

Перспективы клинического применения мультипотентных мезенхимных стромальных клеток для регенерации хрящевой гиалиновой ткани

С.В. Коржикова¹, Е.В. Фролов¹, З.А. Тепляшин¹, В.Н. Воловенко²,
А.С. Тепляшин¹

¹ – Центр клеточных технологий ООО «Бьюти Плаза», Москва

² – ФГБОУ ВО «Ярославский государственный медицинский Университет» Минздрава России, Ярославль

Контактная информация: Коржикова Светлана Васильевна, sv_vasil@mail.ru

Разработан биотрансплантат для внутрисуставного введения на основе мультипотентных мезенхимных стромальных клеток (ММСК) жировой ткани (ЖТ) и гелевого носителя, способствующий регенерации хрящевой гиалиновой ткани. Выбор клеток основан на способности ММСК ЖТ дифференцироваться в клетки хрящевой ткани (хондробласты и хондроциты) при индукции к хондродифференцировке. Подобран оптимальный носитель для доставки клеток в область дефекта, по консистенции аналогичный синовиальной жидкости, поддерживающий жизнеспособность, пролиферативную активность и хондрогенные потенции ММСК внутри сустава. Продемонстрировано, что при внутрисуставном введении кроликам биотрансплантата, состоящего из аутологичных ММСК ЖТ и гелевого носителя на основе производных целлюлозы, происходит полноценная регенерация дефекта хрящевой гиалиновой ткани.

Ключевые слова: биотрансплантат, гиалиновый хрящ, дефект суставного хряща, дифференцировка, кролики, мультипотентные мезенхимные стромальные клетки.

Введение

Благодаря активному развитию клеточной биологии, на сегодняшний день выделены и охарактеризованы практически все клеточные типы человеческого организма. Разрабатываются технологии, позволяющие использовать в медицине выделенные и размноженные в условиях *in vitro* клетки для восстановления поврежденных тканей и органов [5].

В частности, пристальное внимание исследователей направлено на изучение потенций мультипотентных мезенхимных стромальных клеток (ММСК) с целью их использования в репаративной медицине. ММСК отличаются относи-

тельной простотой выделения и культивирования, способностью пролиферировать в течение длительного времени *in vitro* и широким спектром дифференцировки в клетки тканей мезенхимного происхождения. Впервые ММСК были получены из костного мозга по их способности адгезироваться к поверхности культуральной посуды [6]. В последующие годы были отработаны методики выделения ММСК из плаценты, тимуса, дермы, фетальных тканей и др. Наиболее легкодоступным источником является жировая ткань [18].

Продемонстрировано, что благодаря своим выраженным потенциям к дифференцировке в клетки хрящевой гиалино-

вой ткани (хондробласты, хондроциты), ММСК ЖК являются перспективным материалом при создании препаратов для восстановления хрящевой ткани, выстилающей суставы [12].

При разработке биотехнологических способов восстановления дефектов гиалинового хряща с использованием клеточного материала основными задачами являются выбор наиболее подходящего источника клеток, способа их доставки в область повреждения и оптимального носителя с целью образования гиалиновой хрящевой ткани в дефектной области. Следует отметить, что исследования по созданию препаратов для лечения суставов с использованием популяций соматических клеток активно ведутся учеными многих стран. В результате получены различные продукты, предлагаемые для лечения заболеваний суставов [4, 7, 8, 11, 15]. Однако, при несомненных достоинствах полученных препаратов, все они имеют недостатки – такие, как нанесение дополнительных травм на здоровые участки органов при заборе клеточного материала, технические трудности при наращивании необходимого количества клеточного материала для трансплантации, что значительно увеличивает стоимость продукта, необходимость нежелательной обработки клеток индукторами дифференцировки перед трансплантацией, приводящей к неконтролируемым изменениям на молекулярном уровне, образованию волокнистой хрящевой ткани и др.

Таким образом, разработки принципиально новых биотехнологических подходов для лечения дегенеративных заболеваний суставов остаются по-прежнему актуальными.

Целью работы было создание биотрансплантата для внутрисуставного введения на основе мультипотентных мезенхимных стромальных клеток (ММСК) жировой ткани (ЖТ), способствующего регенерации хрящевой гиалиновой ткани, и оценка перспективности клинического применения ММСК для лечения дегенеративных заболеваний суставов.

Материалы и методы

ММСК из жировой ткани кролика и человека выделяли по разработанной ранее методике [17] с собственными модификациями [13, 14]. ММСК человека выделяли из жировой ткани, полученной во время проведения плановой операции липосакции, с информированного согласия пациента.

Жировую ткань тщательно промывали в фосфатно-солевом буфере (ФСБ), измельчали механически и подвергали ферментативной обработке 0,075% раствором коллагеназы тип I (Gibco Invitrogen Life Technologies, США) в среде ДМЕМ (среда Игла в модификации Дульбекко) (Gibco Invitrogen Life Technologies, США) с низким содержанием глюкозы (1 г/л) при 37°C в течение 30 мин. Коллагеназу отмывали эквивалентным объемом питательной среды (ДМЕМ, дополненной 10% эмбриональной сыворотки теленка) и центрифугировали при 1000 g в течение 7 мин. Полученный осадок ресуспендировали и пропускали через фильтры с диаметром пор 100 мкм и 10 мкм соответственно для удаления клеточных остатков и получения гомогенной популяции клеток. Полученную клеточную суспензию высевали во флаконы площадью 75 см² из расчета 10⁶ клеток/см². Доля прикрепившихся кле-

ток составляла приблизительно 1-1,5%. Культивировали ММСК в среде ДМЕМ, дополненной 10% эмбриональной сыворотки теленка (ЭСТ) (HyClone Fetal Bovine Serum Defined, США), однократным р-ром заменимых аминокислот и антибиотиками (100 ед./мл пеницилина, 100 мкг/мл стрептомицина) (Gibco Invitrogen Life Technologies, США) при 37°C и 5% CO₂ в воздухе. Среду меняли каждые четверо суток и, по достижении конфлуэнтного монослоя, осуществляли субкультивирование: клетки снимали с субстрата 0,05% р-ром трипсин-ЭДТА (Gibco Invitrogen Life Technologies, США) и высевали на культуральные флаконы в ростовой среде из расчета 5x10⁶ клеток/см². Непосредственно перед процедурой подготовки трансплантата клетки снимали с субстрата, отмывали средой ДМЕМ без добавок, ресуспендировали в небольшом количестве физ. р-ра и подсчитывали в камере Горяева.

Результаты иммунофенотипирования клеточных популяций, выделенных из жировой ткани кролика и человека, проводили на цитометре Epics Elite Coulter по стандартной методике [16]. Популяции полученных клеток соответствовали по экспрессии поверхностных антигенов ММСК.

Время удвоения клеток, выделенных из жировой ткани человека и кролика, составило 54-62 и 52-60 ч соответственно.

В эксперименте оценивали разные варианты трансплантатов с целью изучения влияния различных факторов на процессы регенерации хрящевой гиалиновой ткани.

1. Ostenil® (TRB Chemedica, Германия-Швейцария) – изотонический р-р, содержащий 10,0 мг гиалуроната на-

трия, использующийся в ортопедии при лечении дегенеративных и травматических изменений синовиальных суставов. Для введения в один сустав использовали 400 мкл Ostenil®.

2. Гель «Линтекс-Мезогель» (далее – Мезогель) на основе производных целлюлозы (ООО «Линтекс», Россия) – 2,2% р-р, использующийся в медицине на органах и тканях, имеющих серозное покрытие (в т.ч. на суставах). Для введения в один сустав использовали 400 мкл Мезогеля.

3. ММСК кролика – выделяли из жировой ткани кролика, наращивали *in vitro* до необходимого количества, осадок клеток суспендировали в физ. р-ре. Для введения в один сустав использовали 400 мкл суспензии клеток в физ. р-ре, из расчета 10⁵ клеток на 1 кг массы животного.

4. ММСК кролика+Мезогель – ММСК жировой ткани кролика вводили в 2,2% Мезогель, суспендировали до гомогенного состояния. Для введения в один сустав использовали 400 мкл суспензии клеток в Мезогеле, из расчета 10⁵ клеток на 1 кг массы животного.

5. ММСК человека – выделяли из жировой ткани человека, наращивали *in vitro* до необходимого количества, осадок клеток суспендировали в физ. р-ре. Для введения в один сустав использовали 400 мкл суспензии клеток в физ. р-ре, из расчета 10⁵ клеток на 1 кг массы животного.

6. ММСК человека+Мезогель – ММСК жировой ткани человека вводили в 2,2% Мезогель, суспендировали до гомогенного состояния. Для введения в один сустав использовали 400 мкл суспензии клеток в Мезогеле, из расчета 10⁵ клеток на 1 кг массы животного.

Исследования по созданию биотрансплантатов проводились в Центре клеточных технологий ООО «Бьюти Плаза». Эксперимент с животными проводился на базе вивария НИИ животноводства им. Л.К. Эрнста. Для эксперимента в ФГБНУ НИИ ПЗК им. В.А. Афанасьева были закуплены самцы кроликов (21 особь) породы советская шиншилла в возрасте 8 мес. массой тела 4,0-4,5 кг. Каждый кролик содержался в отдельной клетке, со свободным доступом к воде, с соблюдением всех зоогигиенических параметров. Кормление животных осуществлялось стандартным полнорационным комбикормом и зеленым кормом в соотношении 1:1, смена воды производилась дважды в сутки. Выживаемость животных в эксперименте после проведения всех манипуляций составила 100%.

Моделирование дефекта гиалинового хряща у кроликов проводили путем хирургического вмешательства под общей анестезией с применением правил асептики и антисептики в стерильной операционной. В качестве наркотического вещества применялся Рометар (Bioveta, Чешская Республика) и Золетил (Virbac Sante Animale, Франция) по весу животного из расчета 0,1 мл на килограмм массы. Место оперативного вмешательства – левый коленный сустав кролика. На внутренней суставной поверхности бедренной кости скальпелем срезали часть гиалинового хряща длиной около 1 см и шириной примерно 1,5 мм. Затем рана закрывалась в обратном порядке.

Введение трансплантатов производили через 7 суток после нанесения дефекта путем внутрисуставных инъекций однократно. В контрольной группе

животных восстановление нанесенного дефекта проходило естественным образом, без введения какого-либо препарата. Для изучения в динамике процесса регенерации хрящевой ткани после введения препаратов производили вывод животных из эксперимента (по одному животному из каждой группы) на 14-е, 28-е и 56-е сутки, и изолировали костно-хрящевой композит сустава, на который был нанесен дефект. Морфологический анализ проводили визуально, а гистологический – путем стандартного окрашивания парафиновых срезов гематоксилин-эозином.

Результаты и их обсуждение

Основанием для выбора линии клеток при разработке биотрансплантата послужили собственные исследования, демонстрирующие потенции ММСК к цитодифференцировке в ткани мезодермального происхождения [2, 3, 12]. Было показано, что ММСК, выделенные из костного мозга и жировой ткани, обладают выраженными потенциями к дифференцировке в клетки хрящевой ткани – хондробласты и хондроциты. Однако жировая ткань является более доступным источником клеток, поэтому при создании биотрансплантата нами были использованы ММСК, выделенные из неё.

Известно, что при введении в организм культивированные *in vitro* клетки испытывают большой стресс, при этом часть клеток гибнет и элиминируется. Для того, чтобы максимально минимизировать этот процесс, был подобран носитель для доставки клеток в область дефекта. В качестве вариантов носителя для клеток рассматривались гель «Коллаген ультра», препараты гиалуроно-

вой кислоты («Остенил», «Гиалуром») и «Линтекс-Мезогель» – гелеобразные препараты, используемые в медицинской практике при комплексном лечении дегенеративных заболеваний суставов, приближенные по консистенции к синовиальной жидкости, заполняющей сустав. Теоретическим обоснованием выбора данных препаратов было их применение в ортопедии и гелеобразная консистенция, благодаря которой они могли выполнять функцию «каркаса» для эффективной защиты клеток на время их адаптации и приживания внутри сустава.

В серии предварительных экспериментов *in vitro* при сокультивировании ММСК с выбранными препаратами было продемонстрировано, что «Линтекс-Мезогель», в отличие от остальных препаратов, максимально способствовал поддержанию жизнеспособности,

пролиферативной активности и хондрогенных потенциалов ММСК ЖТ. «Линтекс-Мезогель» – рассасывающийся противоспаечный стерильный гель, состоящий из производных целлюлозы, используемый в медицине на органах и тканях, имеющих серозное покрытие (в т.ч. на суставах) [1]. При попадании в организм гель всасывается в ткани и выделяется, не вызывая общетоксического, алергизирующего и местно-раздражающего действия (токсикологическое заключение ГУН ВНИИМТ №34/27 от 18.01.2005 г.).

В доклиническом исследовании были апробированы различные варианты препаратов для внутрисуставного введения (табл.) с целью восстановления дефекта гиалинового хряща: биотрансплантаты на основе аутогенного и ксеногенного клеточного материала (ММСК кролика и человека); клетки с носителем и без

Таблица

Влияние состава препарата для внутрисуставного введения на восстановление дефекта гиалинового хряща

№ группы	Кол-во кроликов в группе	Состав препарата, введенного внутри-суставно	Визуальная оценка дефекта гиалинового хряща (суток после введения препарата)		
			14	28	56
1 Контроль	3	-	-	-	-
2	3	ММСК человека + Мезогель	+/-	+/-	++/-
3	3	ММСК кролика + Мезогель	+	+	+
4	3	Остенил	-	-	-
5	3	ММСК кролика	+/-	+/-	+/-
6	3	Мезогель	-	-	+/-
7	3	ММСК человека	-	+/-	+/-

Примечания: «-» – дефект остался в неизменном виде; «+» – дефект восстановился; «+/-» – частичное восстановление дефекта.

носителя; препараты, используемые в ортопедии (Остенил, «Линтекс-Мезогель»). Контролем служила группа животных, в которой дефект хряща восстанавливался естественным путем.

Разница в результатах при введении клеток без носителя и с носителем подтверждает наши предположения о важности правильного выбора носителя. Эффективность регенерации гиалинового хряща на 56-е сутки после введения ММСК кролика оказалась значительно ниже по сравнению с ММСК кролика

с носителем, та же тенденция наблюдалась и при ксеногенной трансплантации (ММСК человека / ММСК человека с носителем). Аутогенный биотрансплантат (ММСК кролика с носителем) оказался самым эффективным: уже на 28-е сутки после инъекции дефект полностью восстанавливался (рис. 1), тогда как при ксеногенной трансплантации (ММСК человека с носителем) даже на 56-е сутки дефект восстанавливался только частично (рис. 2), что согласуется с литературными данными [9].



Рис. 1. ММСК кролика + Мезогель, 28 суток после внутрисуставного введения трансплантата (стрелками обозначено место нанесения дефекта).

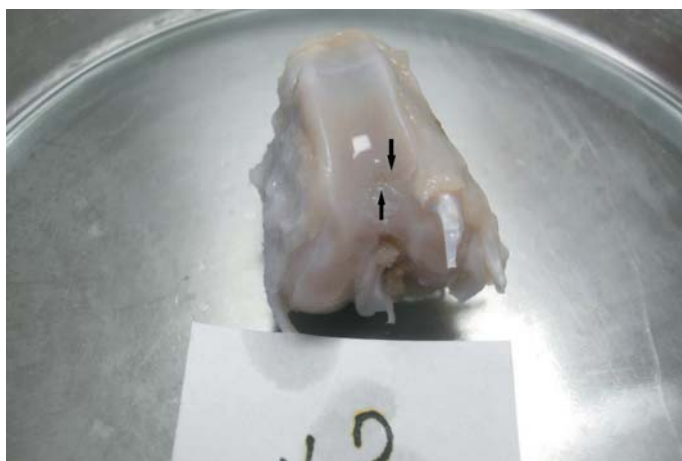


Рис. 2. ММСК человека + Мезогель, 56 суток после внутрисуставного введения трансплантата (стрелками обозначено место нанесения дефекта).

В контрольной группе (рис. 3) и в группе кроликов, которым в область дефекта вводили Остенил (рис. 4), на 56-е сутки дефект остался в неизменном виде. В группе с Мезогелем (рис. 5) восстановление было незначительным, что



Рис. 3. Контроль, 63 суток после нанесения дефекта (стрелками обозначено место нанесения дефекта).

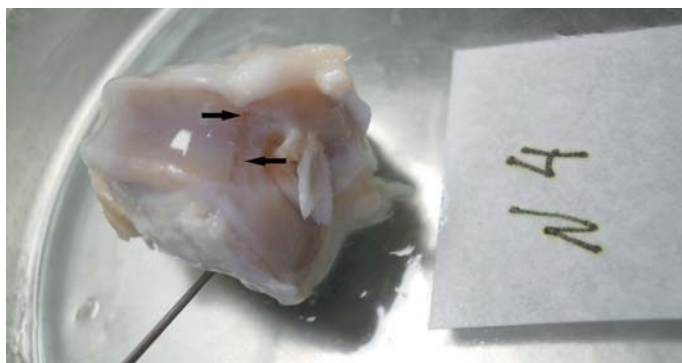


Рис. 4. Остенил, 56 суток после внутрисуставного введения препарата (стрелками обозначено место нанесения дефекта).

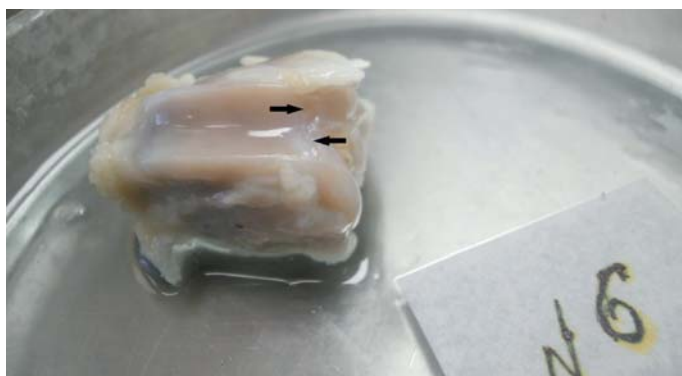


Рис. 5. Мезогель, 56 суток после внутрисуставного введения препарата (стрелками обозначено место нанесения дефекта).

демонстрирует низкую эффективность стандартных манипуляций при лечении заболеваний суставов.

Известно, что в организме разрушенный гиалиновый хрящ из-за особенностей своего метаболизма восстанавливается очень медленно и только с образованием волокнистой хрящевой ткани [10]. В этом случае функциональная активность дефектного сустава остается нарушенной. Поэтому главной целью при лечении болезней суставов является восстановление хрящевой гиалиновой ткани.

В нашем эксперименте у всех животных из группы 3 произошло зарастание дефекта хрящевой тканью уже на 28-е сутки после внутрисуставного введения препарата на основе аутологических ММСК. Гистологический анализ участка хрящевой ткани, взятой из области восстановленного дефекта, в случае применения аутогенного биотрансплантата (ММСК кролика с носителем) показал полное восстановление дефекта хрящевой гиалиновой тканью (рис. 6).

Заключение

Быстрое и качественное восстановление дефекта гиалинового хряща в случае введения биотрансплантата, содержащего аутологичные ММСК ЖТ и гелевый носитель, подтверждают высокую степень эффективности использования собственных региональных стволовых клеток для восстановления утраченной функции сустава. Кроме того, показано, что применение аутобиотрансплантата безопасно, малоинвазивно, малотравматично и легко воспроизводимо.

Перспективность клинического применения ММСК при лечении дегенеративных заболеваний суставов очевидна. Полученные данные свидетельствуют о высокой эффективности биомедицинских клеточных продуктов при лечении дегенеративных заболеваний суставов по сравнению с общепринятыми в ортопедии методами, т.к. способствуют репарации гиалиновой хрящевой ткани. В данном исследовании продемонстрирована возможность репарации хрящевой гиалиновой ткани с использо-

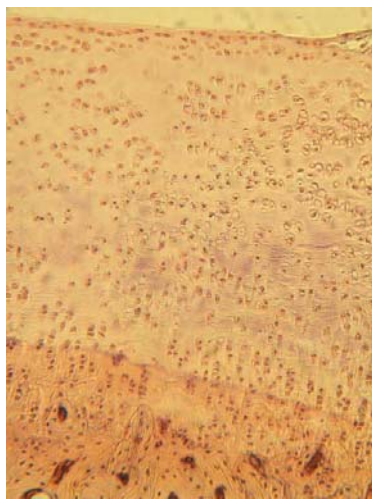


Рис. 6. Гиалиновая хрящевая ткань. Гистологический срез хрящевой ткани из области восстановленного дефекта, окраска гематоксилин-эозином, ув. x200.

ванием ММСК ЖТ, однако механизмы этого процесса нуждаются в дальнейшем изучении.

Список литературы

1. **Вербицкий Д.А., Жуковский В.А., Немилев В.Е., Слепцов И.В., Жуковская И.И.** Способ получения геля на основе карбоксиметилцеллюлозы. 2007. Патент РФ № 2352584.
2. **Тепляшин А.С., Коржикова С.В., Шарифуллина С.З., Ростовская М.С., Чупикова Н.И., Васюнина Н.Ю., Андропова Н.В., Трещалина Е.М., Савченкова И.П.** Дифференцировка мезенхимных стволовых клеток костного мозга человека в клетки хрящевой ткани при культивировании их в трехмерных матриксах OPLA *in vitro* // Цитология. 2007. № 49 (7). С. 544-51.
3. **Тепляшин А.С., Чупикова Н.И., Коржикова С.В., Шарифуллина С.З., Ростовская М.С., Савченкова И.П.** Сравнительный анализ двух клеточных популяций с фенотипом, подобным мезенхимным стволовым клеткам, выделенных из разных участков подкожно-жировой клетчатки // Цитология. 2005. № 47(7). С. 637-643.
4. **Chen F.H., Rousche K.T., Tuan R.S.** Technology Insight: adult stem cells in cartilage regeneration and tissue engineering // Nat. clin. pract. rheumatol. 2006. No. 2. Pp. 373-382.
5. **Farr J., Cole B., Dhawan A., et al.** Clinical cartilage restoration: evolution and overview // Clin. Orthop. Relat. Res. 2011. No. 469. Pp. 2696-2705.
6. **Fridenshtein A.J., Deriglazova U.F., Kulagina N.N., et al.** Precursors for fibroblasts in different populations of hematopoietic cells as detected by the *in vitro* colony assay method // Exp. Hematol. 1974. No. 2. Pp. 83-92.
7. **Kobayashi T., Ochi M., Yanada S., Ishikawa M., Adachi N., Deie M., Arihiro K.** A novel cell delivery system using magnetically labeled mesenchymal stem cells and an external magnetic device for clinical cartilage repair // Arthroscopy. 2008. No. 24(6). Pp. 9-76.
8. **Niemeyer P., Lenz P., Kreuz P.C., Salzmann G.M., Sdkamp N.P., Schmal H., Steinwachs M.** Chondrocyte-seeded type I/III collagen membrane for autologous chondrocyte transplantation: prospective 2-year results in patients with cartilage defects of the knee joint // Arthroscopy. 2010. No. 26. Pp. 1074-1082.
9. **Poncelet A.J., Denis D., Gianello P.** Cellular xenotransplantation // Curr. opin. organ. transplant. 2009. No. 14. Pp. 168-174.
10. **Shapiro F., Kolde S., Glimsher M.** Cell origin and differentiation in the repair of full-thickness defects of articular cartilage // J. Bone. Joint Surg. 1993. No. 75. Pp. 532-553.
11. **Steinwachs M.R., Kreuz P.C.** Clinical results of autologous chondrocyte transplantation (ACT) using a collagen membrane. In: Cartilage surgery and future perspectives. - Springer Berlin, Heidelberg, New York. 2003. Pp. 37-48.
12. **Tepliyashin A.S., Korzhikova S.V., Sharifulina S.Z., Chupikova N.I., Rostovskaya M.S., Vasyunina N.Y., Savtchenkova I.P.** Engineering cartilage-like tissue using adipose-derived adult stem cells and collagen scaffolds // Tissue Engineering. 2006. No. 12. P. 1117.
13. **Tepliyashin A.S.** Method for obtaining mesenchymal stem cells. 2011. United States Patent No. 7,915,039 B2.
14. **Tepliyashin A.S.** Method for obtaining mesenchymal stem cells. 2011. European patent No. 1 733 027 B1.
15. **Wakitani S., Imoto K., Yamamoto T., et al.** Human autologous culture expanded bone marrow mesenchymal cell transplantation for repair of cartilage defects in osteoarthritic knees // Osteoarthritis cartilage. 2002. No. 10. Pp. 199-206.
16. **Zeile G.** Intracytoplasmic immunofluorescence in multiple myeloma // Cytometry. 1980. No. 1. Pp. 37-41.
17. **Zuk P.A., Zhu M., Ashjian P., de Ugarte D.D., Huang J.I., Mizuno H., Alfonso Z.C., Fraiser J.K., Benhaim P., Hedrik M.H.** Human adipose tissue is source of multipotent stem cells // Mol. biol. cell. 2002. No. 13. Pp. 4279-4295.
18. **Zuk P.A., Zhu M., Mizuno H., Huang J.I., Futrell W.J., Katz A.J., Benhaim P., Lorenz H.P., Hedrik M.H.** Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies // Tissue Eng. 2001. No. 7. Pp. 211-226.

References

1. **Verbickij D.A., Zhukovskij V.A., Nemilov V.E., Slepcov I.V., Zhukovskaja I.I.** Sposob poluchenija gelja na osnove karboksimetilcellulozy. 2007. Patent RF № 2352584.
2. **Tepljashin A.S., Korzhikova S.V., Sharifulina S.Z., Rostovskaja M.S., Chupikova N.I., Vasjunina N.Ju., Andronova N.V., Treshhalina E.M., Savchenkova I.P.** Differencirovka mezenhimnyh stvolovyh kletok kostnogo mozga cheloveka v kletki hrjashhevoj tkani pri kul'tivirovanii ih v trehmernyh matriksah OPLA *in vitro* // Citologija. 2007. № 49 (7). S. 544-51.
3. **Tepljashin A.S., Chupikova N.I., Korzhikova S.V., Sharifulina S.Z., Rostovskaja M.S., Savchenkova I.P.** Sravnitel'nyj analiz dvuh

- kletocnyh populacij s fenotipom, podobnym mezenhimnym stvolovym kletkam, vydeleny iz raznyh uchastkov podkozhno-zhirovoj kletchatki // *Citologija*. 2005. № 47(7). S. 637-643.
4. **Chen F.H., Rousche K.T., Tuan R.S.** Technology Insight: adult stem cells in cartilage regeneration and tissue engineering // *Nat. clin. pract. rheumatol.* 2006. No. 2. Pp. 373-382.
 5. **Farr J., Cole B., Dhawan A., et al.** Clinical cartilage restoration: evolution and overview // *Clin. Orthop. Relat. Res.* 2011. No. 469. Pp. 2696-2705.
 6. **Fridenshtein A.J., Deriglazova U.F., Kulagina N.N., et al.** Precursors for fibroblasts in different populations of hematopoietic cells as detected by the in vitro colony assay method // *Exp. Hematol.* 1974. No. 2. Pp. 83-92.
 7. **Kobayashi T., Ochi M., Yanada S., Ishikawa M., Adachi N., Deie M., Arihiro K.** A novel cell delivery system using magnetically labeled mesenchymal stem cells and an external magnetic device for clinical cartilage repair // *Arthroscopy*. 2008. No. 24(6). Pp. 9-76.
 8. **Niemeyer P., Lenz P., Kreuz P.C., Salzmann G.M., S'dkamp N.P., Schmal H., Steinwachs M.** Chondrocyte-seeded type I/III collagen membrane for autologous chondrocyte transplantation: prospective 2-year results in patients with cartilage defects of the knee joint // *Arthroscopy*. 2010. No. 26. Pp. 1074-1082.
 9. **Poncelet A.J., Denis D., Gianello P.** Cellular xenotransplantation // *Curr. opin. organ. transplant.* 2009. No. 14. Pp. 168-174.
 10. **Shapiro F., Kolde S., Glimsher M.** Cell origin and differentiation in the repair of full-thickness defects of articular cartilage // *J. Bone. Joint Surg.* 1993. No. 75. Pp. 532-553.
 11. **Steinwachs M.R., Kreuz P.C.** Clinical results of autologous chondrocyte transplantation (ACT) using a collagen membrane. In: *Sartilage surgery and future perspectives*. - Springer Berlin, Heidelberg, New York. 2003. Pp. 37-48.
 12. **Teplyashin A.S., Korjikova S.V., Sharifulina S.Z., Chupikova N.I., Rostovskaya M.S., Vasyunina N.Y., Savtchenkova I.P.** Engineering cartilage-like tissue using adipose-derived adult stem cells and collagen scaffolds // *Tissue Engineering*. 2006. No. 12. P. 1117.
 13. **Teplyashin A.S.** Method for obtaining mesenchymal stem cells. 2011. United States Patent No. 7,915,039 B2.
 14. **Teplyashin A.S.** Method for obtaining mesenchymal stem cells. 2011. European patent No. 1 733 027 B1.
 15. **Wakitani S., Imoto K., Yamamoto T., et al.** Human autologous culture expanded bone marrow mesenchymal cell transplantation for repair of cartilage defects in osteoarthritic knees // *Osteoarthritis cartilage*. 2002. No. 10. Pp. 199-206.
 16. **Zeile G.** Intracytoplasmic immunofluorescence in multiple myeloma // *Cytometry*. 1980. No. 1. Pp. 37-41.
 17. **Zuk P.A., Zhu M., Ashjian P., de Ugarte D.D., Huang J.I., Mizuno H., Alfonso Z.C., Fraiser J.K., Benhaim P., Hedrik M.H.** Human adipose tissue is source of multipotent stem cells // *Mol. biol. cell*. 2002. No. 13. Pp. 4279-4295.
 18. **Zuk P.A., Zhu M., Mizuno H., Huang J.I., Futrell W.J., Katz A.J., Benhaim P., Lorenz H.P., Hedrik M.H.** Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies // *Tissue Eng.* 2001. No. 7. Pp. 211-226.

Prospects of clinical application of multipotent mesenchymal stromal cells for regeneration of hyaline cartilaginous tissue

S.V. Korzhikova, E.V. Frolov, Z.A. Teplyashin, V.N. Volovenko, A.S. Teplyashin

Developed biotransplant for intra-articular introduction multipotent mesenchymal stromal cells (MMSC) adipose tissue (AT) and gel media to promote regeneration of hyaline cartilage tissue. Selection of cells based on the ability of MMSCs to differentiate into adipose cartilage cells (chondroblasts and chondrocytes) for induction to chondrodysplastic. Optimal carrier to deliver the cells in the defect, the consistency is similar to synovial fluid, supporting the viability, proliferative activity and chondrogenic potential of MSC inside the joint. It is demonstrated that with intra-articular introduction of rabbits biotransplant consisting of autologous MMSC AT and gel media on the basis of derivatives of cellulose is a complete regeneration of the defect with hyaline cartilaginous tissue.

Key words: biological transplant, hyaline cartilage, joint cartilage defect, differentiation, rabbits, multipotent mesenchymal stromal cells.