

КЛЮЧЕВЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ АУТОЛОГИЧНОГО БИМЕДИЦИНСКОГО ПРОДУКТА ДЛЯ КОРРЕКЦИИ ДЕФЕКТА ХРЯЩЕВОЙ ТКАНИ

А. В. Еремеев¹✉, О. А. Зубкова¹, Е. С. Ручко^{1,2}, М. А. Лагарькова¹, В. С. Сидоров¹, А. О. Рагозин¹

¹ Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины, Федерального медико-биологического агентства, Москва, Россия

² Российский государственный аграрный университет — МСХА имени К. А. Тимирязева, Москва, Россия

Восстановление дефектов хрящевой ткани после повреждений или при патологиях — одна из актуальных проблем в медицине. Физиологической и гистологической особенностями хрящевой ткани, особенно суставов, является пониженная способность к регенерации. Возникающее воспаление ведет к индукции образования соединительной ткани, которая уже не выполняет функции гиалинового хряща, что позволяет прогрессировать патологическому процессу и в итоге приводит к необходимости хирургического вмешательства. Фармацевтических препаратов, полностью восстанавливающих поврежденную хрящевую ткань, на сегодняшний день на рынке нет. Между тем, большие надежды дает развитие клеточных технологий для нужд регенеративной медицины. В этой связи актуальны работы по созданию аутологичного хрящевого импланта для коррекции дефектов хрящевой ткани. При составлении регистрационного досье одним из основных документов является спецификация на биомедицинский клеточный продукт (БМКП). В ее основе лежит описание основных характеристик продукта, исходя из которых проводят контроль его качества. В настоящем обзоре представлен набор основных характеристик (показателей), которые можно использовать как для аутентификации (процедуры проверки подлинности) разрабатываемого нами БМКП на основе аутологичных хондроцитов, так и для составления его спецификации.

Ключевые слова: хондроциты, донорский материал, биомедицина, клеточный продукт, культивирование клеток, экспрессия маркеров

Финансирование: работа выполнена в рамках Государственного задания ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА России на период 2019–2020 г.

Благодарности: авторы благодарят заместителя директора по качеству АО НПО «Микроген» А. Ю. Богданова за консультацию в области контроля качества при производстве биомедицинских клеточных продуктов.

Вклад авторов: А. В. Еремеев — общее руководство написания обзора; О. А. Зубкова — сбор информации; Е. С. Ручко — сбор информации, оформление списка литературы; М. А. Лагарькова — редактирование статьи; В. С. Сидоров — анализ рынка биомедицинских клеточных продуктов; А. О. Рагозин — анализ информации по клиническим испытаниям.

✉ **Для корреспонденции:** Артём Валерьевич Еремеев
ул. Малая Пироговская, д. 1а, 119435, г. Москва; art-eremeev@yandex.ru

Статья получена: 02.09.2020 **Статья принята к печати:** 02.10.2020 **Опубликована онлайн:** 19.11.2020

DOI: 10.47183/mes.2020.014

KEY PARAMETERS OF AUTOLOGOUS BIOMEDICAL PRODUCT FOR CARTILAGE TISSUE REPAIR

Eremeev AV¹✉, Zubkova OA¹, Ruchko ES^{1,2}, Lagarkova MA¹, Sidorov VS¹, Ragozin AO¹

¹ Federal Research and Clinical Center of Physical and Chemical Medicine, FMBA, Moscow, Russia

² Moscow Timiryazev Agricultural Academy, Moscow, Russia

Repair of cartilage defects associated with injury or pathology is a clinically relevant problem. Chondral tissue, especially articular cartilages, has a poor regenerative potential. Inflammation triggers the growth of connective tissue, which cannot exert the normal function of the hyaline cartilage. This contributes to the progression of the pathology and eventually raises the need for surgery. At present, there are no pharmaceutical drugs capable of restoring the damaged cartilage. However, advances in cell-based technology hold promise for regenerative medicine. Reports describing fabrication of autologous cartilage transplants pose a special interest. A registration dossier of a biomedical cell product must contain the product's specifications, presenting the basic characteristics of the product that can be used to assess its quality. This review looks at a few basic parameters that can be used to verify the authenticity of the cell product derived from autologous chondrocytes and describe its specifications.

Keywords: chondrocytes, donor tissue, biomedicine, cell product, cell culture, biomarker expression

Funding: this work was part of the State Assignment for the Federal Research and Clinical Center of Physical and Chemical Medicine (2019–2020).

Acknowledgements: we thank Bogdanov AYU, quality assurance deputy director of Microgen Research and Production Association for his consultation on quality control in the production of biomedical cell products.

Author contribution: Eremeev AV — supervision; Zubkova OA — data acquisition; Ruchko ES — data acquisition, references; Lagarkova MA — editing; Sidorov VS — market analysis; Ragozin AO — analysis of published clinical studies.

✉ **Correspondence should be addressed:** Artyom V. Eremeev
Malaya Pirogovskaya, 1a, 119435, Moscow; art-eremeev@yandex.ru

Received: 02.09.2020 **Accepted:** 02.10.2020 **Published online:** 19.11.2020

DOI: 10.47183/mes.2020.014

Реконструкция структуры функционального гиалинового хряща является сложной задачей в силу гистологического строения хряща, отсутствия кровоснабжения, незначительного регенераторного потенциала ткани, особенно у пациентов пожилого возраста. На сегодняшний день биомедицинским сообществом отмечается, что данную проблему можно решить комплексным подходом с использованием клеточных технологий, новых материалов, методов генетической инженерии, ростовых факторов и гормонов, лекарственных препаратов [1, 2].

Восстановление суставного хряща после травматического повреждения и при развитии посттравматического артроза является одним из ведущих направлений в ортопедии, требующих особого внимания. Растет число хирургических операций при челюстно-лицевой и пластической хирургии, которые тоже часто приводят к необходимости восстановления хрящевой ткани, в частности, по данным VADEMECUM, в России ежегодно проводят более 21 000 ринопластик. Что касается возможностей применения имплантов на основе

хондроцитов для челюстно-лицевой пластической хирургии (коррекции дефектов носа, ушей, в том числе и микротии), а также вследствие травмирования, то нужно отметить, что на долю повреждения хрящевой ткани в результате травм приходится более 10% всей травматологической патологии, причем в подавляющей части случаев страдает нижняя челюсть. Возрастной диапазон пациентов широк, но, по подсчетам ISAPS (International society for aesthetic plastic surgery), 65% операций ринопластики приходится на пациенток 19–34 лет. Операции (особенно многократные) требуют применения синтетических имплантов, которые вызывают отсроченные иммунологические или воспалительные реакции в 10–16% случаев [3].

Ряд компаний уже сейчас проводит клинические испытания своих продуктов для нужд реконструктивной хирургии. Университетский госпиталь в г. Базель, Швейцария (University Hospital, Basel, Switzerland), с помощью биоинженерии разрабатывает носовой хрящ для реконструкции крыльев носа (клиническое исследование, идентификатор ClinicalTrials.gov: NCT01242618). Статус продукта: клинические испытания, завершена фаза I на пяти пациентах, т. е. исследование безопасности и пригодности транспланта, полученного культивированием аутологичных назосептальных хондроцитов в коллагеновом матриксе, для реконструкции крыльев носа у пациентов с немеланомным раком кожи. Природа продукта: аутологичные назосептальные хондроциты человека в коллагеновом матриксе (коллаген I/III, полученный из свиньи).

Большинство разработчиков использует многокомпонентные системы для создания хрящевых продуктов аутологичной природы, пригодных для трансплантации. Так, применение факторов роста фибробластов FGF-2 и BMP-2 при культивировании хондроцитов *in vitro* позволяет сохранять их хондрогенный потенциал и улучшать размер и качество биоинженерного хрящевого конструкта. Хондроциты, размноженные в присутствии FGF-2 и культивированные *in vitro* в трехмерном (3D) биodeградируемом матриксе (полигликолиевой кислоте, PGA) в течение шести недель, формировали хрящ, в котором количество клеток было в 3,7 раз больше, чем в аналогичном эксперименте без FGF-2, вес хряща — в 4,2 раза больше, содержание гликозаминогликанов — в 2,8 раза выше. Хрящ, образованный в присутствии костного морфогенетического белка BMP-2 хондроцитами, пассированными в среде с FGF-2, содержал в 1,5 раза больше гликозаминогликанов и имел более гомогенное их распределение, чем аналогичный хрящ, полученный без BMP-2 [4]. Для получения хрящевого транспланта соответствующего размера и обладающего лучшими механическими свойствами необходимо прекультивирование хондроцитов в течение двух недель перед имплантацией.

В другом исследовании назосептальные хондроциты человека от четырех доноров после экспансии были высажены на матрикс (Hyaff-11) и культивированы *in vitro* в течение двух или четырех недель, после чего конструкт был имплантирован подкожно иммунодефицитным мышам. Через две недели созревания *in vivo* характеристики эластичности хряща были в 2,7 раза выше, чем у хряща, имплантированного без прекультивирования *in vitro* [5]. Для культивирования назосептальных хондроцитов человека и формирования хрящевой ткани в отсутствие фетальной бычьей сыворотки (FBS) может быть использована аутологичная сыворотка крови человека. Гистологический, иммуногистохимический и биохимический анализы

пролиферации клеток и содержания гликозаминогликанов и коллагена II показали отсутствие существенных различий при культивировании с разными сыворотками [6]. Между тем, использование аутологичной сыворотки снижает стоимость культивирования и нивелирует риски, связанные с возможной иммуногенностью остатков FBS и риском контаминации недетектируемыми агентами (такими как прионы, вызывающие губчатую энцефалопатию).

К преимуществам аутологичных трансплантов (в случае взятия кусочка хряща с целью получения продукта для самого же пациента) относят высокую долговременную выживаемость, доступность и иммунотолерантность. К недостаткам — риск осложнений донорской зоны и резорбции в течение времени. Наиболее частым осложнением является изменение формы транспланта, характерное преимущественно для трансплантов из реберных хрящей [7]. Обычно транспланты имеют различную форму от прямоугольной до сложной трапециевидной и овальной. Их размеры варьируют от 1–2 мм до нескольких квадратных сантиметров. Выкраивание и подгонку трансплантов проводят непосредственно при выполнении оперативного вмешательства из заготовок. Для сворачивания и изгибания трансплантов (если необходимо) на них наносятся насечки. Транспланты могут быть наложены в два и более слоев для повышения прочности. Транспланты из эластического хряща уха можно сворачивать для повышения жесткости [8]. Оптимальная толщина транспланта составляет 1–1,5 мм. При использовании транспланта для спинки носа кусочки хряща по 1 мм³ заворачивают в вискозу (Surgicel), широкую фасцию бедра или височную фасцию и моделируют в подготовленном ложе для транспланта. «Незавернутые» в фасцию транспланты могут пролиферировать и накапливать коллаген после пересадки [9], но могут проявлять склонность к рассасыванию. При гистологическом исследовании извлеченных «завернутых» трансплантов была выявлена выраженная воспалительная реакция [10].

Трансплант хряща, полученный при помощи клеточных технологий, имеет следующие явные преимущества: сокращение объема донорского материала и увеличение размеров транспланта до необходимых. Это преимущество особенно актуально при поведении вторичных операций, когда донорская зона уже использована [8] или целью операции становится закрытие дефекта при условии, когда уже неоткуда брать материал [11]. Использование технологии, позволяющей получить хрящ, соответствующий природному, без забора большого количества биологического материала, позволит уменьшить число этапов оперативного вмешательства (например, при коррекции микротии их насчитывается от двух до пяти), улучшить косметический эффект и уменьшить трудоемкость. Предполагается, что хрящ должен повторять нативный по размерам, форме и механическим свойствам.

Остеоартроз (ОА) — самое частое заболевание суставов, которым страдает не менее 20% населения земного шара. Обычно оно начинается в возрасте старше 40 лет. Рентгенологические признаки остеоартроза обнаруживают у 50% людей в возрасте 55 лет и у 80% — старше 75 лет. Остеоартроз коленного сустава (гонартроз) чаще развивается у женщин, а тазобедренного сустава (коксартроз) — у мужчин [12]. Согласно данным Всемирной организации здравоохранения, ОА коленного и тазобедренного суставов является 11-й ведущей причиной инвалидности и число страдающих ОА растет [13]. По

некоторым данным, ОА коленного сустава составляет 83% от общей заболеваемости ОА [14]. Тенденция к демографическому старению населения увеличивает распространенность ОА.

В настоящее время отсутствуют эффективные неинвазивные и малотравматичные способы для патогенетического лечения гонартроза. По большей части, представлены продукты на основе гиалуроновой кислоты (медицинские изделия — протез синовиальной жидкости). Как правило, такая симптоматическая терапия через несколько лет приводит к необходимости протезирования коленного сустава (33 000 операций в России в 2017 г., по данным Global Data), которое осуществляется как высокотехнологичная медицинская помощь. В зависимости от модели протеза ревизия сустава (т. е. повторная операция по замене изнашивающихся элементов) необходима через 5–10 лет, срок службы сустава составляет около 15 лет. ОА тазобедренного сустава часто приводит к некрозу головки бедренной кости, основным методом лечения которого становится эндопротезирование тазобедренного сустава, что нежелательно в молодом возрасте. Операция эндопротезирования тазобедренного сустава дорогостоящая и травматичная, к тому же почти для 40% больных в течение 10 лет необходимо повторное вмешательство. В случае отсутствия хирургической помощи иммобилизация ведет к высокой смертности в течение года.

На сегодняшний день, помимо классических хирургических способов стимуляции восстановления суставного хряща с помощью субхондрального сверления, абразивной артропластики, рядом компаний разработаны клеточные продукты по регенерации хрящевой ткани. Часть из них уже на рынке, другие находятся на разных стадиях клинических испытаний. В ЕС в 2017 г. выведен продукт Spherex (CO.DON AG), представляющий собой аутологичные культивированные хондросферы, содержащие хондроциты. Продукт показан только при свежих травмах коленного сустава площадью не более 10 см² и имеет существенные недостатки: для его производства необходимо выполнение артроскопии (для забора биоматериала), для введения продукта необходима повторная артроскопия. Эффективность продукта при остеоартрозе не показана в сравнительных клинических исследованиях. Другие клеточные препараты представлены различными аллогенными или аутологичными производными мезенхимных стволовых клеток (МСК) из жировой ткани или костного мозга, среди которых: Elixocyte — культивированные аллогенные МСК жировой ткани, фаза 1/2 (UnicoCell Biomed CO.; Тайвань); Regenexx-SD — продукт на основе некультивированных клеток, полученных из костного мозга (Regenerative Sciences, LLC; США); ReJoin — мезенхимальные стромальные клетки жировой ткани, фаза 2 (Cellular Biomedicine Group; США); RegStem — культивированные аутологичные мезенхимальные стромальные клетки, фаза 1 (EMO Biomedicine Corporation; Тайвань); JointStem — аутологичные мезенхимальные стромальные клетки, выделенные из жировой ткани, фаза 2 (Nature Cell Co. Ltd., Корея); StroMed — стромально-васкулярная фракция жировой ткани (механическое выделение), фаза 2 (VivaTech International, Inc., Нидерланды). Как правило, применение этих препаратов эффективно на самых ранних этапах развития остеоартроза, с минимально или отсутствующими клиническими проявлениями. Такая эффективность обусловлена особенностью хрящевой ткани, состоящей из

обильного внеклеточного матрикса с низким содержанием функциональных клеток — хондроцитов, обладающих низкой пластичностью и пролиферативной активностью, из-за чего хрящевая ткань не заживает самопроизвольно в физиологических условиях.

Ключевые требования к биологическому материалу и обзор протоколов выделения клеток

Источником биологического материала для продукта служит гиалиновый хрящ суставной, перегородки носа, хрящ уха или хрящ ребра. Продукт должен быть доступен для извлечения, если возникнет необходимость, и не должен необратимо интегрироваться в окружающие ткани [3]. Одним из основных требований к продукту является неизменность размеров и формы в течение длительного времени после трансплантации. Необходимо исключить как рост хряща без изменения структуры, так и изменение формы хряща, которое может повлечь формирование «боссов» (видимых неровностей). Трансплант не должен фиброзироваться или рассасываться. Для этого продукт должен содержать только хондроциты с низким потенциалом роста и не содержать хондробластов. В то же время гистологическая структура полученного хряща должна соответствовать структуре зрелого хряща.

Хрящ целесообразнее забирать без надхрящницы, что обеспечит постоянство клеточного состава. Однако граница между хрящем и надхрящницей нечеткая и некоторое число хондробластов неизбежно окажется в биологическом материале [15]. Хрящ имеет два слоя, различимых при микроскопии. Для поверхностного слоя характерно наличие удлинённых фибробластоподобных клеток, расположенных параллельно поверхности. Этот слой содержит относительно много коллагена первого типа. Во внутренней зоне расположены группы круглых клеток.

Таким образом, если задача состоит в преимущественном культивировании хондробластов, необходима короткая инкубация с ферментами для растворения поверхностного слоя и использование открепившихся клеток без измельчения хряща. В случае если необходимо дальнейшее культивирование хондроцитов, нужно удалить клетки, получившиеся при преинкубации с ферментами, затем измельчить хрящ и продолжить инкубацию с ферментами в течение нескольких часов по методике, описанной ранее [16], или схожей. Показано, что выход клеток после обработки хряща связан с возрастом и увеличивается по мере старения [17], что, скорее всего, связано со снижением плотности внеклеточного матрикса. Доля жизнеспособных выделенных клеток одинакова во всех возрастах. При производстве продукта существует возможность делать до четырех пассажей клеток в монослое [18] (при двукратном удвоении числа клеток в каждом пассаже).

Технологические подходы к получению клеточных продуктов на основе хондроцитов

В хряще относительно немного клеток по отношению к межклеточному веществу (5–10% объема). Фактически, необходимо вырастить пластину хряща площадью, сопоставимой с размером дефекта хряща, аналогично получению продукта для терапии коленного сустава по технологии хондросфер Co.don. Глубина дефекта хряща коленного сустава, подлежащего терапии по технологии

Co.don, соответствует толщине пластины хряща для ринопластики (1–1,5 мм). Таким образом, можно использовать отработанную технологию измельчения и культивирования. Экстраполируя данные Co.don, на этапе наращивания хрящевой ткани необходимо использовать около 40×10^6 хондроцитов (50 хондросфер на 1 см^2 дефекта коленного сустава, 4 см^2 площадь хрящевой пластины и дефекта, 200 000 клеток на хондросферу). Из 1 г хряща носовой перегородки можно получить до $1\text{--}1,5 \times 10^6$ клеток [16]. Авторы одной из работ использовали преинкубацию хрящей носовой перегородки без надхрящницы с проназой или гиалуронидазой и последующую деструкцию коллагеназой II. Оптимальная плотность посева для размножения и сохранения жизнеспособности в течение 10 дней — 1×10^5 клеток на флакон.

При культивировании клеток из поверхностного слоя хряща перегородки через 10 дней культивирования на агарозе они начинают утрачивать веретенообразную форму фибробластов, становятся более овальными и окрашиваются сафранином O. Соотношение между экспрессией коллагена II типа и коллагена I типа увеличивается по мере созревания в среде без стимулирующих факторов. Авторы полагают, что использование хондрогенных факторов (TGF β и BMP) необязательно для успешной дифференцировки в хондроциты [15]. Однако, по мнению других исследователей, данные факторы повышают хондрогенный потенциал хондроцитов в культуре [19].

Применение аутологичной сыворотки способно положительно влиять на пролиферацию хондроцитов [20]. Использование дополнительно 50 нг/мл CCN2/CTGF (CCN family 2/connective tissue growth factor) способно в 1,5 раза увеличить пролиферацию хондроцитов уха кролика и синтез ими протеогликанов по сравнению со средой, содержащей только 10%-ю сыворотку [21]. Культивирование хондроцитов при низком содержании кислорода в биореакторе способствует их более быстрой дифференцировке. Наибольшая дифференцировка была достигнута при OD 5% (1% кислорода в жидкой фазе) [22].

Большинство используемых технологий включает два этапа выращивания хряща: наращивание клеток в монослое (первый пересев примерно через 14 дней, в некоторых случаях 6–8); создание трехмерного продукта. Целесообразность выращивания на первом этапе клеток в монослое заключается в их дедифференцировке при стимулировании пролиферации. Использование более четырех пассажей не целесообразно из-за последующих затруднений с дифференцировкой клеток и склонности их к апоптозу [23].

Вторым этапом следует создание трехмерного конструкта (еще около 7 дней) при помощи матрицы из биосовместимых волокнистых полимеров (полигликолевой кислоты и др.) или при помощи застывающих полимеров (альгинат, ARC-технология). Авторы, использующие объемные матрицы, полагают, что хондробласты, прикрепляющиеся к волокнам трехмерной матрицы, легче формируют трехмерную структуру хряща и дифференцируются в зрелые хондроциты [23]. ARC-технология позволяет клеткам с фибробластоподобным фенотипом быстрее созревать и вырабатывать межклеточный матрикс [24].

Так, для реконструкции хряща уха использовали плотную пористую матрицу HAp/ChS (collagen, hydroxyapatite и chondroitinsulfate) [25], которой можно придать соответствующую форму и посадить клетки

в объеме матрицы. Культивирование происходит во вращающемся биореакторе.

Между тем, авторы отмечают, что потери клеток при посадке на матрицу значительны и достигают 75%. Принимая во внимание соотношение клеток и межклеточного вещества в хряще, основное внимание при обработке процессов культивирования должно быть обращено не столько на увеличение числа клеток, сколько на стимулирование синтеза межклеточного вещества. Пока, несмотря на предпринятые усилия, биомеханические свойства хряща не достигают показателей, свойственных нормальному хрящу.

Рядом исследователей была разработана технология трехмерного культивирования хондроцитов без использования биосовместимых полимеров. Используя метод многоуровневого наложения монослоев хондроцитов, авторам удалось добиться получения клеточного продукта с характеристиками, приближенными к таковым у хрящевой ткани ушной раковины [26–28].

Следует отметить, что данная технология прошла испытания на безопасность и уже применяется в клиниках Японии для коррекции дефектов хряща (лечение прошли уже более 100 пациентов).

Иногда в процедуру выращивания хряща добавляют третий этап — созревание хряща *in vivo* в иммунодефицитных (nude) мышах. Несмотря на возможные преимущества данного метода в создании хряща нужной структуры автоматически, это накладывает существенные ограничения на массовое использование продукта, поскольку требует гарантированного отсутствия тканей мышей в продукте, что сложно гарантировать и определять. При необходимости, однако, возможен мониторинг созревания транспланта в теле реципиента (например, при применении продукта из хряща уха для пластики микротии).

Возможно обойтись без этапа предварительного наращивания клеток путем посева их после выделения непосредственно на матрицу. Так, было проведено гистологическое исследование конструкта на основе PGA через 28 дней культивирования [29]. Иммуногистохимически определяли коллаген, исследовали клеточность (содержание ДНК) и содержание сульфатированных гликозаминогликанов (sGAG, гистохимически тулоидиновым синим). При пассаже 0 (посев выделенных клеток непосредственно на PGA) по химическому составу хряща был сходен с хрящом, полученным с использованием технологии с предварительным наращиванием клеток, и даже несколько превосходил последний по клеточности и содержанию sGAG. Однако клеток, полученных из цельного хряща носовой перегородки одного человека, не хватило для создания конструкта.

Хондроциты могут образовывать хрящеподобную структуру и без матрицы. Однако наращивание хрящевой ткани идет крайне медленно. При посеве $1,6 \times 10^5$ клеток хряща сустава на 1 см^2 и при культивировании в течение 10 недель толщина конструкта составила около 291 мкм, причем 77 мкм пришлось на обызвествленные ткани [30].

Определение основных маркеров для контроля качества разрабатываемого продукта

Морфологически при культивировании в монослое клетки имеют вытянутую форму и хондробластоподобный фенотип. При культивировании клеток в культуре высокой плотности в трехмерных конструктах клетки округляются и становятся больше похожими на хондроциты. На 7-й день культивирования в культуре высокой плотности

на объемной матрице клетки становятся круглыми, имеют большие эухроматические ядра с несколькими ядрышками и хорошо структурированную цитоплазму. В первый день культивирования на объемной волокнистой матрице в клетках можно обнаружить многочисленные межклеточные контакты. По периферии матрицы клетки более сферичны, в глубине они более уплощены. На 7-й день культивирования в матрице можно выявить узелки (лакуны) образования хряща [23]. В культуре клеток, полученных из хряща носовой перегородки, иммуноцитохимически определена экспрессия CD44 и коллагена II типа при значительно меньшей экспрессии коллагена I типа и агрекана [16].

Выделенные из хрящевой ткани человека хондроциты экспрессируют CD105, CD44 и CD73 и негативны по CD146. Гиалуроновый рецептор CD44 значительно экспрессируется в молодой ткани. Его экспрессия снижается по мере уплотнения хряща. Обнаружена экспрессия РНК Sox-9 гена, который считают маркером хондрогенеза. Не выявлена экспрессия маркера оксификации РНК SBFA-1 [15].

В ходе исследования формирования трехмерного клеточного конструкта рекомендуется определять степень выработки межклеточного вещества по содержанию гликозаминогликанов (GAG) из-за их относительно большого количества, в отличие от коллагена, и относительно более раннего начала синтеза. В среднем через две недели культивирования содержание GAG составляло 7 мкг на 40 000 посеянных клеток [31].

Степень дифференцировки хондроцитов можно определять при помощи коммерчески доступных моноклональных антител [32]. Исследованы также поверхностные маркеры зрелых и незрелых хондроцитов, позволяющие определять степень их созревания в процессе культивирования. Наиболее специфичной для незрелых хондроцитов и хондробластов считают экспрессию CD44 и интегрина альфа 5 [33]. Определяют также наличие или отсутствие таких маркеров, как коллаген 1-го и 2-го типов, S100, агрекан, sox 6, 9 [34], cartilage-expressed gene 1, или CRTAC 1 [35], Ca²⁺ release-activated Ca²⁺ канал [36].

Ключевые характеристики биомедицинского клеточного продукта

Примерные нормы биохимического состава хряща для человека в возрасте 45–47 лет следующие (на 1 г хрящевой ткани): 83–88 мг коллагена; 27–29 мг сульфатированных гликозаминогликанов, 25–26 млн клеток [29].

Гистологически клетки нормального хряща представлены только хондроцитами, различающимися по форме и метаболической активности. Сферичность клеток нарастает по направлению от поверхности к глубине хряща. В том же направлении уменьшается соотношение количества клеток и межклеточного вещества, возрастает содержание коллагена. Коллаген представлен коллагеном 3-го типа. Коллаген 1-го типа практически отсутствует [37].

В исследованиях PoC по созданию хряща трахеи из носового хряща овцы проводили сравнительные гистологические исследования хрящевого трехмерного продукта, окрашенного гематоксилином и эозином и сафранином O. Было выявлено лакунарное расположение клеток хряща в окружении межклеточного вещества. Основным биомеханическим свойством хряща является давление сжатия (компрессия), которое колеблется от 0,44

до 0,7 МПа в зависимости от направления сжатия. При хранении хряща давление сжатия повышается примерно на 50% за месяц [38, 39]. В другой работе образцы показали в лучшем случае давление 0,0056 МПа, что далеко от свойств нативного хряща [40]. При использовании той же технологии, но включающей созревание конструкта в *in vivo* мышцах, хрящ через 30 дней культивирования в мышцах сформировался более плотным.

Для исследования степени восстановления формы полоску конструкта, полученного по ARC-технологии с культивированием на мембране в течение 10 недель, 10 × 2 × 1 мм помещали в контролируемых условиях окружающей среды под нагрузку до проминания на 5 мм и затем исследовали угол между краями полоски через 0, 2 и 24 ч после снятия груза. Фактически измеряли степень утраты формы, выраженную в процентах, где 0% — полное восстановление формы (угол между краями полоски достигает 180°). Степень утраты формы сравнивали с нативным хрящом. Различия не были достоверными [41]. Динамическая цилиндрическая жесткость (жесткость на изгиб при изменяющейся нагрузке) составила в конструкте 0,014 ± 0,019 Н/мм, что меньше, чем в нативном хряще (0,19 ± 0,15 Н/мм) [42], и содержание общего гидроксипролина в продукте было схожим с содержанием в нативном хряще.

Содержание GAG в конструкте, полученном по ARC-технологии, составляло в среднем 0,318 нг/кл. Содержание коллагена 2-го типа составляло в среднем 0,2 мкг/мг влажного веса конструкта, в то же время коллаген 1-го типа почти не определялся. При созревании продукта в иммунодефицитных мышцах содержание GAG на 1 мг влажного конструкта составляло примерно 10,74 мкг/мг до культивирования в мышцах, 8,86 мкг/мг — после 30 дней культивирования, 2,73 мкг/мг — после 60 дней культивирования. Содержание коллагена 2-го типа составило 0,02 мкг/мг влажного веса до культивирования в мышцах, 0,78 мкг/мг — после 30 дней культивирования в мышцах и 1,44 мкг/мг — после 60 дней. Уровень коллагена 1-го типа был ниже порога определения, как и в нативном хряще. Живых клеток в конструкте было более 90%. Механические свойства конструкта все же были далеки от свойств нативного хряща [40].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Существующие проблемы требуют разработки специализированных протоколов, увеличивающих выход клеток из процессируемого донорского материала, пригодных для дальнейшего культивирования. Протоколы культивирования должны приводить к получению продукта, максимально приближенного по морфологическим, молекулярным (с экспрессией гликозаминогликанов, коллагена 2-го типа, агрекана), физиологическим и механическим свойствам к нативному хрящу. Работа с аутологичным материалом хоть и требует дорогостоящих техник для нивелирования риска кросс-контаминации и слабо масштабируется, тем не менее, позволяет получить продукт с минимальным риском иммунологических реакций и инфекций. Разработка технологии получения имплантов, подобных гиалиновому хрящу, позволяющих быстро восстанавливать функции хрящевой ткани, быстро нагружать сустав и минимизировать затраты на лечение, является актуальной задачей [43].

В заключение можно сказать, что продукт для коррекции хрящевой ткани целесообразно получать по технологии 3D-культивирования — при последовательном

многоуровневом наложении хондроцитов или при сворачивании 2D-культуры в сфероиды с последующим дозреванием *in vitro*, либо при комбинации этих методов. В этом случае хондроциты сохраняют свое зрелое дифференцированное состояние и нарабатывают

межклеточный матрикс. Для продукта с таким составом нет необходимости использовать дополнительные матрицы, которые требуют увеличения объема доклинических исследований, усложняют технологию и увеличивают стоимость продукта.

Литература

- Madeira C, Santhagunam A, Salgueiro JB, Cabral JM. Advanced cell therapies for articular cartilage regeneration. *Trends Biotechnol.* 2015; 33 (1): 35–42.
- Atsuyuki I, Takashi I, A Hari Reddi. Human Stem Cells and Articular Cartilage Regeneration. *Cells.* 2012; 1 (4): 994–1009.
- Romo T, Kwak ES. Nasal grafts and implants in revision rhinoplasty. *Facial Plast Surg Clin North Am.* 2006; 14 (4): 373–87.
- Fulco I, Largo RD, Miot S, Wixmerten A, Martin I, Schaefer DJ, et al. Toward clinical application of tissue-engineered cartilage. *Facial Plast Surg.* 2013; 29 (2): 99–105.
- Martin I, Suetterlin R, Baschong W, Heberer M, Vunjak-Novakovic G, Freed LE. Enhanced cartilage tissue engineering by sequential exposure of chondrocytes to FGF-2 during 2D expansion and BMP-2 during 3D cultivation. *J Cell Biochem.* 2001; 83 (1): 121–8.
- Farhadi J, Fulco I, Miot S, Wirz D, Haug M, Dickinson SC, et al. Precultivation of engineered human nasal cartilage enhances the mechanical properties relevant for use in facial reconstructive surgery. *Ann Surg.* 2006; 244 (6): 978–85.
- Immerman S, White WM, Constantinides M. Cartilage grafting in nasal reconstruction. *Facial Plast Surg Clin North Am.* 2011; 19 (1): 175–82.
- Echevery A, Carvajal J, Medina E. Alternative technique for tip support in secondary rhinoplasty. *Aesthet Surg J.* 2006; 26 (6): 662–8.
- Yılmaz S, Erçöçen AR, Can Z, Yenidünya S, Edali N, Yormuk E. Viability of diced, crushed cartilage grafts and the effects of Surgicel (oxidized regenerated cellulose) on cartilage grafts. *Plast Reconstr Surg.* 2001; 108 (4): 1054–60.
- Fatemi MJ, Hasani ME, Rahimian S, Bateni H, Pedram M, Mousavi SJ. Survival of block and fascial-wrapped diced cartilage grafts: an experimental study in rabbits. *Ann Plast Surg.* 2012; 69 (3): 326–30.
- Yenigun A, Meric A, Verim A, Ozucer B, Yasar H, Ozkul MH. Septal perforation repair: mucosal regeneration technique. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 2012; 269 (12): 2505–10.
- Галушко Е. А., Эрдес Ш. Ф., Алексеева Л. И. Остеоартроз в амбулаторной практике. *Современная ревматология.* 2012; 6 (4): 66–70.
- Lohmander LS. Knee replacement for osteoarthritis: facts, hopes, and fears *Medicographia.* 2013; 35: 181–8.
- Vos T, et al. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 301 acute and chronic diseases and injuries in 188 countries, 1990–2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet.* 2015; 386 (9995): 743–800.
- Amaral RJ, Pedrosa Cda S, Kochem MC, Silva KR, Aniceto M, et al. Isolation of human nasoseptal chondrogenic cells: a promise for cartilage engineering. *Stem Cell Res.* 2012; 8 (2): 292–9.
- Oseni AO, Butler PE, Seifalian AM. Optimization of chondrocyte isolation and characterization for large-scale cartilage tissue engineering. *J Surg Res.* 2013; 181 (1): 41–8.
- Rotter N, Bonassar LJ, Tobias G, Lebl M, Roy AK, Vacanti CA. Age dependence of cellular properties of human septal cartilage: implications for tissue engineering. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 2001; 127 (10): 1248–52.
- Haisch A, Marzahn U, Mobasher A, Schulze-Tanzil G, Shakibaei M. Development and phenotypic characterization of a high density in vitro model of auricular chondrocytes with applications in reconstructive plastic surgery. *Histol Histopathol.* 2006; 21 (5): 467–76.
- Timur U, Caron M, Akker G, Windt A, Visser J, Rhijn L, et al. Increased TGF- β and BMP levels and improved chondrocyte-specific marker expression in vitro under cartilage-specific physiological osmolality. *Int J Mol Sci.* 2019; 20 (4): 795.
- Tallheden T, Lee J, Brantsing C, Månsson JE, Sj-gren-Jansson E, Lindahl. A Human serum for culture of articular chondrocytes. *Cell Transplant.* 2005; 14 (7): 469–79.
- Fujisawa T, Hattori T, Ono M, Uehara J, Kubota S, Kuboki T, et al. CCN family 2/connective tissue growth factor (CCN2/CTGF) stimulates proliferation and differentiation of auricular chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage.* 2008; 16 (7): 787–95.
- Malda J, Blitterswijk CA, Geffen M, Martens DE, Tramper J, Riesle J. Low oxygen tension stimulates the redifferentiation of dedifferentiated adult human nasal chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage.* 2004; 12 (4): 306–13.
- Haisch A, Marzahn U, Mobasher A, Schulze-Tanzil G, Shakibaei M. Development and phenotypic characterization of a high density in vitro model of auricular chondrocytes with applications in reconstructive plastic surgery. *Histol Histopathol.* 2006 May; 21 (5): 467–76.
- Masuda K, Sah RL, Hejna MJ, Thonar EJ. A novel two-step method for the formation of tissue-engineered cartilage by mature bovine chondrocytes: the alginate-recovered-chondrocyte (ARC) method. *J Orthop Res.* 2003; 21 (1): 139–48.
- Ohyabu Y, Adegawa T, Yoshioka T, Ikoma T, Shinozaki K, Uemura T, et al. A collagen sponge incorporating a hydroxyapatite/chondroitinsulfate composite as a scaffold for cartilage tissue engineering. *J Biomater Sci Polym.* 2009; 20 (13): 1861–74.
- Yanaga H, et al. Clinical application of cultured autologous human auricular chondrocytes with autologous serum for craniofacial or nasal augmentation and repair. *Plast Reconstr Surg.* 2006; 117: 2019–30.
- Yanaga H, Imai K, Fujimoto T, Yanaga K. Generating ears from cultured autologous auricular chondrocytes by using two-stage implantation in treatment of microtia. *Plast Reconstr Surg.* 2009; 124: 817–25.
- Yanaga H, Imai K, Yanaga K. Generative surgery of cultured autologous auricular chondrocytes for nasal augmentation. *Aesthetic Plast Surg.* 2009; 33: 795–802.
- Homicz MR, Schumacher BL, Sah RL, Watson D. Effects of serial expansion of septal chondrocytes on tissue-engineered neocartilage composition. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 2002; 127 (5): 398–408.
- Yu H, Grynepas M, Kandel RA. Composition of cartilagenous tissue with mineralized and non-mineralized zones formed in vitro. *Biomaterials.* 1997; 18 (21): 1425–31.
- Alexander TH, Sage AB, Chen AC, Schumacher BL, Shelton E, Masuda K, et al. Insulin-like growth factor-I and growth differentiation factor-5 promote the formation of tissue-engineered human nasal septal cartilage. *Tissue Eng Part C Methods.* 2010; 16 (5): 1213–21.
- Osch GJ, Veen SW, Marijnissen WJ, Verhaar JA. Monoclonal antibody 11-fibrau: a useful marker to characterize chondrocyte differentiation stage. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001; 280 (3): 806–12.
- Kobayashi S, Takebe T, Zheng YW, Mizuno M, Yabuki Y, Maegawa J, et al. Presence of cartilage stem/progenitor cells in adult mice auricular perichondrium. *PLoS One.* 2011; 6 (10): e26393.
- Outani H, Okada M, Yamashita A, Nakagawa K, Yoshikawa H, Tsumaki N. Direct induction of chondrogenic cells from human dermal fibroblast culture by defined factors. *PLoS One.* 2013; 8 (10): e77365.
- Crowe N, Swingler TE, Le LT, Barter MJ, Wheeler G, Pais H, et al. Detecting new microRNAs in human osteoarthritic chondrocytes

- identifies miR-3085 as a human, chondrocyte-selective, microRNA. *Osteoarthritis Cartilage*. 2016; 24 (3): 534–43.
36. Liu S, Takahashi M, Kiyoi T, Toyama K, Mogi M Genetic manipulation of calcium release-activated calcium channel 1 modulates the multipotency of human cartilage-derived mesenchymal stem cells. *J Immunol Res*. 2019; 2019: 7510214.
 37. Popko M, Bleys RL, De Groot JW, Huizing EH. Histological structure of the nasal cartilages and their perichondrial envelope. I. The septal and lobular cartilage. *Rhinology*. 2007; 45 (2): 148–52.
 38. Richmon JD, Sage A, Wong VW, Chen AC, Sah RL, Watson D. Compressive biomechanical properties of human nasal septal cartilage. *Am J Rhinol*. 2006; 20 (5): 496–501.
 39. Glasgold MJ, Kato YP, Christiansen D, Hauge JA, Glasgold AI, Silver FH. Mechanical properties of septal cartilage homografts. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 1988; 99 (4): 374–9.
 40. Chang AA, Reuther MS, Briggs KK, Schumacher BL, Williams GM, Corr M, et al. In vivo implantation of tissue-engineered human nasal septal neocartilage constructs: a pilot study. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 2012; 146 (1): 46–52.
 41. Reuther MS, Briggs KK, Neuman MK, Masuda K, Sah RL, Watson D. Shape fidelity of native and engineered human nasal septal cartilage. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 2013; 148 (5): 753–7.
 42. Caffrey JP, Kushnaryov AM, Reuther MS, Wong VW, Briggs KK, Masuda K, et al. Flexural properties of native and tissue-engineered human septal cartilage. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 2013; 148 (4): 576–81.
 43. Zou J, Bai B, Yao Y. Progress of co-culture systems in cartilage regeneration. *Expert Opin Biol Ther*. 2018; 18 (11): 1151–8.

References

1. Madeira C, Santhagunam A, Salgueiro JB, Cabral JM. Advanced cell therapies for articular cartilage regeneration. *Trends Biotechnol*. 2015; 33 (1): 35–42.
2. Atsuyuki I, Takashi I, A Hari Reddi. Human Stem Cells and Articular Cartilage Regeneration. *Cells*. 2012; 1 (4): 994–1009.
3. Romo T, Kwak ES. Nasal grafts and implants in revision rhinoplasty. *Facial Plast Surg Clin North Am*. 2006; 14 (4): 373–87.
4. Fulco I, Largo RD, Miot S, Wixmerten A, Martin I, Schaefer DJ, et al. Toward clinical application of tissue-engineered cartilage. *Facial Plast Surg*. 2013; 29 (2): 99–105.
5. Martin I, Suetterlin R, Baschong W, Heberer M, Vunjak-Novakovic G, Freed LE. Enhanced cartilage tissue engineering by sequential exposure of chondrocytes to FGF-2 during 2D expansion and BMP-2 during 3D cultivation. *J Cell Biochem*. 2001; 83 (1): 121–8.
6. Farhadi J, Fulco I, Miot S, Wirz D, Haug M, Dickinson SC, et al. Precultivation of engineered human nasal cartilage enhances the mechanical properties relevant for use in facial reconstructive surgery. *Ann Surg*. 2006; 244 (6): 978–85.
7. Immerman S, White WM, Constantinides M. Cartilage grafting in nasal reconstruction. *Facial Plast Surg Clin North Am*. 2011; 19 (1): 175–82.
8. Echeverry A, Carvajal J, Medina E. Alternative technique for tip support in secondary rhinoplasty. *Aesthet Surg J*. 2006; 26 (6): 662–8.
9. Yilmaz S, Erçöçen AR, Can Z, Yenidünya S, Edali N, Yormuk E. Viability of diced, crushed cartilage grafts and the effects of Surgicel (oxidized regenerated cellulose) on cartilage grafts. *Plast Reconstr Surg*. 2001; 108 (4): 1054–60.
10. Fatemi MJ, Hasani ME, Rahimian S, Bateni H, Pedram M, Mousavi SJ. Survival of block and fascial-wrapped diced cartilage grafts: an experimental study in rabbits. *Ann Plast Surg*. 2012; 69 (3): 326–30.
11. Yenigun A, Meric A, Verim A, Ozucer B, Yasar H, Ozkul MH. Septal perforation repair: mucosal regeneration technique. *Eur Arch Otorhinolaryngol*. 2012; 269 (12): 2505–10.
12. Galushko EA, Erdes SHF, Alekseeva LI. Osteoarthritis in outpatient practice. *Sovremennaya revmatologiya*. 2012; 6 (4): 66–70. Russian.
13. Lohmander LS. Knee replacement for osteoarthritis: facts, hopes, and fears *Medicographia*. 2013; 35: 181–8.
14. Vos T, et al. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 301 acute and chronic diseases and injuries in 188 countries, 1990–2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet*. 2015; 386 (9995): 743–800.
15. Amaral RJ, Pedrosa Cda S, Kochem MC, Silva KR, Aniceto M, et al. Isolation of human nasoseptal chondrogenic cells: a promise for cartilage engineering. *Stem Cell Res*. 2012; 8 (2): 292–9.
16. Oseni AO, Butler PE, Seifalian AM. Optimization of chondrocyte isolation and characterization for large-scale cartilage tissue engineering. *J Surg Res*. 2013; 181 (1): 41–8.
17. Rotter N, Bonassar LJ, Tobias G, Lebl M, Roy AK, Vacanti CA. Age dependence of cellular properties of human septal cartilage: implications for tissue engineering. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 2001; 127 (10): 1248–52.
18. Haisch A, Marzahn U, Mobasher A, Schulze-Tanzil G, Shakibaei M. Development and phenotypic characterization of a high density in vitro model of auricular chondrocytes with applications in reconstructive plastic surgery. *Histol Histopathol*. 2006; 21 (5): 467–76.
19. Timur U, Caron M, Akker G, Windt A, Visser J, Rhijn L, et al. Increased TGF- β and BMP levels and improved chondrocyte-specific marker expression in vitro under cartilage-specific physiological osmolarity. *Int J Mol Sci*. 2019; 20 (4): 795.
20. Tallheden T, Lee J, Brantsing C, Månsson JE, Sj-gren-Jansson E, Lindahl. A Human serum for culture of articular chondrocytes. *Cell Transplant*. 2005; 14 (7): 469–79.
21. Fujisawa T, Hattori T, Ono M, Uehara J, Kubota S, Kuboki T, et al. CCN family 2/connective tissue growth factor (CCN2/CTGF) stimulates proliferation and differentiation of auricular chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage*. 2008; 16 (7): 787–95.
22. Malda J, Blitterswijk CA, Geffen M, Martens DE, Tramper J, Riesle J. Low oxygen tension stimulates the redifferentiation of dedifferentiated adult human nasal chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage*. 2004; 12 (4): 306–13.
23. Haisch A, Marzahn U, Mobasher A, Schulze-Tanzil G, Shakibaei M. Development and phenotypic characterization of a high density in vitro model of auricular chondrocytes with applications in reconstructive plastic surgery. *Histol Histopathol*. 2006 May; 21 (5): 467–76.
24. Masuda K, Sah RL, Hejna MJ, Thonar EJ. A novel two-step method for the formation of tissue-engineered cartilage by mature bovine chondrocytes: the alginate-recovered-chondrocyte (ARC) method. *J Orthop Res*. 2003; 21 (1): 139–48.
25. Ohyabu Y, Adegawa T, Yoshioka T, Ikoma T, Shinozaki K, Uemura T, et al. A collagen sponge incorporating a hydroxyapatite/chondroitin sulfate composite as a scaffold for cartilage tissue engineering. *J Biomater Sci Polym*. 2009; 20 (13): 1861–74.
26. Yanaga H, et al. Clinical application of cultured autologous human auricular chondrocytes with autologous serum for craniofacial or nasal augmentation and repair. *Plast Reconstr Surg*. 2006; 117: 2019–30.
27. Yanaga H, Imai K, Fujimoto T, Yanaga K. Generating ears from cultured autologous auricular chondrocytes by using two-stage implantation in treatment of microtia. *Plast Reconstr Surg*. 2009; 124: 817–25.
28. Yanaga H, Imai K, Yanaga K. Generative surgery of cultured autologous auricular chondrocytes for nasal augmentation. *Aesthetic Plast Surg*. 2009; 33: 795–802.
29. Homicz MR, Schumacher BL, Sah RL, Watson D. Effects of serial expansion of septal chondrocytes on tissue-engineered neocartilage composition. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 2002; 127 (5): 398–408.
30. Yu H, Grynpas M, Kandel RA. Composition of cartilagenous tissue with mineralized and non-mineralized zones formed in vitro. *Biomaterials*. 1997; 18 (21): 1425–31.
31. Alexander TH, Sage AB, Chen AC, Schumacher BL, Shelton E, Masuda K, et al. Insulin-like growth factor-I and growth differentiation factor-5 promote the formation of tissue-engineered human nasal

- septal cartilage. *Tissue Eng Part C Methods*. 2010; 16 (5): 1213–21.
32. Osch GJ, Veen SW, Marijnissen WJ, Verhaar JA. Monoclonal antibody 11-fibrau: a useful marker to characterize chondrocyte differentiation stage. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001; 280 (3): 806–12.
 33. Kobayashi S, Takebe T, Zheng YW, Mizuno M, Yabuki Y, Maegawa J, et al. Presence of cartilage stem/progenitor cells in adult mice auricular perichondrium. *PLoS One*. 2011; 6 (10): e26393.
 34. Outani H, Okada M, Yamashita A, Nakagawa K, Yoshikawa H, Tsumaki N. Direct induction of chondrogenic cells from human dermal fibroblast culture by defined factors. *PLoS One*. 2013; 8 (10): e77365.
 35. Crowe N, Swingle TE, Le LT, Barter MJ, Wheeler G, Pais H, et al. Detecting new microRNAs in human osteoarthritic chondrocytes identifies miR-3085 as a human, chondrocyte-selective, microRNA. *Osteoarthritis Cartilage*. 2016; 24 (3): 534–43.
 36. Liu S, Takahashi M, Kiyoi T, Toyama K, Mogi M. Genetic manipulation of calcium release-activated calcium channel 1 modulates the multipotency of human cartilage-derived mesenchymal stem cells. *J Immunol Res*. 2019; 2019: 7510214.
 37. Popko M, Bleys RL, De Groot JW, Huizinga EH. Histological structure of the nasal cartilages and their perichondrial envelope. I. The septal and lobular cartilage. *Rhinology*. 2007; 45 (2): 148–52.
 38. Richmon JD, Sage A, Wong WV, Chen AC, Sah RL, Watson D. Compressive biomechanical properties of human nasal septal cartilage. *Am J Rhinol*. 2006; 20 (5): 496–501.
 39. Glasgold MJ, Kato YP, Christiansen D, Hauge JA, Glasgold AI, Silver FH. Mechanical properties of septal cartilage homografts. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 1988; 99 (4): 374–9.
 40. Chang AA, Reuther MS, Briggs KK, Schumacher BL, Williams GM, Corr M, et al. In vivo implantation of tissue-engineered human nasal septal neocartilage constructs: a pilot study. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 2012; 146 (1): 46–52.
 41. Reuther MS, Briggs KK, Neuman MK, Masuda K, Sah RL, Watson D. Shape fidelity of native and engineered human nasal septal cartilage. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 2013; 148 (5): 753–7.
 42. Caffrey JP, Kushnaryov AM, Reuther MS, Wong VW, Briggs KK, Masuda K, et al. Flexural properties of native and tissue-engineered human septal cartilage. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 2013; 148 (4): 576–81.
 43. Zou J, Bai B, Yao Y. Progress of co-culture systems in cartilage regeneration. *Expert Opin Biol Ther*. 2018; 18 (11): 1151–8.