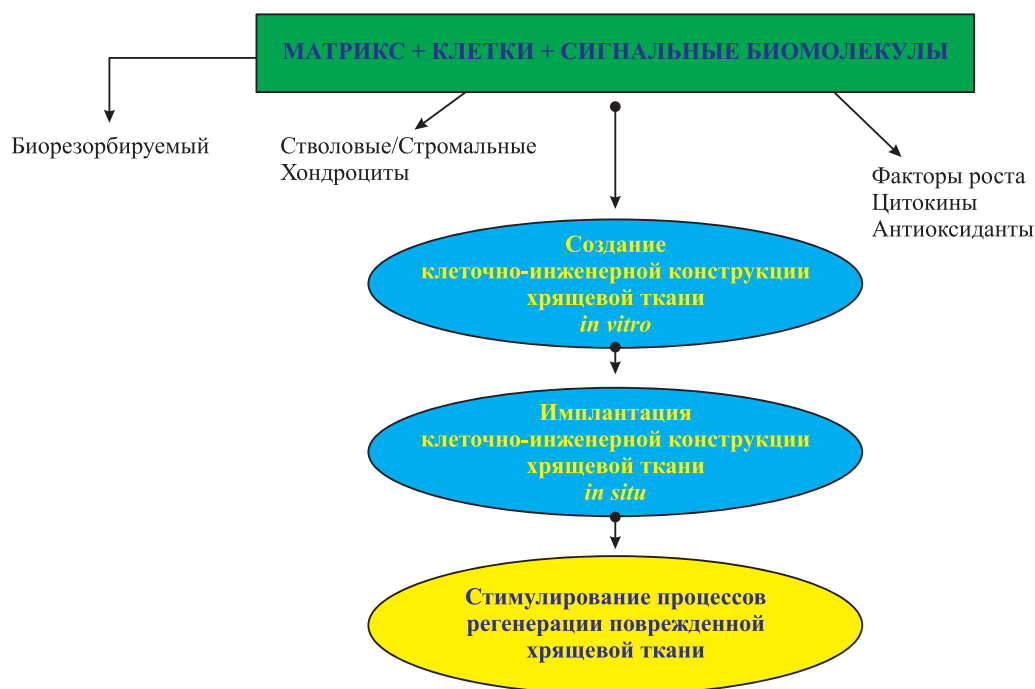
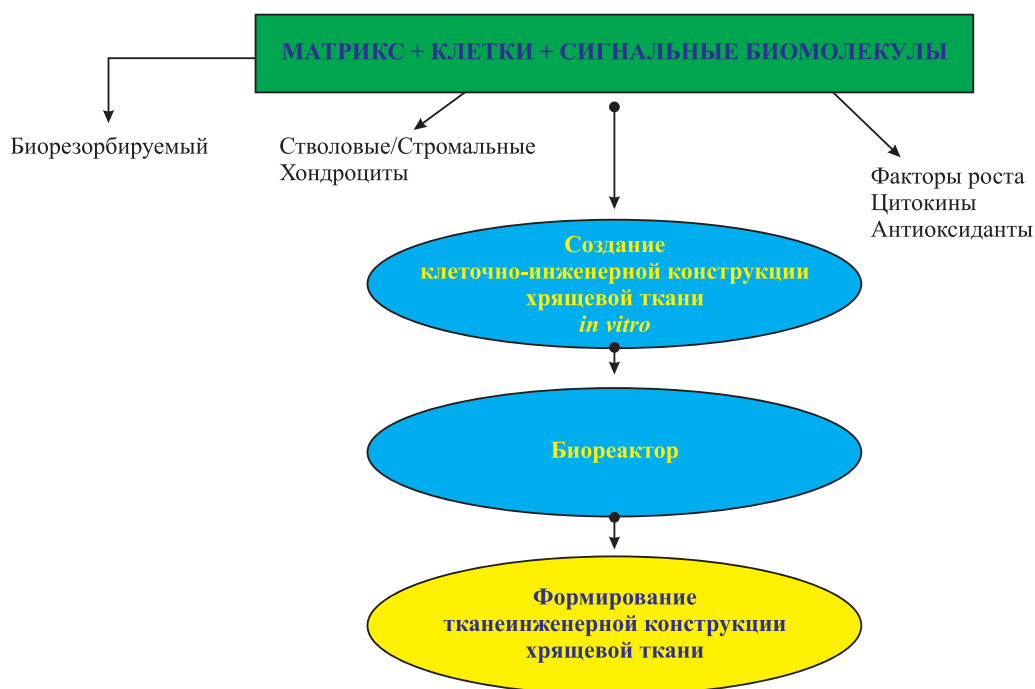
Рис. 1. Клеточно-инженерная конструкция для регенерации поврежденной хрящевой ткани *in situ* [51]Fig. 1. Cell-engineered construct for the regeneration of damaged cartilage tissue *in situ* [51]

Рис. 2. Формирование тканеинженерной конструкции из клеточно-инженерной конструкции в биореакторе [51]

Fig. 2. Formation of cell-engineered construct from tissue-engineered construct in bioreactor [51]

ными биомолекулами необходимые условия как для пролиферации и дифференцировки стволовых клеток, так для синтеза дифференцированных клеток собственного внеклеточного матрикса (ВКМ).

Рассмотрим имеющиеся результаты по этим двум направлениям.

## 1. Технологии стимулирования регенерации поврежденной хрящевой ткани

В связи с ограниченными возможностями восстановления суставного хряща взрослого человека практически все работы по стимулированию про-

цессов регенерации поврежденной хрящевой ткани направлены именно на разработку способов лечения заболеваний суставов [4].

Остеоартроз (ОА) – заболевание периферических и/или центральных (позвоночных) суставов с деструкцией суставного хряща и дегенеративными изменениями в эпифизах сочленяющихся костей, с формированием субхондральных костных кист и краевых костных разрастаний [15]. В основе заболевания лежит изнашивание, истончение и гибель суставного хряща с выпадением его амортизационной функции. Заболеваемость ОА в России занимает лидирующее место среди болезней суставов и наблюдается практически во всех возрастных группах [15]. Распространенность ОА в нашей стране составляет более 20 на 1000 населения в возрастной группе от 18 лет и старше. Ежегодно в России регистрируется около 600 тыс. новых случаев ОА. Прогнозируют, что к 2020 г. встречаемость ОА в по-

пуляции может достичь 57%. При этом наблюдается тенденция роста заболеваемости за счет возрастной группы моложе 45 лет. В настоящее время в широкой клинической практике надежных методов лечения ОА, обеспечивающих длительный терапевтический эффект, нет.

Описанная ситуация явилась движущей силой многочисленных исследований по разработке новых подходов к лечению дефектов хрящевых тканей, основанных на использовании технологий тканевой инженерии и регенеративной медицины [5].

В последнее время для лечения дефектов хрящевой ткани суставов разработан ряд биомедицинских клеточных продуктов, представляющих собой либо суспензию клеток, как правило, аутологичных хондроцитов (АХ), либо КИК, состоящих из АХ на биodeградируемом носителе (*синонимы*: матрикс, скаффолд) разнообразной природы (табл. 2) [16–19].

Таблица 2

### Характеристика основных биомедицинских клеточных продуктов для лечения дефектов хрящевой ткани

#### Characteristics of the main biomedical cell products for treatment of defects of cartilage

Название продукта	Компания-изготовитель, страна	Описание продукта	Фаза клинического внедрения
Carticel®	Genzyme corp., США	АХ	Широкое клиническое использование
MACI®		Мембрана из животного коллагена I типа с АХ	III фаза клинических испытаний
Chondrogen®	Osiris Therapeutics Inc., США	МСК	II фаза клинических испытаний
MACI®Chondro-gide®	Genzyme Biosurgery, Дания	Двухслойная мембрана из свиного коллагена I и III типа с АХ	Широкое клиническое использование
NeoCart™	Histogenics, США	АХ, культивированные в биореакторе с коллагеном I типа	Широкое клиническое использование
Cartipatch®	Tissue Bank of France, Франция	Растительный гидрогель из агарозы и альгината с АХ	Широкое клиническое использование
ChondroCelect®	Tigenix N.V., Бельгия	АХ	III фаза клинических испытаний
Chondron™	SewonCellontech, Корея	Фибриновый гель с АХ	Широкое клиническое использование
BioSeed®-C	Bio Tissue Technologies GmbH, Германия, Швейцария, Италия	Матрикс на основе сополимера полигликолевой/полимолочной кислоты с полидиоксаном, содержащий АХ	Широкое клиническое использование
CaReS	Arthro Kinetics, Германия	Матрикс из коллагена I типа, полученного из крысиных хвостов с АХ	Широкое клиническое использование
DeNovo-NT	Zimmer Biomet, США	Измельченный ювенильный аллогенный хрящ и фибриновый клей с АХ	Широкое клиническое использование
ARTROcell 3D®	co.don® AG, Германия	АХ	Клиническое использование
Cartilink™-1	Interface Biotech A/S, Дания	АХ	Клиническое использование
Cartilink™-2		Пересадка АХ, закрытых коллагеновой мембраной	Клиническое использование
NOVOCART™	Tetec Tissue Engineering Technologies AG Германия	АХ	Клиническое использование
NOVOCART™3D		Матрикс из коллагена и хондроитинсульфата и АХ	Клиническое использование

Заметим, что свойства созданной с помощью клеточных технологий хрящевой ткани определяются многими параметрами, в том числе источником клеток, типом скаффолда для прикрепления клеток, методом посева клеток, составом культуральной среды, доступом питательных веществ, факторами дифференцировки и механической стимуляцией [20, 21].

В зависимости от медицинских показаний возможно использование хондроцитов, мультипотентных мезенхимальных стволовых клеток (ММСК) из различных источников (в основном из костного мозга (КМ) и жировой ткани (ЖТ)), клеток-предшественников из надкостницы и надхрящницы или генетически-модифицированных клеток [22–25].

Методы клеточной трансплантации и матричной (на носителе) имплантации АХ не лишены недостатков [26, 27]. Основными из них являются травматичность биопсии здорового участка хряща и возможность дедифференцировки хондроцитов в условиях *in vitro*, включая фибробластоподобную перестройку. Кроме того, трансплантированные в суспензии или имплантированные на матриксе АХ часто формируют волокнистый, а не гиалиновый хрящ, что приводит только к частичному восстановлению хрящевой ткани. Известно, что культивируемые в монослое хондроциты имеют тенденцию вырабатывать преимущественно коллаген I типа и терять способность образовывать внеклеточный матрикс (ВКМ) [28, 29]. В связи с этим в качестве альтернативы исследуется вариант замены АХ на ММСК, которые обладают мультилинейным потенциалом дифференцировки в адипогенном, остеогенном и хондрогенном направлениях [30, 31].

В последнее время для получения эквивалента хрящевой ткани разрабатывают КИК с применением биodeградируемых трехмерных полимерных матриксов различной природы в виде гидрогелей, губок или волокнистых сеток [32, 33]. Отметим, что благодаря сходной с природным ВКМ структурой большой интерес представляют полученные методом электроспиннинга скаффолды, образованные из полимерных нано- и микроволокон [34, 35]. Среди природных полимеров для изготовления матриксов можно выделить коллаген I и II типа, гиалуроновую кислоту, фибрин, альгинат, желатин и хитозан [32]. Показано, что скаффолды на основе коллагена и гиалуроновой кислоты поддерживают хондрогенную дифференцировку стволовых клеток [30, 36].

Наибольший, с нашей точки зрения, интерес представляют собой матриксы из многокомпонентных гидрогелей, получаемых из внеклеточного матрикса тканей сельскохозяйственных животных, и относящихся к так называемым биомиметикам ВКМ, обеспечивающих сходные с ВКМ микроокружение для роста клеток [37]. К таким биомиметикам ВКМ

относится биополимерный микроструктурированный коллагенсодержащий гидрогель (БМКГ-матрикс) – многокомпонентный продукт из природных соединений [38]. Функциональная эффективность БМКГ-матрикса была доказана, например, при лечении гонартроза и травматических повреждениях периферических нервов [39, 40].

Схожими биостимулирующими свойствами обладают матриксы, полученные из натурального хряща физическими и химическими методами децеллюляризации [41, 42]. Таким образом, естественный матрикс хряща может служить временным каркасом и одновременно быть стимулом для тканевой регенерации [43]. Предполагается, что создание композитного скаффолда из децеллюляризованного хряща и биоматериала может повысить биомеханическую прочность ткани [44].

Кроме природных полимеров для создания КИК привлекают биodeградируемые синтетические трехмерные матриксы на основе полимолочной, полигликолевой кислот, полиэтиленоксида, полиангидрида и олиго-поли(этиленгликоль)-фумарата, PuraMatrix™ – гидрогеля на основе синтетических пептидов и т. д. [45, 46]. Также применяют синтетические матриксы из полимолочной и полигликолевой кислот. Важным параметром скаффолдов для ТИК является их пористость [47].

Таким образом, одним из перспективных подходов к лечению ОА является стимулирование восстановительных процессов поврежденного суставного хряща путем введения *in situ* биомедицинского клеточного продукта в виде КИК хрящевой ткани, включающей в себя следующие компоненты [48, 49]:

- биodeградируемый биополимерный матрикс с биостимулирующими свойствами, выполняющий роль временного биоискусственного внеклеточного матрикса;
- ММСК, выделенные из эндогенных источников у пациента (аутологичные клетки) или от доноров (аллогенные клетки) и способные формировать функционирующий ВКМ;
- биоактивные молекулы (цитокины, факторы роста), стимулирующие пролиферативный и дифференцировочный потенциал ММСК.

В серии проведенных экспериментальных исследований было показано, что биологически безопасным и эффективным для стимуляции регенерации поврежденного суставного хряща является использование КИК хрящевой ткани человека, состоящей из биомедицинского коллагенсодержащего матрикса в виде геля, аллогенных ММСК ЖТ человека и индукционной хондрогенной среды [50, 51].

Исследование функциональной эффективности КИК хрящевой ткани человека для регенерации суставного хряща было проведено на эксперименталь-



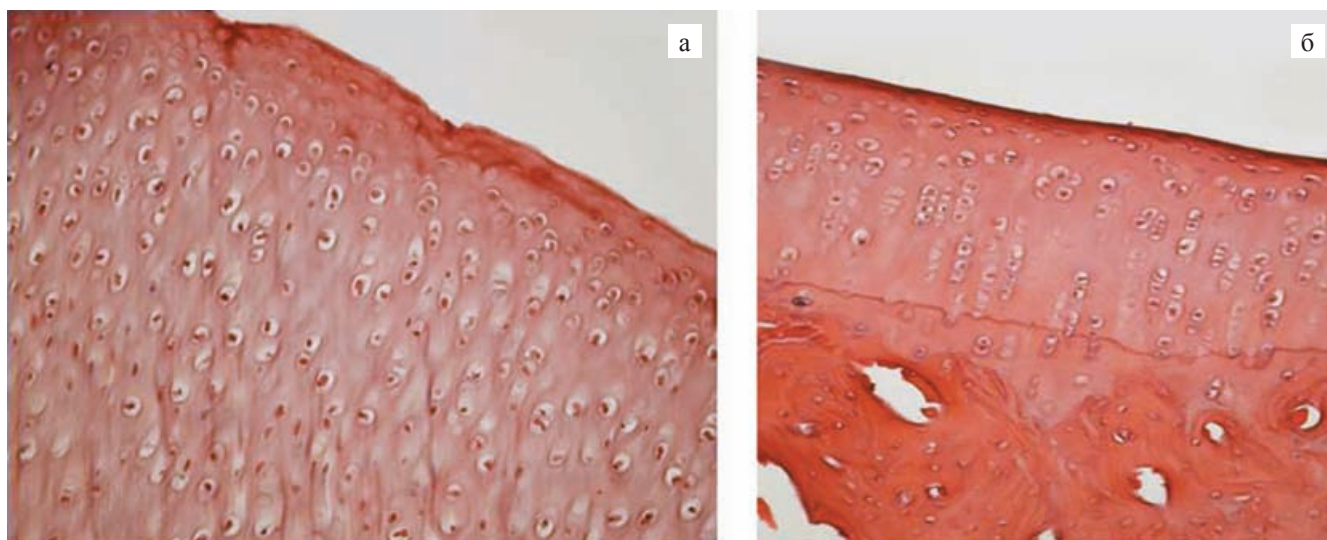


Рис. 3. Гистологическая структура хряща суставов большой берцовой кости кролика на экспериментальной модели ОА на 120-е сутки от начала эксперимента: а – правый коленный сустав через 90 суток после моделирования ОА (отрицательный контроль); б – левый коленный сустав через 90 суток после моделирования ОА и 60 суток после внутрисуставного введения КИК ХТч. Окраска – гематоксилин и эозин.  $\times 200$  [52]

Fig. 3. The histological structure of the cartilage in the joints of the tibia in the rabbit experimental model of OA 120 days from the start of the experiment: а – the right knee joint after 90 days after modeling OA (negative control); б – left knee joint after 90 days after modeling OA and 60 days after cell-engineered construct of human cartilage intraarticular administration. Colouring with hematoxylin and eosin ( $\times 200$ ) [52]

ной модели адьювантного артрита (кролики-самки Советская шиншилла) с дальнейшим развитием в ОА в сочетании с клиническими, биохимическими, рентгенологическими и гистохимическими исследованиями (рис. 3) [52].

На 90-е сутки модели ОА обнаружено, что внутрисуставное введение описанного матрикса с МСК ЖТ человека в левый коленный сустав ( $n = 3$ ) через 30 суток после моделирования ОА (рис. 3, б), в отличие от правого сустава (отрицательный контроль,  $n = 3$ ), рис. 3, а, стимулирует процессы восстановления структуры хрящевой ткани. Наблюдается формирование «колонок» хондроцитов, появление во внутриклеточном матриксе изогенных групп и восстановление его структуры. Можно предположить, что регенерационная активность КИК хрящевой ткани человека обусловлена их активирующим действием на процессы миграции стволовых клеток из окружающих тканей в зону поражения с последующей их дифференцировкой. Заметим, по данным рентгенологических исследований нельзя было судить ни о динамике развития ОА коленных суставов, ни о процессах репаративной регенерации гиалинового хряща при внутрисуставном введении биомедицинского клеточного продукта КИК хрящевой ткани человека.

В литературе описаны методы тканевой инженерии хряща, не требующие скаффолда. В этом случае развитие новой ткани происходит лишь под действием гипоксии, факторов роста, связывающе-

го агента лизилоксидазы и биомеханической стимуляции, как правило, гидростатического давления [53–57].

Отметим, что технологии применения КИК хрящевой ткани как биомедицинского клеточного продукта для регенерации поврежденного суставного хряща не решает проблему создания биоискусственных хрящевых имплантатов для заместительной и реконструктивной хирургии.

Структурные особенности многокомпонентного ВКМ хряща позволяют ему выдерживать высокие нагрузки. Для формирования такой организации *in vitro* необходимы условия, включающие определенные механические воздействия, которые можно обеспечить только в специализированных устройствах – биореакторах [58].

## II. Выращивание элементов хрящевой ткани в биореакторах

Хрящевые составляющие опорно-двигательного аппарата человека подвергаются воздействию биомеханических сил, таких как направленное сжатие, растяжение, сила сдвига, гидростатическое давление, электрический градиент и изменение pH [59]. Динамические процессы, происходящие в хряще под действием описанных факторов, являются не только результатом структурных и химических свойств ткани, но и определяют ее морфологические особенности.

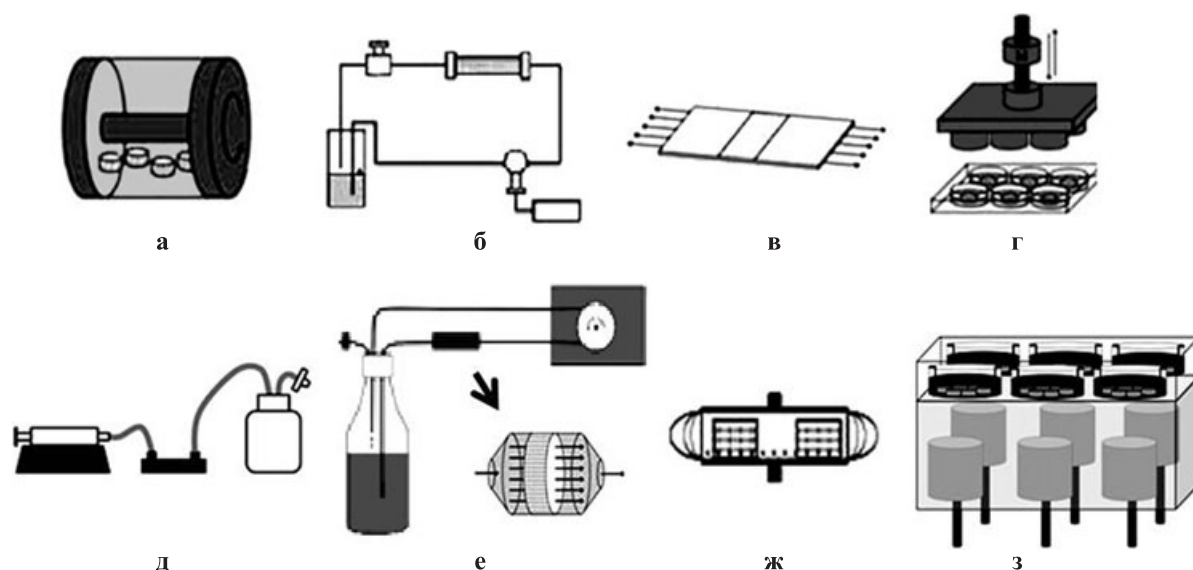


Рис. 4. Основные типы биореакторов [63, 64]: а – система, включающая вращающийся сосуд; б – система, основанная на комбинации гидростатического давления и перфузии; в – система, основанная на растяжении; г – система, основанная на сжатии; д – незамкнутая система, основанная на перфузии; е – замкнутая система, основанная на перфузии; ж – система, основанная на воздействии электрического поля; з – система, основанная на воздействии ультразвука

Fig. 4. Basic types of bioreactors [63, 64]: а – system comprising a rotating vessel; б – system, based on the combination of hydrostatic pressure and perfusion; в – system, based on stretching; г – system, based on compression; д – open system, based on perfusion; е – closed system, based on perfusion; ж – system, based on the influence of an electric field; з – system, based on ultrasound

Биореакторы – аппараты, способные повысить качество хрящевых имплантатов за счет создания *in vitro* условий, максимально приближенных к естественным [60, 61]. В связи с этим описываемые устройства должны обеспечивать физиологическую нагрузку на хондроциты, а также, улучшить питание клеток, транспорт к ним газов и выведение продуктов обмена веществ [62]. Основные типы конструкций биореакторов приведены на рис. 4 [63, 64].

Большинство существующих биореакторов для создания хрящевой ткани основаны на имитации механических нагрузок в суставе *in vivo*. К ним относятся системы, основанные на действии силы сдвига, гидростатического давления, растяжения, сжатия, перфузии [63, 65]. Также созданы конструкции, в которых в качестве стимулов при культиви-

ровании КИК хрящевой ткани используют электрическое поле, ультразвук и центробежную силу. Кроме того, можно выделить системы, основанные на комбинации вышеперечисленных воздействий.

Несмотря на различия объектов исследования и режимов нагрузки, анализ литературных данных позволил выявить основные эффекты, обусловленные видом воздействия (табл. 3).

Культуры клеток обычно изучают в подобных системах для установления последствий описанных воздействий и подбора режимов работы, тогда как КИК культивируют уже в качестве функциональной замены ткани. Стандартные условия культивирования для хрящевой ткани: температура 37 °С, относительная влажность 90–100%, содержание в газовой смеси CO<sub>2</sub> – 5% и O<sub>2</sub> – 20%.

Имеющийся основной экспериментальный опыт применения биореакторов при создании ТИК суставного хряща суммирован в табл. 4.

Таблица 3

**Эффекты механической, ультразвуковой, электрической и магнитной стимуляции суставного хряща**

**The effects of mechanical, ultrasonic, electrical and magnetic stimulation of the articular cartilage**

Вид воздействия	Эффект
Механическая стимуляция	Увеличение синтеза гликоаминогликанов (ГАГ)
Ультразвуковая стимуляция	Увеличение синтеза ГАГ
Электрическая стимуляция	Увеличение синтеза ВКМ

#### **Системы, основанные на ультразвуке**

Исследовали воздействия ультразвука на человеческие ММСК КМ, заселенные на скаффолдах из простого полиуретана размером 5 × 2,5 мм и помещенные в биореактор. Было показано, что ультразвук с частотой 5,0 МГц увеличивает пролиферацию клеток, выработку ГАГ и уровень экспрессии хондроцит-специфических генов, в том числе SOX-9 [66, 67, 104, 105].

Таблица 4

**Биореакторы и КИК, используемые при создании ТИК суставного хряща**  
**Bioreactors and cell-engineering designs used in the creation of the articular cartilage**

Авторы	Тип биореактора	Тип клеток/ Вид культивирования	Природа скаффолда	Особенности
<b>Системы, основанные на ультразвуке</b>				
Thakurta et al. [66]	Система, основанная на ультразвуке	ММСК КМ человека/ трехмерная культура	Макропористый полиуретан на простом полиэфире (полиуретанмочевина)	
Subramanian et al. [67]	Система, основанная на ультразвуке	Бычьи хондроциты/ трехмерная культура	Хитозан	Частота ультразвука была равна 5 МГц. В устройстве одновременно культивировали 6 чашек с заселенными клетками скаффолдами
Thakurta et al. [64]	Система, основанная на ультразвуке	Бычьи хондроциты/ трехмерная культура	Полиуретан-поликарбонат, хитозан	Частота ультразвука была равна 5 МГц. В устройстве одновременно культивировали 6 чашек с заселенными клетками скаффолдами. Культивирование проводили в течение 21 суток
<b>Системы, основанные на применении силы сдвига</b>				
Wang et al. [68]	Система, основанная на применении силы сдвига	ММСК КМ/ трехмерная культура	Желатин с гиалуроновой кислотой	Культивирование проводили во вращающейся колбе. Длительность эксперимента составляла 21 сутки
Brown et al. [69]	Система, основанная на применении силы сдвига	Свиньи хондроциты/ трехмерная культура	Полигликолевая кислота	Культивирование проводили в биореакторе при перемешивании
Hu et al. [70]	Система, основанная на применении силы сдвига	Хондроциты/ трехмерная культура	Агароза; полигликолевая кислота	Культивирование проводили в биореакторе с вращающейся стенкой в течение 8 недель
Janjanin et al. [71]	Система, основанная на применении силы сдвига	ММСК КМ/ трехмерная культура	Нанонити из поли-L-молочной кислоты	Культивирование происходило в биореакторе с вращающейся колбой в течение 42 суток при постоянной скорости 30 rpm. Перед переносом в биореактор заселенные клетками скаффолды помещали в пропиленовые формы, содержащие силиконовый лист
Mellor et al. [72]	Система, основанная на применении силы сдвига	Хондроциты/ трехмерная культура	Альгинатные и микроноситель Sutoroge-2	Биореактор представлял собой вращающийся вокруг горизонтальной оси сосуд с неподвижной силиконовой мембраной для оксигенации и создания в среде с клетками турбулентности и низких сил сдвига. Культивирование проводили в течение 9 суток
Augst et al. [73]	Система, основанная на применении силы сдвига	ММСК КМ человека/ трехмерная культура	Фиброин шелка	Заселенные клетками конструкции культивировали во вращающемся биореакторе между внешним поликарбонатным цилиндром и внутренней силиконовой мембраной, обеспечивающей газообмен. Диаметр конструкций составлял 8 мм, а толщина 2 мм. Период предварительного культивирования МСК на пористых скаффолдах составлял 4 суток. Культуральную среду в реакторе меняли дважды в неделю
Kang et al. [74]	Система, основанная на применении силы сдвига	ММСК ЖТ кролика/ трехмерная культура	Микроноситель Cytodex	Оценивали скорость хондрогенной дифференцировки в биореакторе с вращающейся стенкой



Продолжение табл. 4

Авторы	Тип биореактора	Тип клеток/ Вид культивирования	Природа скаффолда	Особенности
Li et al. [75]	Система, основанная на применении силы сдвига	Бычьи хондроциты/ трехмерная культура	Нанонити из поли-L-молочной кислоты	Коммерчески доступная система с вращающимися стенками сосуда (Syntheson, США), где проводили культивирование в течение 42 дней. Замену культуральной среды производили каждые трое суток
Akmal et al. [76]	Система, основанная на применении силы сдвига	Бычьи и человеческие хондроциты/ трехмерная культура	Альгинат	Коммерчески доступная система с вращающимися стенками сосуда (Syntheson, США) модель RCCS, где в течение 19 дней изучали влияние вращения на клетки, помещенные в альгинатные сферы
Chang et al. [77]	Система, основанная на применении силы сдвига	Свинные хондроциты/ трехмерная культура	Желатин	Культивирование в двухкамерном биореакторе проходило до 4 недель с постоянным перемешиванием при скорости 50 оборотов в минуту и еженедельной сменой культуральной среды
<b>Системы, основанные на перфузии</b>				
Chen et al. [78]	Система, основанная на перфузии	Свинные хондроциты/ трехмерная культура	Агароза	КИК культивировали при постоянной скорости потока 0,014-0,14 мл/мин с увеличением до 5 мл/мин на 30 минут каждые сутки. Продолжительность эксперимента составляла 14 суток
Mizuno et al. [79]	Система, основанная на перфузии	Бычьи хондроциты/ трехмерная культура	Коллагеновые губки	Скорость потока среды из резервуара через ячейку составляла 0,33 мл/мин. В этой системе культивировали иммобилизованные на коллагеновых губках хондроциты в течение 15 дней
Sun et al. [80]	Система, основанная на перфузии	Человеческие хондроциты/ трехмерная культура	Пористый β-трикальций фосфат	Культивировали одновременно дифференцированные из ММСК КМ хондроциты и остеобласты. Скорость потока составляла 3,5 мл/мин, при этом поток поступал в ячейку с образцами сверху. Все устройство помещали в инкубатор
Shahin et al. [20]	Система, основанная на перфузии	Человеческие хондроциты/ трехмерная культура	Полигликолид	Культивирование происходило 5 недель при скоростях потока 0,075 и 0,2 мл/мин. Три колоночных биореактора одновременно помещали в инкубатор. Объем циркулирующей культуральной среды для каждого составлял 200 мл, причем каждые 3 дня 100 мл заменяли на новую среду
Liao et al. [81]	Система, основанная на перфузии	Хондроциты/ трехмерная культура	Микроволоконна из полилактида/ лактона, полужидкие методом электрооспиннинга	Клетки в течение 9 суток культивировали в при скорости потока 0,3 мл/мин. Затем полученные образцы децеллюляризировали для создания комплексного скаффолда из децеллюляризованного хряща и биоматериала
Pazzano et al. [82]	Система, основанная на перфузии	Бычьи хондроциты/ трехмерная культура	Поли-L-молочная кислота и полигидроксикалканат	Линейная скорость потока при прохождении через диски, заселенные клетками, составляла 1 мм/с. Время культивирования составляло 14 суток
Davison et al. [83]	Система, основанная на перфузии	Овечьи хондроциты/ трехмерная культура	Полигидроксикалканат	Клетки культивировали в течение 7 дней при разных скоростях потока: 11 и 170 мкм/мин
Tran et al. [84]	Система, основанная на перфузии	Свинные хондроциты/ трехмерная культура	Агароза	Время культивирования составляло 4 недели
Forsey et al. [85]	Система, основанная на перфузии	Человеческие хондроциты; ММСК человека/ трехмерная культура	Альгинат-хитозан	Время культивирования составляло 4 недели

Продолжение табл. 4

Авторы	Тип биореактора	Тип клеток/ Вид культивирования	Природа скаффолда	Особенности
Mahmoudifar et al. [86]	Система, основанная на перфузии	Человеческие хондроциты/ трехмерная культура	Полигликолевая кислота	Клетки, заселенные в диски толщиной 4,75 и 2,15 мм, культивировали 5 недель
<b>Системы, основанные на растяжении</b>				
Millward-Sadler et al. [87]	Система, основанная на растяжении	Человеческие хондроциты/ двухмерная культура	Культуральный пластик	В системе изучали действие сил растяжения на активность механочувствительных ионных каналов. Давление составляло 0,016 МПа и применялось с частотой 0,33 Гц в течение 20 минут. Результаты воздействия оценивали в течение суток
Fukuda et al. [88]	Система, основанная на растяжении	Бычьи хондроциты/ двухмерная культура	Культуральный пластик	Максимальная нагрузка составляла 10 циклов в минуту до деформации 17%, а минимальная – 10 циклов в минуту до деформации 5%
<b>Системы, основанные на гидростатическом давлении</b>				
Domm et al. [89]	Система, основанная на гидростатическом давлении	Бычьи хондроциты/ трехмерная культура	Альгинатные капсулы	В течение 3 недель воздействовали на клетки переменным гидростатическим давлением
Angele et al. [90]	Система, основанная на гидростатическом давлении	ММСК КМ человека/ трехмерная культура	Гиалурионовая кислота и желатин	Под компьютерным управлением в течение недели при четырехчасовой ежедневной стимуляции изучали влияние циклического гидростатического давления с частотой 1 Гц на агрегаты, содержащие 200 000 клеток
<b>Системы, основанные на сжатии</b>				
Davisson et al. [91]	Система, основанная на сжатии	Крысиные хондроциты/ трехмерная культура	Полигликолевая кислота	Конструкции культивировали 3 недели. Амплитуда статической компрессии составляла 10, 30, 50%, а динамической – 5% при частотах от 0,001 до 0,1 Гц. Образцы подвергались компрессии в течение суток
Hunter et al. [92]	Система, основанная на сжатии	Бычьи хондроциты/ трехмерная культура	Коллаген I типа	Амплитуда нагрузки составляла 0, 25, 50% в течение 0,5; 4; 24 часов при частоте 1 Гц
Hunter et al. [93]	Система, основанная на сжатии	Бычьи хондроциты/ трехмерная культура	Фибриновый гель	Амплитуда сжатия составляла 10% при частоте 1 Гц. Культивирование проводили в течение 10 и 20 дней
Mauck et al. [94]	Система, основанная на сжатии	Телячьи хондроциты/ трехмерная культура	Агароза	Режим нагрузки на клетки: ~10% деформации с частотой 1 Гц в течение 3 часов 5 дней в неделю на протяжении 2 месяцев. Агарозные диски были заселены клетками с низкой плотностью (10 млн клеток/мл) и высокой (60 млн клеток/мл) посева
Démarteau et al. [95]	Система, основанная на сжатии	Человеческие хондроциты/ трехмерная культура	Полиэтиленгликольтерептат и полибутиленгликольтерептат	В данном биореакторе оценивали влияние 72-часовой компрессии на метаболизм клеток, заселенных в пену толщиной 1 мм и диаметром 8 мм. КИК подвергались постоянному сжатию с деформацией 5% при наложении превысившей компрессии с давлением 18 кПа и частотой 0,1 Гц. За 10 часов до окончания эксперимента воздействие на КИК прекращалось

Окончание табл. 4

Авторы	Тип биореактора	Тип клеток/ Вид культивирования	Природа скаффолда	Особенности
Wang et al. [96]	Система, основанная на сжатии	Бычья хондроциты/ трехмерная культура	Фибрин и полиуретан	Клетки предварительно культивировали в течение суток с цилиндрическими пористыми скаффолдами диаметром 8 мм и высотой 4 мм в статических условиях. Динамическая компрессия, вызывающая сжатие от 5 до 15% высоты скаффолда, создавалась с частотой 1 Гц в течение часа дважды в сутки с интервалом 8 часов в течение 2 и 4 недель. Замену культуральной среды производили через сутки
Ghargavi et al. [97]	Система, основанная на сжатии	Бычья хондроциты/ трехмерная культура	Альгинатный гидрогель	Время культивирования составляло 3 и 5 дней при скорости потока 1 мл/мин, нагрузках с силами 20, 35, 50 и 70 Н с частотой 50, 60 Гц
Kisiday et al. [98]	Система, основанная на сжатии	Хондроциты/ трехмерная культура	Агарозный гидрогель	Амплитуда деформации 2,5% с частотой 1 Гц налагалась на статическую деформацию. Время культивирования составляло 39 суток
<b>Системы, основанные на комбинации стимулов</b>				
Mizuno et al. [99]	Система, основанная на комбинации перфузии и высокого гидростатического давления	Бычья хондроциты/ трехмерная культура	Коллагеновые губки	Длительность эксперимента составляла 15 суток
Heath et al. [100]	Система, основанная на комбинации перфузии и высокого гидростатического давления	Лошадиные хондроциты/ трехмерная культура	Полигликолид	Скорость потока составляла 3 мл/мин. Культивирование длилось 5 недель
Schulz et al. [101]	Система, основанная на комбинации перфузии и сжатия	Хондроциты/ трехмерная культура	Агароза	Конструкцию диаметром 10 мм и толщиной 3 мм заселяли клетками и культивировали в течение 21 суток. Скорость потока составляла 0,5 мл/мин. Магнит создавал вертикальную силу сжатия до 5 Н с максимальной частотой воздействия 4 Гц
Wanget al. [102]	Система, основанная на комбинации сжатия и вращения	Бычья хондроциты, ММСК КМ кролика/ трехмерная культура	Фибрин и полиуретан	Клетки, заселенные в конструкции размером 8 × 4 мм, культивировали в течение двух недель
Tarnag et al. [103]	Система, основанная на комбинации перфузии и высокого гидростатического давления	Эксплантаты надкостницы кроликов/ трехмерная культура	Поли-ε-капролактон	Система позволяла создавать силу сдвига величиной до 25 Н/м² за счет перфузии культуральной среды и гидростатического давления до 0,1 МПа. Подаваемая в культуральную среду газовая смесь содержала 5% CO <sub>2</sub> . Культивирование в биореакторе длилось 6 недель

### **Системы, основанные на применении силы сдвига**

Одна из основных сил, воздействующих на ткань – сила сдвига, создаваемая сжатием синовиальной жидкости гладкими поверхностями хряща при движении сустава. На силу сдвига ткань реагирует деформацией без изменения объема, создания градиента давления и потока жидкости. Верхняя зона хряща реагирует гибко и способна смещаться по вертикали до 15%, погруженные в этот слой хондроциты изменяют форму в соответствии с вектором приложенной силы.

Создавать силу сдвига в биореакторах можно разными способами. Самый простой – зафиксировать в орбитальном шейкере стандартные чашки Петри [63, 106]. Однако чаще применяют другой подход – культивирование во вращающейся колбе или в сосуде с магнитной мешалкой [68, 107]. При этом используемые клеточно-полимерные конструкции должны быть закреплены внутри емкости, или хондроциты должны быть прекультивированы на микроносителях. В пористых микроносителях сила сдвига способна достичь только клеток, растущих на поверхности, тогда как при отсутствии пор механический стимул воздействует на всю популяцию. Многие группы ученых использовали в своих устройствах силу сдвига, создаваемую орбитальным шейкером или вращающейся колбой [69–71, 107–109].

Пример технически более сложной системы, созданной на основе вращающегося сосуда, – выполненный из поликарбоната реактор диаметром 5,75 см и объемом 110 мл. Он вращался вокруг своей центральной оси со скоростью 15–30 оборотов в минуту для поддержания флоатирования конструкций в суспензии. Для предотвращения утечки культуральной среды сосуд был полностью закрыт и не сообщался с окружающей воздушной средой. Газовая смесь, содержащая 10%  $\text{CO}_2$ , доставлялась через располагавшийся в центре вращающегося сосуда полый цилиндр диаметром 2 см, закрытый газопроницаемой силиконовой мембраной, который был неподвижен, создавая ламинарный поток и силу сдвига. Вся система находилась в камере с контролируемой температурой.

### **Системы, основанные на перфузии**

Перфузия жидкости через КИК в условиях *in vitro* обуславливает два типа физических воздействий одновременно – силу сдвига и гидростатическое давление [110].

В системах перфузии важно прочно закрепить культивируемые клетки, предотвращая их попадание в поток культуральной среды. Это может быть достигнуто встраиванием клеток в полимерный матрикс и инкапсуляцией. Обе технологии были

применены в перфузионной системе, где клетки вначале вводили в полимерный матрикс, а затем дополнительно окружали агарозной капсулой. Такие конструкции культивировали в стеклянном реакторе цилиндрической формы, заполненном культуральной средой. Среда проходила через помещенный в стандартный клеточный инкубатор реактор однонаправленно. Предусмотренные конструкцией стерильные фильтры в резервуаре со средой обеспечивали газообмен с окружающей атмосферой.

Также была предложена интересная конструкция проточного биореактора, состоящего из трех отделений. Верхний отсек включал канал шириной 1,25 мм, через который питательная среда протекала из резервуара в шприцевой насос (New Era Pump Systems Inc, США). Емкость с культуральной средой через стерильные фильтры сообщалась с атмосферой в инкубаторе, в который помещали все устройство. В средний отсек глубиной 2 мм помещали свиные хондроциты, заселенные в агарозный гель, а в нижний глубиной 4 мм – агарозный гель без клеток для поддержания гидратации ТИК и ее закрепления [78]. Известна схожая система, но с замкнутой системой циркуляции среды [79].

Перфузию среды в замкнутой системе использовали и в другой конструкции биореактора. Эта система включала пять небольших камер для культивирования, выполненных из поликарбоната, каждая объемом 1,5 мл. Все пять камер устанавливали параллельно и пропускали через них поток культуральной среды за счет работы одного перистальтического насоса.

Отметим, что наибольшее количество исследований, включающих механическое воздействие на клетки с целью получения материала для регенеративной медицины суставного хряща, приходится именно на замкнутые перфузионные биореакторы, в которых проще обеспечивать условия стерильности [83–85, 111, 112].

Описана улучшенная модель проточного биореактора, позволяющая пропускать питательную среду через ячейку с ТИК в двух направлениях [86]. Известна система биореактора, включающая блок автоматического заселения клетками 3D-скаффолдов [113]. В состав этого устройства входили две стеклянные колонки, каждая из которых содержала полисульфон-тефлоновую камеру высотой 4 мм и диаметром 8 мм, соединенных в нижней части U-образной трубкой. Оптические сенсоры, находящиеся на верхнем уровне каждой стеклянной колонки, оценивали клеточную суспензию и переклюкали направление потока. Такой биореактор был сконструирован для пористых керамических матриц, пен или сеток, заселенных хондроцитами или ММСК [113].



Постоянная замена культуральной среды при перфузии позволяет наиболее эффективно в сравнении с другими системами обеспечивать транспорт питательных веществ и газов к клеткам, а также выведение от них продуктов обмена веществ [114]. При этом небольшая скорость потока позволяет создавать силу сдвига и гидростатическое давление на хондроциты, схожие с физиологическими при перемещении синовиальной жидкости во время движения сустава.

### ***Системы, основанные на растяжении***

Была предложена система биореактора, в которой создание небольшого гидростатического давления приводило к возникновению сил растяжения. Сложное устройство обеспечивало тесную взаимосвязь обоих типов нагрузки. Хондроциты росли в монослое и покрывали дно чашки Петри, которую помещали в камеру с давлением. При этом газовая фаза взаимодействовала с обеими сторонами чашки. Объем газовой фазы под чашкой был значительно меньше, чем над ней, а соединялись они лишь через небольшое отверстие. Два клапана контролировали вход и выход в описываемую камеру из смежной герметичной. При давлении извне давление над чашкой быстро возрастало, причем в первые мгновения оно было чуть выше, чем позже при установлении равновесия. Это короткое, но неравномерное распределение давления было обусловлено относительной недоступностью пространства под чашкой Петри, куда изменение давления приходит позже. Будучи выполнена из гибкого материала, пластиковая чашка Петри прогибалась и вызывала растяжение дна, на котором был установлен датчик деформации, определяющий силы растяжения. В результате описанных воздействий прикрепленные ко дну клетки тоже растягивались [87].

В другом устройстве воздействию сил растяжения подвергались лишь устойчивые мультислойные культуры. Система представляла собой видоизмененный инкубатор для культивирования клеток. Хондроциты предварительно культивировали до образования монослоя, затем переносили в пластиковую колбу, которую одним концом прикрепляли к стационарному зажиму, а другим – к подвижному. Ось вращения соединялась с подвижным зажимом, что позволяло системе создавать движения различных амплитуд и скоростей [63].

Также существует система направленного растяжения клеток для коммерческой продажи. В ней клетки предварительно культивировали в 96-луночном планшете, покрытым коллагеном I типа, а соответствующий привод задавал режимы растяжения. К преимуществам этого устройства можно отнести автоматизацию и возможность одновременного исследования множества образцов [88].

### ***Системы, основанные на гидростатическом давлении***

Системы, основанные на гидростатическом давлении, имеют более простую конструкцию, чем биореакторы предыдущей группы. В одном из первых таких устройств образец помещали в обычную пластиковую пробирку с культуральной средой. Газовая фаза, находящаяся в пробирке выше среды, соединялась с барокамерой. Барокамера содержала два электромагнитных клапана, управляющих входом и выходом газовой смеси, что позволяло изменять давление в пробирке. Таким образом, в описанной системе газовая фаза передавала создаваемое в барокамере давление на среду, содержащую образец. Основным недостатком этой простой конструкции биореактора является хрупкость компонентов, способных выдержать лишь небольшие величины давления [63].

В последующих системах культуральная среда подвергалась непосредственному воздействию, без передатчика – газовой фазы. В одном из таких устройств основной частью был стальной сосуд объемом 0,5 л, соединенный с насосом, способным создавать различные режимы давления до 50 МПа. Сосуд полностью заполнялся водой, а в его верхней части располагался шприц. При сжатии насосом воды внутри стального сосуда поршень, двигаясь, передавал гидростатическое давление на культуральную среду с образцом, помещенную в шприц. Использование стального сосуда позволило применять высокие нагрузки, даже выше возможных *in vivo*.

Другая, более сложная система обеспечивала воздействие давления на образец, находящийся в чашках Петри. Чашка Петри с образцом и средой плотно закрывалась непроницаемой для газа и жидкости гибкой мембраной и закреплялась внутри заполненной теплой водой стальной барокамеры. Гидравлический насос создавал гидростатическое давление, которое передавалось через гибкую мембрану на среду с хондроцитами, культивированными на обработанных поли-L-лизинном пластиковых чашках. Клапаны гидравлической системы позволяли создавать различное давление. Преимуществом такой системы является возможность создания высокого давления, сопровождающаяся точным контролем. Существенный недостаток такого биореактора, как и других, основанных на воздействии гидростатического давления, – отсутствие возможности смены среды и контролируемой подачи газовой смеси.

Сконструирован также биореактор с небольшим поршнем, который перемещается вверх и вниз перпендикулярно КИК в заполненной жидкостью камере. Жидкость, вытесненная поршнем, в течение двух суток создавала давление до 10 кПа и напря-

жение сдвига, стимулируя хондроциты и имитируя динамическую среду сустава [115].

### **Системы, основанные на сжатии**

Считается, что сжатие хряща в одном направлении является основной нагрузкой в условиях *in vivo* [116].

Существуют системы для воздействия компрессией на КИК, которые можно разделить на четыре группы: создающие статическую компрессию, динамическую компрессию, динамическую сдвиговую деформацию и косвенную компрессию.

Самый простой биореактор первой группы обеспечивал одноосное сжатие одновременно в 24 образцах. КИК помещали в чашку, накрывали вкладышем, передающим нагрузку на конструкцию, а сверху устанавливали крышку с известной массой. Вторая группа включает биореактор, состоящий из двух планшетов на основе полисульфона. Он позволял одновременно культивировать 12 образцов ТИК. При этом 12 перпендикулярных распорок устанавливались так, чтобы в каждой лунке ТИК зажималась между двух поверхностей, расстояние между которыми определялось величиной сжимающей нагрузки и регулировалось толщиной прокладки из политетрафторэтилена внутри планшета. ТИК помещались в культуральную среду, при этом пространство над средой было заполнено газовой смесью, что обеспечивало газообмен для клеток [63]. Важной модификацией этой системы было добавление автоматического механизма управления со встроенными микрометрами, позволяющего создавать циклические нагрузки. Также была усовершенствована фиксация образцов, сделавшая возможным контроль деформации при нагрузке на субмикронном уровне. Объем системы увеличили до 24 образцов. Это первая из описанных систем, размеры которой не позволяли поместить ее в стандартный  $\text{CO}_2$ -инкубатор для культивирования клеток. В связи с этим в устройство добавили теплообменник и блок контроля температуры. Кроме того, данная модель включала в себя блок для доставки стерильной газовой смеси в воздушное пространство прибора. В этом биореакторе исследовали КИК, содержащие заселенные хондроцитами скаффолды из различных материалов и эксплантаты от разных видов животных [91].

Существуют также системы, позволяющие использовать стандартные 24-луночные планшеты. Один из таких биореакторов представлял собой ящик из полиметилметакрилата, помещенный в стандартный инкубатор. Планшет помещали внутри биореактора. Автоматическое управление создавало компрессионную нагрузку на главной пластине, которая через распорки передавала компрессию на образцы в каждой лунке.

Другой коммерчески доступный биореактор был способен за счет пневматического поршня создавать циклические нагрузки. Давление передавалось на культивируемые в планшетах образцы за счет металлических штырей [117].

Кроме двух описанных выше моделей, подходящих для стандартных планшетов, существуют аналогичные, создающие механическую компрессию скаффолдов с хондроцитами [92–94, 118, 119]. Все биореакторы этой группы основаны на одноосной компрессии и могут быть помещены в стандартный инкубатор. К ней относится модель [95], позволяющая менять и перемешивать культуральную среду в биореакторе, что позволяет проводить длительные эксперименты с КИК хрящевой ткани. Культуральная камера включала шесть лунок, центрированных под поршнями. Замена среды происходила через отверстие, соединенное с центральной лункой. Расположенная в ней магнитная мешалка обеспечивала перемешивание среды без контакта с КИК.

Также был разработан биореактор, в котором керамический шар для замены головки бедренной кости диаметром 32 мм вдавливался в заселенный клетками скаффолд и двигался вокруг перпендикулярной ему оси. При этом динамическая компрессия возникала вдоль цилиндрической оси конструкций. Биореактор помещали в стандартный инкубатор [96, 97].

Биореакторы третьей группы систем, основанных на компрессии, позволили применять одновременно прерывистые циклические силы сдвига и осевую деформацию [120, 121].

Значимым недостатком систем, обеспечивающих компрессию, является установка внутри биореактора вместе с клетками различных передатчиков давления, что существенно усложняет создание стерильности. Таким образом, в соответствии с нормами GMP использовать в медицине подобные потенциально нестерильные устройства нельзя, они подходят лишь для фундаментальных исследований. Однако описана система, позволяющая обойти эту проблему и создать давление за счет привода, связанного с магнитом [101]. Предложенная система позволяла одновременно сжимать 12 заселенных клетками скаффолдов диаметром 5 мм и высотой 4 мм, помещенных в стандартные центрифужные пробирки объемом 15 мл. В каждую пробирку добавляли 4 мл среды и помещали магнит, покрытый Teflon, весом 10 г, что вызывало 40% одноосную деформацию скаффолда. Недостаток этой системы, как и других основанных на компрессии, – отсутствие возможности замены среды во время нагрузки, что нарушает оптимальный обмен веществ и синтетические процессы, в том числе синтез ВКМ.

### **Системы, основанные на комбинации стимулов**

Существуют системы, способные комбинировать высокое гидростатическое давление с перфузией в длительных экспериментах на заселенных клетками 3D-скаффолдах. Такой является модифицированная перфузионная система. Ее преимущество перед исходной состояло в создании как статического гидростатического давления, так и циклического [99]. Камера для культивирования схожего, но более сложного биореактора представляла собой стальной сосуд объемом 10 мл, в котором друг под другом в культуральной среде помещали несколько клеточно-полимерных конструкций. Камера для культивирования могла полностью отделяться от перфузионной системы клапанами с пневмоприводом. Вторая часть устройства, пневматический цилиндр с поршнем, могла передавать на среду с образцом давление до 13,5 Па. Таким образом, биореактор либо отделял камеру с образцом от перфузионной системы для воздействия гидростатического давления, либо пропускал через нее поток среды с питательными веществами. Подобный биореактор позволял создавать ТИК при различных режимах, схожих с условиями *in vivo* [100, 122].

Существует система, сочетающая сжатие с перфузией. Она предназначена для создания трехмерных КИК. При культивировании КИК располагалась в герметичном биореакторе, находясь под воздействием механических стимулов, схожих с подобными *in vivo*. Перфузия культуральной среды обуславливала возникновение сил сдвига и увеличение метаболической активности клеток. При этом устанавливали в центре цилиндрического реактора пластину из поликарбоната так, чтобы она представляла собой границу между двумя отсеками. Через нижний отсек со скоростью потока 0,5 мл/мин поступала питательная среда, верхняя же камера содержала отверстие для оттока среды и магнитный механизм, создающий сжатие. Магнит, покрытый Teflon, управляется движением другого магнита. Такая конфигурация устройства – бесконтактная нагрузка – имеет большое значение в работе биореактора: деформация создается без ущерба стерильности. Находящийся на периферии датчик деформации с высоким разрешением позволял оценивать силу, создаваемую движением магнита. Важно, что данный биореактор представлял собой замкнутую систему циркуляции культуральной среды, содержащей детекторы pH,  $pO_2$ ,  $pCO_2$ , концентрации глюкозы и лактата, насосы и клапаны, позволяющие автоматически контролировать направление перфузии. Таким образом, описываемая система позволяла определять основные параметры в режиме реального времени без нарушения стерильности [101].

Описано устройство, сочетающее возможность динамического сжатия с вращением [102].

Была предложена интересная конструкция биореактора, позволяющая создавать как силу сдвига за счет перфузии культуральной среды, так и гидростатическое давление [103]. Гидростатическое давление создавалось при закрытии крана между камерой, содержащей скаффолд с клетками, и резервуаром, установленным после нее по ходу течения жидкости.

Разработаны биореакторы, сочетающие комбинации перфузии и высокого гидростатического давления [99, 100, 103], сжатия и вращения [102], перфузии и сжатия [101], перфузии и центрифугирования, перфузии и ультразвука. Также клеточно-полимерные конструкции фиксировали в сосуде, наполовину заполненном культуральной средой для сочетания перфузии и вращающегося вала [123, 124].

Разработан механический биореактор, чтобы одновременно или по отдельности создавать сжатие и деформацию сдвига при различных режимах напряжения и частоты в контролируемой среде [125].

Заметим, что при движении сустава на клетки хрящевой ткани оказывает влияние целый комплекс физических сил, что указывает на большее приближение условий для развития и роста хондроцитов внутри биореакторов, использующих комбинацию воздействий, к естественным.

### **ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

Предполагалось, что суставной хрящ будет одной из первых искусственно созданных тканей. Однако оказалось, что архитектура и биомеханические свойства нативной ткани сложны для воспроизведения. Несмотря на значительные экспериментальные усилия, лишь ограниченное число исследований дошли до стадии клинических испытаний [126]. Понимание динамических процессов, происходящих в хряще под действием механических факторов, необходимо для поддержания структуры и функции ткани, а также для воспроизведения в ТИК, что может стать одним из ключевых факторов в создании полноценной ткани [127]. Например, градиент питательных веществ и факторов роста, создаваемый в биореакторе, определяет зональность в ТИК хряща [128].

Обобщая вышесказанное, можно сделать вывод, что для формирования КИК хрящевой ткани в полноценный хрящ необходимо сочетание оптимальной структуры скаффолда, факторов роста и механической стимуляции. Исследования по первым двум составляющим ведутся сравнительно давно, исследования по поиску наилучшей конструкции биореактора для выращивания хряща сравнительно



молоды, однако такие работы из стадии разработки уже перешли в группу рутинных методов клеточной и тканевой инженерии суставного хряща.

Анализ литературы указывает на отсутствие единых стандартов для таких параметров создания ТИК в биореакторе, как концентрация кислорода, скорость потока, гидростатическое давление, сила сжатия и сдвига, что ограничивает их применение. Таким образом, необходимость более глубокого изучения влияния биофизических факторов на ТИК суставного хряща и разработка единых протоколов механических воздействий несомненна [129].

Одним из перспективных подходов, позволяющих достичь существенного прогресса в выборе типа физического воздействия и подборе его оптимальных режимов в каждом конкретном случае, может стать метод биомоделирования. Многие группы ученых работают в данной области. Ficklin et al. предложили конечно-элементную модель роста хряща, позволяющую прогнозировать геометрические, биомеханические и биохимические показатели выращенных образцов тканей, что, возможно, позволит усовершенствовать протоколы экспериментов и обогатит знания о росте суставного хряща *in vitro* [130]. Kallemeyn et al. разработали порозластическую конечно-элементарную модель трехосного компрессионного биореактора, имитирующего физиологическую нагрузку на суставной хрящ [131]. Hussein et al. создали модель перфузионного биореактора с использованием метода решеток Больцмана [132]. Культивирование клеток в проточной системе смоделировали Raimondi et al. [133], а во вращающейся – Nikolaev et al. [134]. Также разработана математическая модель для культивирования хондроцитов, заселенных в пористый скаффолд в условиях перфузии и с двусторонним направлением потока [135]. Отметим, что некоторые группы ученых вначале создавали компьютерную модель биореактора, а лишь потом применили ее на практике [118, 136].

Доказанная в многих исследованиях эффективность позволяет надеяться на внедрение биореакторов в широкую клиническую практику. Отметим, что важной задачей в описываемой области является преобразование лабораторных прототипов биореакторов в производственные системы и подбор наилучших режимов их работы для культивирования ТИК суставного хряща для больных артритом. Такие системы должны не только создавать оптимальную механическую нагрузку, но и осуществлять контроль параметров культивирования клеток, таких как температура, pH и парциальное давление газов. Также они должны обеспечивать доставку питательных веществ и выведение вредных продуктов обмена. Отметим, что все перечисленные процессы должны проходить в стерильных услови-

ях, что может быть достигнуто лишь в замкнутом и герметичном биореакторе. Для массового использования описанная система должна одновременно повышать качество создаваемых имплантатов и иметь экономически обоснованную стоимость [137].

Суммируя все вышесказанное, хочется отметить, что получение новых и обобщение уже имеющихся данных в области разработки биореакторов актуально и имеет высокое практическое значение, так как подобные работы будут способствовать улучшению качества ТИК хрящевой ткани и снижению случаев неэффективности проводимой с их использованием терапии.

*Исследование выполнено частично за счет средств гранта Российского фонда фундаментальных исследований (номер проекта 16-29-07322).*

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Вавилова ТП. Биохимия тканей и жидкостей полостей рта: учебное пособие. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2008: 208. Vavilova TP. Biohimija tkanej i zhidkostej polostej rta: uchebnoe posobie. M.: GjeOTAR-Media, 2008: 208 [In Russ].
2. Greene GW, Banquy X, Lee DW et al. Adaptive mechanically controlled lubrication mechanism found in articular joints. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2011; 108 (13): 5255–5259. doi: 10.1073.
3. Loeser RF, Goldring SR, Scanzello CR, Goldring MB. Osteoarthritis: a disease of the joint as an organ. *Arthritis Rheum*. 2012; 64: 1697–1707. doi: 10.1002.
4. Fitzgerald J. New insights into articular cartilage regeneration. *Semin. Cell Dev. Biol*. 2016; S1084-9521 (16): 30122–30127. doi: 10.1016.
5. Liu M, Yu X, Huang F, Cen S, Zhong G, Xiang Z. Tissue engineering stratified scaffolds for articular cartilage and subchondral bone defects repair. *Orthopedics*. 2013; 36 (11): 868–873. doi: 10.3928.
6. Barnabe C, Bessette L, Flanagan C, Leclercq S, Steiman A, Kalache F et al. Sex differences in pain scores and localization in inflammatory arthritis: a systematic review and metaanalysis. *J. Rheumatol*. 2012; 39 (6): 1221–1230. doi: 10.3899.
7. Grønning K, Midttun L, Steinsbekk A. Patients' confidence in coping with arthritis after nurse-led education; a qualitative study. *BMC Nurs*. 2016; 15: 28. doi: 10.1186.
8. Hoenig E, Leicht U, Winkler T, Mielke G, Beck K, Peters F et al. Mechanical properties of native and tissue-engineered cartilage depend on carrier permeability: a bioreactor study. *Tissue Eng. Part A*. 2013; 19 (13–14): 1534–1542. doi: 10.1089.
9. Schindler OS. Current concepts of articular cartilage repair. *Acta Orthop. Belg*. 2011; 77 (6): 709–726. PMID: 22308614.
10. Советников НН, Кальсин ВА, Коноплянников МА, Муханов ВВ. Клеточные технологии и тканевая ин-



- женерия в лечении дефектов суставной поверхности. *Клиническая практика*. 2013; 1: 52–66. *Sovetnikov NN, Kalsin VA, Konoplyannikov MA, Mukhanov VV*. Cell technologies and tissue engineering in the treatment of articular chondral defects. *Klinicheskaja praktika*. 2013; 1: 52–66 [In Russ, English abstract].
11. *Oussedik S, Tsitskaris KI, Parker D*. Treatment of articular cartilage lesions of the knee by microfracture or autologous chondrocyte implantation: a systematic review. *Arthroscopy*. 2015; 31 (4): 732–744. doi: 10.1016.
  12. *Keeling JJ, Gwinn DE, McGuigan FX*. A comparison of open versus arthroscopic harvesting of osteochondral autografts. *Knee*. 2009; 16 (6): 458–462. doi: 10.1016.; *Brittberg M*. Autologous chondrocyte implantation – technique and long-term follow-up. *Injury*. 2008; 39: S40–S49. doi: 10.1016.
  13. *Madeira C, Santhagunam A, Salgueiro JB, Cabral JM*. Advanced cell therapies for articular cartilage regeneration. *Trends Biotechnol*. 2015; 33 (1): 35–42. doi: 10.1016.
  14. *Shen Y, Fu Y, Wang J, Li G, Zhang X, Xu Y et al*. Biomaterial and mesenchymal stem cell for articular cartilage reconstruction. *Curr. Stem. Cell Res. Ther.* 2014; 9 (3): 254–267. PMID: 24524788.
  15. *Ashraf S, Bouhana KS, Pheneger J, Andrews SW, Walsh DA*. Selective inhibition of tropomyosin-receptor-kinase A (TrkA) reduces pain and joint damage in two rat models of inflammatory arthritis. *Arthritis Res. Ther.* 2016; 18 (1): 97. doi: 10.1186.
  16. *Kreuz PC, Müller S, Erggelet C, von Keudell A, Tischer T, Kaps C et al*. Is gender influencing the biomechanical results after autologous chondrocyte implantation? *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*. 2014; 22 (1): 72–79. doi: 10.1007.
  17. *Petri M, Broese M, Simon A, Liodakis E, Ettinger M, Guenther D et al*. CaReS (MACT) versus microfracture in treating symptomatic patellofemoral cartilage defects: a retrospective matched-pair analysis. *J. Orthop. Sci.* 2013; 18 (1): 38–44. doi: 10.1007.
  18. *Wylie JD, Hartley MK, Kapron AL, Aoki SK, Maak TG*. What is the effect of matrices on cartilage repair? *Clin. Orthop. Relat. Res.* 2015; 473 (5): 1673–1682. doi: 10.1007.
  19. *Stoltz JF, Huselstein C, Schiavi J, Li YY, Bensoussan D et al*. Human stem cells and articular cartilage tissue engineering. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 2012; 13 (15): 2682–2691. PMID: 23072395.
  20. *Shahin K, Doran PM*. Strategies for Enhancing the Accumulation and Retention of Extracellular Matrix in Tissue-Engineered Cartilage Cultured in Bioreactors. *PLoS One*. 2011; 6 (8): e23119. doi: 10.1371.
  21. *Mabvuure N, Hindocha S, Khan WS*. The role of bioreactors in cartilage tissue engineering. *Curr. Stem. Cell Res. Ther.* 2012; 7 (4): 287–292. PMID: 22563665.
  22. *Chen HC, Lee HP, Ho YC, Sung ML, Hu YC*. Combination of baculovirus-mediated gene transfer and rotating-shaft bioreactor for cartilage tissue engineering. *Biomaterials*. 2006; 27 (16): 3154–3162. PMID: 22563665.
  23. *Frisch J, Venkatesan JK, Rey-Rico A, Madry H, Cucchiaroni M*. Current progress in stem cell-based gene therapy for articular cartilage repair. *Curr. Stem. Cell Res. Ther.* 2015; 10 (2): 121–131. PMID: 25245889.
  24. *Chen HC, Chang YH, Chuang CK, Lin CY, Sung LY, Wang YH et al*. The repair of osteochondral defects using baculovirus-mediated gene transfer with differentiated chondrocytes in bioreactor culture. *Biomaterials*. 2009; 30 (4): 674–681. doi: 10.1016.
  25. *Strioga M, Viswanathan S, Darinskas A, Slaby O, Michalek J*. Same or not the same? Comparison of adipose tissue derived versus bone marrow-derived mesenchymal stem and stromal cells. *Stem. Cells and Development*. 2012; 21 (14): 2724–2752. doi: 10.1089.
  26. *Деев ПВ*. Анализ рынка клеточных препаратов для коррекции патологии скелетных тканей. *Клеточная трансплантология и тканевая инженерия*. 2006; 2 (4): 78–83. *Deev RV*. Market analysis of cell preparations for correction of the pathology of the skeletal tissues. *Cell Transplantation and Tissue Engineering*. 2006; 2 (4): 78–83 [In Russ].
  27. *Redman SN, Oldfield SF, Archer CW*. Current strategies for articular cartilage repair. *European Cells and Materials*. 2005; 9: 23–32. PMID: 15830323.
  28. *Gabriel A, Amedieu P, Laya Z, Havet E, Mertl P, Grebe R et al*. Relationship between ultrastructure and biomechanical properties of the knee meniscus. *Surg. Radiol. Anat.* 2005; 27 (6): 507–510. PMID: 16308664.
  29. *Madry H, Luyten FP and Facchini A*. Biological aspects of early osteoarthritis. *Knee Surg. Sports Traumatol. Arthrosc.* 2012; 20 (3): 407–422. doi: 10.1007.
  30. *Sanjurjo-Rodríguez C, Martínez-Sánchez AH, Hermida-Gómez T, Fuentes-Boquete I, Díaz-Prado S, Blanco FJ*. Differentiation of human mesenchymal stromal cells cultured on collagen sponges for cartilage repair. *Histol. Histopathol.* 2016; 31 (11): 1221–1239. doi: 10.14670.
  31. *Spees JL, Lee RH, Gregory CA*. Mechanisms of mesenchymal stem/stromal cell function. *Stem. Cell Res. Ther.* 2016; 7 (1): 125. doi: 10.1186.
  32. *Margeret RW, Gangadhar MU, Holly AL, Jeremy LC, Charles ES, Moorman CT et al*. High body mass index is associated with increased diurnal strains in the articular cartilage of the knee. *Arthritis & Rheumatism*. 2013; 65 (10): 2615–2622. doi: 10.1002.
  33. *Bhosale AM, Richardson JB*. Articular cartilage: structure, injuries and review of management. *Br. Med. Bull.* 2008; 87: 77–95. doi: 10.1093.
  34. *Loeser RF*. Integrins and chondrocyte-matrix interactions in articular cartilage. *Matrix Biol.* 2014; 39: 11–16. doi: 10.1016.
  35. *Vanden Berg-Foels WS, Scipioni L, Huynh C, Wen X*. Helium ion microscopy for high-resolution visualization of the articular cartilage collagen network. *J. Microsc.* 2012; 246: 168–176. doi: 10.1111.
  36. *Muzzarelli RA, Greco F, Busilacchi A, Sollazzo V, Gigante A*. Chitosan, hyaluronan and chondroitin sulfate in tissue engineering for cartilage regeneration: a review. *Carbohydr. Polym.* 2012; 89 (3): 723–739. doi: 10.1016.
  37. *Fisher SA, Tam RY, Shoichet MS*. Tissue mimetics: engineered hydrogel matrices provide biomimetic environments for cell growth. *Tissue Engineering*. 2014; 20 (5, 6): 895–898. doi: 10.1089.

38. Севастьянов ВИ, Перова НВ. Инъекционный гетерогенный биополимерный гидрогель для заместительной и регенеративной хирургии и способ его получения. 2011; Патент РФ № 2433828. *Sevast'janov VI, Perova NV. In'ekcionnyj geterogennyj biopolimernyj gidrogel' dlja zamestitel'noj i regenerativnoj hirurgii i sposob ego polucheniya*. 2011; Patent RF № 2433828.
39. Соловьева ИВ, Шестерня Н, Перова НВ, Севастьянов ВИ. Комбинированное применение биополимерного гетерогенного гидрогеля и гиалуроновой кислоты при ОА (первый опыт). *Врач*. 2016; 1: 12–17. *Solov'eva IV, Shesternja N, Perova NV, Sevast'janov VI. Kombinirovannoe primenenie biopolimernogo geterogennoho gidrogelja i gialuronovoj kisloty pri OA (per-vyj opyt)*. *Vrach*. 2016; 1: 12–17 [In Russ].
40. Федяков АГ, Древалъ ОН, Севастьянов ВИ, Перова НВ, Кузнецов АВ, Чапандзе ГН. Экспериментально-клиническое обоснование применения биodeградируемых имплантатов в хирургическом лечении поражений периферических нервов. *Вопросы нейрохирургии им. Н.Н. Бурденко*. 2010; 3: 15–18. *Fedjakov AG, Dreval' ON, Sevast'janov VI, Perova NV, Kuznecov AV, Chapandze GN. Jeksperimental'no-klinicheskoe obosnovanie primenenija biodegradiruemyh implantatov v hirurgicheskom lechenii porazhenij perifericheskikh nervov*. *Voprosy nejrohirurgii im. N.N. Burdenko*. 2010; 3: 15–18 [In Russ].
41. Farrell E, O'Brien FJ, Doyle P, Fischer J, Yannas I, Harley BA et al. A collagen-glycosaminoglycan scaffold supports adult rat mesenchymal stem cell differentiation along osteogenic and chondrogenic routes. *Tissue Eng*. 2006; 12 (3): 459–468. PMID: 16579679.
42. Cheng NC, Estes BT, Awad HA, Guilak F. Chondrogenic differentiation of adipose-derived adult stem cells by a porous scaffold derived from native articular cartilage extracellular matrix. *Tissue Eng. Part A*. 2009; 15 (2): 231–241. doi: 10.1089.
43. Sutherland AJ, Converse GL, Hopkins RA, Detamore MS. The bioactivity of cartilage extracellular matrix in articular cartilage regeneration. *Adv. Health Mater*. 2015; 4 (1): 29–39. doi: 10.1002.
44. Ye K, Felimban R, Moulton SE, Wallace GG, Di Bella C, Traianedes K et al. Bioengineering of articular cartilage: past, present and future. *Regen. Med*. 2013; 8 (3): 333–349. doi: 10.2217.
45. Williams RJ, Niederauer GG. Articular Cartilage Resurfacing Using Synthetic Resorbable Scaffolds in book: *Cartilage repair strategies*, edited by Williams R.J., Humana Press, Totowa, New Jersey, 2007; 115–136.
46. Ahmed TA, Hincke MT. Mesenchymal stem cell-based tissue engineering strategies for repair of articular cartilage. *Histol. Histopathol*. 2014; 29 (6): 669–689. PMID: 24452855.
47. Nava MM, Draghi L, Giordano C, Pietrabissa R. The effect of scaffold pore size in cartilage tissue engineering. *J. Appl. Biomater. Funct. Mater*. 2016; 14 (3): e223–e229. doi: 10.5301.
48. Danisovic L, Varga I, Polak. Growth factors and chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *Tissue Cell*. 2012; 44: 69–73. doi: 10.1016.
49. Indrawattana N, Chen G, Tadokoro M, Shann LH, Ohgushi H, Tateishi T et al. Growth factor combination for chondrogenic induction from human mesenchymal stem cell. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 2004; 320: 914–919. PMID: 15240135.
50. Surguchenko VA, Ponomareva AS, Kirsanova LA, Skaleckij NN, Sevastianov VI. The cell-engineered construct of cartilage on the basis of biopolymer hydrogel matrix and human adipose tissue-derived mesenchymal stromal cells (in vitro study). *J. Biomed. Mater. Res*. 2015; 103A (2): 463–470.
51. Севастьянов ВИ. Технологии тканевой инженерии и регенеративной медицины. *Вестник трансплантологии и искусственных органов*. 2014; 16 (3): 93–108. *Sevast'yanov VI. Tekhnologii tkanevoj inzhenierii i regenerativnoj mediciny*. *Vestnik transplantologii i iskusstvennyh organov*. 2014; 16 (3): 93–108.
52. Севастьянов ВИ, Духина ГА, Пономарева АС, Кирсанова ЛА, Перова НВ, Скалецкий НН. Биомедицинский клеточный продукт для регенерации суставного хряща: биосовместимые и гистоморфологические свойства (экспериментальная модель подкожной имплантации). *Перспективные материалы*. 2014; 10: 28–39. *Sevast'yanov VI, Duhina GA, Ponomareva AS, Kirsanova LA, Perova NV, Skaleckij NN. Biomedicinskij kletochnyj produkt dlya regeneracii sustavno-go hryashcha: biosovmestimye i gistomorfologicheskie svojstva (ehksperimental'naya model' podkozhnoj implantacii)*. *Perspektivnye materialy*. 2014; 10: 28–39.
53. Huey DJ, Hu JC, Athanasiou KA. Unlike bone, cartilage regeneration remains elusive. *Science*. 2012; 338: 917–921. doi: 10.1126.
54. Makris EA, Hu JC, Athanasiou KA. Hypoxia-induced collagen crosslinking as a mechanism for enhancing mechanical properties of engineered articular cartilage. *Osteoarthritis Cartilage*. 2013; 21: 634–641. doi: 10.1016.
55. Makris EA, MacBarb RF, Responde DJ, Hu JC, Athanasiou KA. A copper sulfate and hydroxylysine treatment regimen for enhancing collagen cross-linking and biomechanical properties in engineered neocartilage. *FASEB J*. 2013; 27: 2421–2430. doi: 10.1096.
56. Gunja NJ, Uthamanthil RK, Athanasiou KA. Effects of TGF- $\beta$ 1 and hydrostatic pressure on meniscus cell-seeded scaffolds. *Biomaterials*. 2009; 30: 565–573. doi: 10.1016.
57. Makris EA, MacBarb RF, Paschos NK, Hu JC, Athanasiou KA. Combined use of chondroitinase ABC, TGF- $\beta$ 1, and collagen crosslinking agent lysyl oxidase to engineer functional neotissues for fibrocartilage repair. *Biomaterials*. 2014; 35: 6787–6796. doi: 10.1016.
58. Mahmoudifar N, Doran PM. Effect of seeding and bio-reactor culture conditions on the development of human tissue-engineered cartilage. *Tissue Eng*. 2006; 12 (6): 1675–1685. PMID: 16846362.
59. He B, Wu JP, Kirk TB, Carrino JA, Xiang C, Xu J. High-resolution measurements of the multilayer ultra-structure of articular cartilage and their translational potential. *Arthritis Res. Ther*. 2014; 16 (2): 205. doi: 10.1186.

60. Emin N, Koç A, Durkut S, Elçin AE, Elçin YM. Engineering of rat articular cartilage on porous sponges: effects of tgf-beta 1 and microgravity bioreactor culture. *Artif. Cells Blood Substit. Immobil. Biotechnol.* 2008; 36 (2): 123–137. doi: 10.1080.
61. Gemmiti CV, Guldberg RE. Fluid flow increases type II collagen deposition and tensile mechanical properties in bioreactor-grown tissue-engineered cartilage. *Tissue Eng.* 2006; 12 (3): 469–479. PMID: 16579680.
62. Darling EM, Athanasiou KA. Articular cartilage bioreactors and bioprocesses. *Tissue Eng.* 2003; 9 (1): 9–26. PMID: 12625950.
63. Schulz RM, Bader A. Cartilage tissue engineering and bioreactor systems for the cultivation and stimulation of chondrocytes. *Eur. Biophys. J.* 2007; 36 (4–5): 539–568. PMID: 17318529.
64. Guha Thakurta S, Kraft M, Viljoen HJ, Subramanian A. Enhanced depth-independent chondrocyte proliferation and phenotype maintenance in an ultrasound bioreactor and an assessment of ultrasound dampening in the scaffold. *Acta Biomater.* 2014; 10 (11): 4798–4810. doi: 10.1016.
65. Yu H, Kim J, H, Lewis M, Wall I. Impact of mechanical stretch on the cell behaviors of bone and surrounding tissues. *J. Tissue Eng.* 2016; 7: 2041731415618342. doi: 10.1177.
66. Guha Thakurta S, Budhiraja G, Subramanian A. Growth factor and ultrasound-assisted bioreactor synergism for human mesenchymal stem cell chondrogenesis. *J. Tissue Eng.* 2015; 6: 1–13. doi: 10.1177.
67. Subramanian A, Turner JA, Budhiraja G. Ultrasonic bioreactor as a platform for studying cellular response. *Tissue Eng. Part C Methods.* 2013; 19: 244–255. doi: 10.1089.
68. Wang TW, Wu HC, Wang HY, Lin FH, Sun JS. Regulation of adult human mesenchymal stem cells into osteogenic and chondrogenic lineages by different bioreactor systems. *J. Biomed. Mater. Res. A.* 2009; 88 (4): 935–946. doi: 10.1002.
69. Brown AN, Kim BS, Alsberg E, Mooney DJ. Combining chondrocytes and smooth muscle cells to engineer hybrid soft tissue constructs. *Tissue Eng.* 2000; 6 (4): 297–305. PMID: 10992427.
70. Hu JC, Athanasiou KA. Low-density cultures of bovine chondrocytes: effects of scaffold material and culture system. *Biomaterials.* 2005; 26 (14): 2001–2012. PMID: 15576174.
71. Janjanin S, Li WJ, Morgan MT, Shanti RM, Tuan RS. Mold-shaped, nanofiber scaffold-based cartilage engineering using human mesenchymal stem cells and bioreactor. *J. Surg. Res.* 2008; 149 (1): 47–56. doi: 10.1016.
72. Mellor LF, Baker TL, Brown RJ, Catlin LW, Oxford JT. Optimal 3D culture of primary articular chondrocytes for use in the rotating wall vessel bioreactor. *Aviat. Space Environ. Med.* 2014; 85 (8): 798–804. doi: 10.3357.
73. Augst A, Marolt D, Freed LE, Vepari C, Meinel L, Farley M et al. Effects of chondrogenic and osteogenic regulatory factors on composite constructs grown using human mesenchymal stem cells, silk scaffolds and bioreactors. *J. R. Soc. Interface.* 2008; 5 (25): 929–939. doi: 10.1098.
74. Kang H, Lu S, Peng J, Yang Q, Liu S, Zhang L, Huang J et al. Chondrogenic differentiation of human adipose derived stem cells using microcarrier and bioreactor combination technique. *Mol. Med. Rep.* 2015; 11 (2): 1195–1199. doi: 10.3892.
75. Li W, Jiang YJ, Tuan RS. Cell-nanofiber-based Cartilage Tissue Engineering using Improved Cell Seeding, Growth Factor, and Bioreactor Technologies. *Tissue Eng. Part A.* 2008; 14 (5): 639–648. doi: 10.1089.
76. Akmal M, Anand A, Anand B, Wiseman M, Goodship AE, Bentley G. The culture of articular chondrocytes in hydrogel constructs within a bioreactor enhances cell proliferation and matrix synthesis. *J. Bone Joint Surg. Br.* 2006; 88 (4): 544–553.
77. Chang CH, Lin FH, Lin CC, Chou CH, Liu HC. Cartilage tissue engineering on the surface of a novel gelatin-calcium-phosphate biphasic scaffold in a double-chamber bioreactor. *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.* 2004; 71 (2): 313–321. PMID: 15386400.
78. Chen T, Buckley M, Cohen I, Bonassar L, Awad HA. Insights into interstitial flow, shear stress, and mass transport effects on ECM heterogeneity in bioreactor-cultivated engineered cartilage hydrogels. *Biomech. Model Mechanobiol.* 2012; 11 (5): 689–702. doi: 10.1007.
79. Mizuno S, Allemann F, Glowacki J. Effects of medium perfusion on matrix production by bovine chondrocytes in three-dimensional collagen sponges. *J. Biomed. Mater. Res.* 2001; 56 (3): 368–375. PMID: 11372054.
80. Sun S, Ren Q, Wang D, Zhang L, Wu S, Sun XT. Repairing cartilage defects using chondrocyte and osteoblast composites developed using a bioreactor. *Chin. Med. J. (Engl.).* 2011; 124 (5): 758–763. PMID: 21518572.
81. Liao J, Guo X, Grande-Allen KJ, Kasper FK, Mikos AG. Bioactive polymer/extracellular matrix scaffolds fabricated with a flow perfusion bioreactor for cartilage tissue engineering. *Biomaterials.* 2010; 31 (34): 8911–8920. doi: 10.1016.
82. Pazzano D, Mercier KA, Moran JM, Fong SS, DiBiasio DD, Rulfs JX, Kohles SS, Bonassar LJ. Comparison of chondrogenesis in static and perfused bioreactor culture. *Biotechnol. Prog.* 2000; 16 (5): 893–896. PMID: 11027186.
83. Davisson T, Sah RL, Ratcliffe A. Perfusion increases cell content and matrix synthesis in chondrocyte three-dimensional cultures. *Tissue Eng.* 2002; 8 (5): 807–816. PMID: 12459059.
84. Tran SC, Cooley AJ, Elder SH. Effect of a mechanical stimulation bioreactor on tissue engineered, scaffold-free cartilage. *Biotechnol. Bioeng.* 2011; 108 (6): 1421–1429. doi: 10.1002.
85. Santoro R, Olivares AL, Brans G, Wirz D, Longinotti C, Lacroix D et al. Bioreactor based engineering of large-scale human cartilage grafts for joint resurfacing. *Biomaterials.* 2010; 31 (34): 8946–8952. doi: 10.1016.
86. Mahmoudifar N, Doran PM. Tissue engineering of human cartilage in bioreactors using single and composite cell-seeded scaffolds. *Biotechnol. Bioeng.* 2005; 91 (3): 338–355. PMID: 15959891.



87. Millward-Sadler SJ, Wright MO, Davies LW, Nuki G, Salter DM. Mechanotransduction via integrins and interleukin-4 results in altered aggrecan and matrix metalloproteinase 3 gene expression in normal, but not osteoarthritic, human articular chondrocytes. *Arthritis Rheum.* 2000; 43 (9): 2091–2099. PMID: 11014361.
88. Fukuda K, Asada S, Kumano F, Saitoh M, Otani K, Tanaka S. Cyclic tensile stretch on bovine articular chondrocytes inhibits protein kinase C activity. *J. Lab. Clin. Med.* 1997; 130 (2): 209–215. PMID: 9280149.
89. Domm C, Fay J, Schünke M, Kurz B. Redifferentiation of dedifferentiated joint cartilage cells in alginate culture. Effect of intermittent hydrostatic pressure and low oxygen partial pressure. *Orthopade.* 2000; 29 (2): 91–99. PMID: 10743629.
90. Angele P, Schumann D, Angele M, Kinner B, Englert C, Hente R et al. Cyclic, mechanical compression enhances chondrogenesis of mesenchymal progenitor cells in tissue engineering scaffolds. *Biorheology.* 2004; 41 (3–4): 335–346. PMID: 15299266.
91. Davisson T, Kunig S, Chen A, Sah R, Ratcliffe A. Static and dynamic compression modulate matrix metabolism in tissue engineered cartilage. *J. Orthop. Res.* 2002; 20 (4): 842–848. PMID: 12168676.
92. Hunter CJ, Imler SM, Malaviya P, Nerem RM, Levenston ME. Mechanical compression alters gene expression and extracellular matrix synthesis by chondrocytes cultured in collagen I gels. *Biomaterials.* 2002; 23 (4): 1249–1259. PMID: 11791929.
93. Hunter CJ, Mouw JK, Levenston ME. Dynamic compression of chondrocyte-seeded fibrin gels: effects on matrix accumulation and mechanical stiffness. *Osteoarthritis Cartilage.* 2004; 12 (2): 117–130. PMID: 11791929.
94. Mauck RL, Wang CC, Oswald ES, Ateshian GA, Hung CT. The role of cell seeding density and nutrient supply for articular cartilage tissue engineering with deformational loading. *Osteoarthritis Cartilage.* 2003; 11 (12): 879–890. PMID: 14629964.
95. Démarteau O, Jakob M, Schäfer D, Heberer M, Martin I. Development and validation of a bioreactor for physical stimulation of engineered cartilage. *Biorheology.* 2003; 40 (1–3): 331–336. PMID: 12454423.
96. Wang N, Grad S, Stoddart MJ, Niemeyer P, Südkamp NP, Pestka J et al. Bioreactor-Induced Chondrocyte Maturation Is Dependent on Cell Passage and Onset of Loading. *Cartilage.* 2013; 4 (2): 165–176. doi: 10.1177.
97. Gharravi AM, Orazizadeh M, Ansari-Asl K, Banoni S, Izadi S, Hashemitabar M. Design and fabrication of anatomical bioreactor systems containing alginate scaffolds for cartilage tissue engineering. *Avicenna J. Med. Biotechnol.* 2012; 4 (2): 65–74. PMID: 23408660.
98. Kisiday JD, Jin M, DiMicco MA, Kurz B, Grodzinsky AJ. Effects of dynamic compressive loading on chondrocyte biosynthesis in self-assembling peptide scaffolds. *J. Biomech.* 2004; 37 (5): 595–604. PMID: 15046988.
99. Mizuno S, Tateishi T, Ushida T, Glowacki J. Hydrostatic fluid pressure enhances matrix synthesis and accumulation by bovine chondrocytes in three-dimensional culture. *J. Cell Physiol.* 2002; 193 (3): 319–327. PMID: 12384984.
100. Heath CA. The effects of physical forces on cartilage tissue engineering. *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.* 2000; 17: 533–551. PMID: 11255680.
101. 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.
102. Wang N, Chen J, Zhang G, Chai W. Chondrogenesis of passaged chondrocytes induced by different dynamic loads in bioreactor. *Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi.* 2013; 27 (7): 786–792. PMID: 24063164.
103. Tarng YW, Huang BF, Su FC. A novel recirculating flow-perfusion bioreactor for periosteal chondrogenesis. *Int. Orthop.* 2012; 36 (4): 863–868. doi: 10.1007.
104. Louw TM, Budhiraja G, Viljoen HJ. Mechanotransduction of ultrasound is frequency dependent below the cavitation threshold. *Ultrasound Med. Biol.* 2013; 39: 1303–1319. doi: 10.1016.
105. Whitney NP, Lamb AC, Louw TM. Integrin-mediated mechanotransduction pathway of low-intensity continuous ultrasound in human chondrocytes. *Ultrasound Med. Biol.* 2012; 38: 1734–1743. doi: 10.1016.
106. Klöckner W, Diederichs S, Büchs J. Orbitally shaken single-use bioreactors. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 2014; 138: 45–60. doi: 10.1007.146-2.
107. Bouchet BY, Colón M, Polotsky A, Shikani AH, Hungerford DS, Frondoza CG. Beta-1 integrin expression by human nasal chondrocytes in microcarrier spinner culture. *J. Biomed. Mater. Res.* 2000; 52 (4): 716–724. PMID: 11033555.
108. Kuo CK, Li WJ, Mauck RL, Tuan RS. Cartilage tissue engineering: its potential and uses. *Curr. Opin. Rheumatol.* 2006; 18: 64. PMID: 16344621.
109. Lappa M. Organic tissues in rotating bioreactors: fluid-mechanical aspects, dynamic growth models, and morphological evolution. *Biotechnol. Bioeng.* 2003; 84: 518. PMID: 14574686.
110. Sacco R, Causin P, Zunino P, Raimondi MT. A multi-physics/multiscale 2D numerical simulation of scaffold-based cartilage regeneration under interstitial perfusion in a bioreactor. *Biomech. Model Mechanobiol.* 2011; 10 (4): 577–589. doi: 10.1007.
111. Khan AA, Surrao DC. The importance of bicarbonate and nonbicarbonate buffer systems in batch and continuous flow bioreactors for articular cartilage tissue engineering. *Tissue Eng. Part C Methods.* 2012; 18 (5): 358–368. doi: 10.1089.
112. Forsey RW, Tare R, Oreffo RO, Chaudhuri JB. Perfusion bioreactor studies of chondrocyte growth in alginate-chitosan capsules. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 2012; 59 (2): 142–152. doi: 10.1002.
113. Wendt D, Marsano A, Jakob M, Heberer M, Martin I. Oscillating perfusion of cell suspensions through three-dimensional scaffolds enhances cell seeding efficiency and uniformity. *Biotechnol. Bioeng.* 2003; 84 (2): 205–214. PMID: 12966577.181/2.
114. Sun S, Ren Q, Wang D, Zhang L, Wu S, Sun XT. Repairing cartilage defects using chondrocyte and osteoblast composites developed using a bioreactor. *Chin. Med. J. (Engl.).* 2011; 124 (5): 758–763. PMID: 21518572.



115. De Maria C, Giusti S, Mazzei D, Crawford A, Ahluwalia A. Squeeze pressure bioreactor: a hydrodynamic bioreactor for noncontact stimulation of cartilage constructs. *Tissue Eng. Part C Methods*. 2011; 17 (7): 757–764. doi: 10.1089.
116. Lee CR, Grodzinsky AJ, Hsu HP, Spector M. Effects of a cultured autologous chondrocyte-seeded type II collagen scaffold on the healing of a chondral defect in a canine model. *J. Orthop. Res.* 2003; 21 (2): 272–281. PMID: 12568959.
117. Graff RD, Lazarowski ER, Banes AJ, Lee GM. ATP release by mechanically loaded porcine chondrons in pellet culture. *Arthritis Rheum.* 2000; 43 (7): 1571–1579. PMID: 10902762.
118. Mauck RL, Seyhan SL, Ateshian GA, Hung CT. Influence of seeding density and dynamic deformational loading on the developing structure/function relationships of chondrocyte-seeded agarose hydrogels. *Ann. Biomed. Eng.* 2002; 30 (8): 1046–1056. PMID: 12449765.
119. Hung CT, Mauck RL, Wang CC, Lima EG, Ateshian GA. A paradigm for functional tissue engineering of articular cartilage via applied physiologic deformational loading. *Ann. Biomed. Eng.* 2004; 32 (1): 35–49. PMID: 14964720.
120. Kisiday JD, Jin M, DiMicco MA, Kurz B, Grodzinsky AJ. Effects of dynamic compressive loading on chondrocyte biosynthesis in self-assembling peptide scaffolds. *J. Biomech.* 2004; 37 (5): 595–604. PMID: 15046988.
121. Jin M, Frank EH, Quinn TM, Hunziker EB, Grodzinsky AJ. Tissue shear deformation stimulates proteoglycan and protein biosynthesis in bovine cartilage explants. *Arch. Biochem. Biophys.* 2001; 395 (1): 41–48. PMID: 11673864.
122. Laganà K, Moretti M, Dubini G, Raimondi MT. A new bioreactor for the controlled application of complex mechanical stimuli for cartilage tissue engineering. *Proc. Inst. Mech. Eng. H.* 2008; 222 (5): 705–715. PMID: 18756689.
123. Chen HC, Lee HP, Sung ML, Liao CJ, Hu YC. A novel rotating-shaft bioreactor for two-phase cultivation of tissue-engineered cartilage. *Biotechnol. Prog.* 2004; 20 (6): 1802–1809. PMID: 15575715.
124. Lu CH, Lin KJ, Chiu HY, Chen CY, Yen TC, Hwang SM et al. Improved chondrogenesis and engineered cartilage formation from TGF- $\beta$ 3-expressing adipose-derived stem cells cultured in the rotating-shaft bioreactor. *Tissue Eng. Part A*. 2012; 18 (19–20): 2114–2124. doi: 10.1089.
125. Yusoff N, Abu Osman NA, Pingguan-Murphy B. Design and validation of a bi-axial loading bioreactor for mechanical stimulation of engineered cartilage. *Med. Eng. Phys.* 2011; 33 (6): 782–788. doi: 10.1016.
126. Camarero-Espinosa S, Rothen-Rutishauser B, Foster EJ, Weder C. Articular cartilage: from formation to tissue engineering. *Biomater. Sci.* 2016; 26; 4 (5): 734–767. doi: 10.1039.
127. Stoffel M, Yi JH, Weichert D, Zhou B, Nebelung S, Müller-Rath R et al. Bioreactor cultivation and remodelling simulation for cartilage replacement material. *Med. Eng. Phys.* 2012; 34 (1): 56–63. doi: 10.1016.
128. Spitters TW, Leijten JC, Deus FD, Costa IB, van Apeldoorn AA, van Blitterswijk CA et al. A dual flow bioreactor with controlled mechanical stimulation for cartilage tissue engineering. *Tissue Eng. Part C Methods*. 2013; 19 (10): 774–783. doi: 10.1089.
129. Ye G, Zhang F, Shi H. Research progress of bioreactor biophysical factors in cartilage tissue engineering. *Zhongguo Xue Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi*. 2013; 27 (7): 810–813. PMID: 24063168.
130. Ficklin TP, Davol A, Klisch SM. Simulating the growth of articular cartilage explants in a permeation bioreactor to aid in experimental protocol design. *J. Biomech. Eng.* 2009; 131 (4): 041008. doi: 10.1115.
131. Kallemeyn NA, Grosland NM, Pedersen DR, Martin JA, Brown TD. Loading and boundary condition influences in a poroelastic finite element model of cartilage stresses in a triaxial compression bioreactor. *Iowa Orthop. J.* 2006; 26: 5–16. PMID: 16789442.
132. Hussein MA, Esterl S, Pörtner R, Wiegandt K, Becker T. On the lattice Boltzmann method simulation of a two-phase flow bioreactor for artificially grown cartilage cells. *J. Biomech.*; 2010, 41 (16): 3455–3461. doi: 10.1016.
133. Raimondi MT, Causin P, Mara A, Nava M, Laganà M, Sacco R. Breakthroughs in computational modeling of cartilage regeneration in perfused bioreactors. *IEEE Trans. Biomed. Eng.* 2011; 58 (12): 3496–3499. doi: 10.1109.
134. Nikolaev NI, Obradovic B, Versteeg HK, Lemon G, Williams DJ. A validated model of GAG deposition, cell distribution, and growth of tissue engineered cartilage cultured in a rotating bioreactor. *Biotechnol. Bioeng.* 2010; 105 (4): 842–853. doi: 10.1002.
135. Shakhawath Hossain M, Bergstrom DJ, Chen XB. A mathematical model and computational framework for three-dimensional chondrocyte cell growth in a porous tissue scaffold placed inside a bi-directional flow perfusion bioreactor. *Biotechnol. Bioeng.* 2015; 112 (12): 2601–2610. doi: 10.1002.
136. Cinbiz MN, Tıgılı RS, Beşkardeş IG, Gümüşderelioğlu M, Colak U. Computational fluid dynamics modeling of momentum transport in rotating wall perfused bioreactor for cartilage tissue engineering. *J. Biotechnol.* 2010; 150 (3): 389–395. doi: 10.1016.
137. Mastbergen SC, Saris DB, Lafeber FP. Functional articular cartilage repair: here, near, or is the best approach not yet clear? *Nat. Rev. Rheumatol.* 2013; 9 (5): 277–290. doi: 10.1038.

Статья поступила в редакцию 12.09.2016 г.  
The article was submitted to the journal on 12.09.2016