

УДК 611.721:611.724:616.72-018.3

Ю.Б. Чайковский<sup>1\*</sup>, С.Б. Геращенко<sup>2</sup>, Е.И. Дельцова<sup>2</sup>

## Проблемы и перспективы использования стволовых клеток хрящевой ткани

UDC 611.721:611.724:616.72-018.3

Y.B. Chaikovskiy<sup>1\*</sup>, S.B. Herashchenko<sup>2</sup>, O.I. Deltsova<sup>2</sup>

## Problems and Perspectives of Using Stem Cells of Cartilage Tissues

**Реферат:** В работе обсуждаются общие вопросы для специалистов в области биологии, криомедицины и биомеханики относительно применения стволовых клеток (СК) при лечении заболеваний хрящевой ткани. В настоящее время выявлены ниши СК в гиалиновых хрящах, синовиальных мембранах и синовиальной жидкости диартрозов, межпозвоночных дисках, менисках коленных суставов, волокнистых хрящах височно-нижнечелюстного сустава и эластических хрящах ушной раковины. Определены специфические особенности и механизм действия СК хрящевой ткани. Разработаны экспериментальные модели патологии хрящевой ткани на разных видах животных. Результаты экспериментальных исследований продемонстрировали возможность использования СК для лечения заболеваний, вызванных патологией хрящевой ткани. Показано, что применение криоконсервированных СК хрящевой ткани во врачебной практике является эффективным и перспективным. На сегодняшний день этот вопрос недостаточно исследован, поэтому необходимо разработать оптимальные режимы замораживания, подобрать криозащитные среды, а также оценить безопасность такой терапии.

**Ключевые слова:** хрящевые ткани, стволовые клетки, экспериментальные модели, лабораторные животные, криоконсервирование стволовых клеток.

**Реферат:** У роботі обговорюються загальні питання для фахівців у галузі біології, криомедицини та біомеханіки щодо застосування стовбурових клітин (СК) при лікуванні захворювань хрящової тканини. На даний час виявлено ніші СК у гіалінових хрящах, синовіальних мембранах і синовіальній рідині діартрозів, міжхребцевих дисках, менисках колінних суглобів, волокнистих хрящах скронево-нижньощелепного суглоба і еластичних хрящах вушної мушлі. Визначено специфічні особливості та механізм дії СК хрящової тканини. Розроблено експериментальні моделі патології хрящової тканини на різних видах тварин. Результати експериментальних досліджень продемонстрували можливість використання СК для лікування захворювань, викликаних патологією хрящової тканини. Показано, що застосування криоконсервованих СК хрящової тканини в лікарській практиці є ефективним і перспективним. На сьогодні це питання недостатньо вивчене, тому необхідно розробити оптимальні режими заморожування, підібрати криозахисні середовища, а також оцінити безпеку такої терапії.

**Ключові слова:** хрящові тканини, стовбурові клітини, експериментальні моделі, лабораторні тварини, криоконсервування стовбурових клітин.

**Abstract:** The paper aims at providing general information regarding the use of stem cells (SCs) for the treatment of cartilage tissue diseases for specialists in the field of biology, cryomedicine and biomechanics. To date, SCs niches have been identified in hyaline cartilage, synovial membranes and synovial fluid of diarthrosis, intervertebral discs, and knee joints menisci, fibrous cartilages of the temporomandibular joint and elastic cartilages of the auricle. Specific features and the mechanism of action of SCs of cartilage tissue were determined. Experimental models of cartilage tissue pathology in different animal species have been developed. Experimental studies have demonstrated the possibility of using SCs for the treatment of diseases caused by cartilage pathology. It is shown that the use of cryopreserved cartilage tissue SCs in medical practice is effective and promising. To date, this issue remains understudied, therefore, it is necessary to develop optimal freezing regimens, select cryoprotective media, as well as evaluate the safety of such a therapy.

**Key words:** cartilage tissues, stem cells, experimental models, laboratory animals, cryopreservation of stem cells.

По статистике более 60% людей в мире страдают от заболеваний, связанных с патологией хряща: поясничный остеохондроз [29], остеоартрит (ОА) [25], дегенеративные изменения височно-нижнечелюстного сустава (ВНЧС) [6], посттравматический синдром [3] и врожденные аномалии [53]. Пациентам с данной патологией назначается консервативная терапия (обезболивающие и хондропротекторные препараты), а при неконтролируемой боли – хирургическое лече-

According to statistical data over 60% of people worldwide suffer from various diseases related to the cartilage pathology: low back pain [29], osteoarthritis (OA) [25], degenerative temporomandibular joint disorders (TMJ) [6], post-traumatic syndrome [3] and congenital abnormalities [53]. Patients with these pathologies are prescribed conservative therapy (pain killers and chondroprotective agents), and surgery for uncontrolled pain [49]. Unfortunately these methods do not ensure a complete cure and

<sup>1</sup>Кафедра гістології та ембріології, Національний медичний університет імені О.О. Богомольця, м. Київ, Україна

<sup>2</sup>Кафедра гістології, цитології та ембріології, Івано-Франківський національний медичний університет, м. Івано-Франківськ, Україна

**\*Автор, якому необхідно надсилати кореспонденцію:**

бульвар Т. Шевченка, 13, м. Київ, Україна 01601;  
тел.: (+38 044) 234-40-62, факс: (+38 044) 234-92-76.  
електронна пошта: yuchaiko@i.ua

Надійшла 26.12.2018  
Прийнята до друку 14.11.2019

<sup>1</sup>Department of Histology and Embryology, Bogomolets National Medical University, Kyiv, Ukraine

<sup>2</sup>Department of Histology, Cytology and Embryology, Ivano-Frankivsk National Medical University, Ivano-Frankivsk, Ukraine

**\*To whom correspondence should be addressed:**

13, T. Shevchenko boulevard, Kyiv, Ukraine 01601;  
tel.: +380 44 234 4062, факс: +380 44 234 9276.  
e-mail: yuchaiko@i.ua

Received December, 26, 2018  
Accepted November, 14, 2019

ние [49]. Поскольку указанные методы, к сожалению, не обеспечивают полного излечения, таким больным проводится трансплантация хрящевой ткани [1]. Для обеспечения операций необходим запас биологического материала, который может быть создан с помощью криоконсервирования [61, 66]. В настоящее время активно проводятся исследования, направленные на совершенствование данного метода [5, 28]. Важно отметить, что результаты последних клинических испытаний продемонстрировали более высокую терапевтическую эффективность трансплантации различных стволовых клеток (СК) по сравнению с пересадкой всего хряща. Показана возможность применения в лечебной практике эмбриональных и перинатальных СК [50]; мезенхимных СК костной ткани (МСККТ) [7]; МСК жировой ткани [38]; МСК синовиальной жидкости [17]; СК пульпы зуба [54]; СК нижних носовых раковин [21], а также индуцированных СК [64]. Однако свежeweделенные СК нередко требуются в большем количестве, чем их можно одномоментно получить. Возможны ситуации, когда нативные СК необходимо длительно сохранять перед трансплантацией, а сроки хранения ограничены [5]. Эти проблемы можно решить с помощью криоконсервирования, которое обеспечивает долгосрочное хранение и возможность заготовки большого количества биоматериала [18, 19].

Результаты многочисленных экспериментальных работ показали эффективность применения СК на моделях патологии хряща, но последние клинические данные лечения ОА, дегенеративных изменений ВНЧС и патологии позвоночника неоднозначны [15].

Целью работы явился анализ литературы, посвященной изучению стволовых клеток хрящевой ткани, экспериментальных моделей патологии хряща, критериев подбора лабораторных животных, используемых для моделирования патологии хряща; определены возможности применения стволовых клеток хрящевой ткани в клинике и рассмотрены методы криоконсервирования резидентных хрящевых стволовых клеток.

*Современные представления о СК хрящевой ткани.* Имеющиеся данные свидетельствуют о том, что при лечении различных патологий тканей с помощью трансплантации СК необходимо учитывать основные свойства резидентных клеток. Т. Maerz и соавт. [39] считают, что разработка новых клеточных методов лечения заболеваний позвоночника требует понимания биологии и фенотипических особенностей клеток межпозвоночного диска. По мнению G. Patappa и соавт. [52]

such patients undergo cartilage tissue transplantation [1]. To provide for the surgical procedures a stock of biological material is needed, which can be created using cryopreservation [61, 66]. Currently, active research is underway aimed at improving this method [5, 28]. It is noteworthy that the results of recent clinical trials have demonstrated higher therapeutic efficacy of transplantation of various stem cells (SCs) as compared to transplantation of the entire cartilage. The possibility of using embryonic and perinatal SCs [50]; bone-derived mesenchymal SCs (BDMSCs) [7]; adipose tissue-derived MSCs [38]; synovial fluid MSCs [17]; dental pulp SCs [54]; inferior turbinate SCs [21]; as well as the induced SCs [64] in medical practice has been shown. However, freshly isolated SCs are often required in larger quantities than they can be obtained at once. There may be the situations when native SCs must be stored for a long time before transplantation, and storage periods are limited [5]. In this regard, cryopreservation which enables long-term storage and the possibility of harvesting a large amount of biomaterial is promising [18, 19].

The results of numerous experimental studies have shown the efficacy of using SCs on models of cartilage pathology, however the latest clinical data on OA, degenerative changes in TMJ and spinal pathology treatment are ambiguous [15].

The research was aimed at reviewing the published reports on studying the cartilage tissue stem cells, experimental models of cartilage pathology, criteria for selecting laboratory animals used to simulate cartilage pathology; the possibilities of using cartilage stem cells in clinical practice have been determined and the methods of cryopreservation of resident cartilage stem cells have been considered.

*Modern views on cartilage tissue SCs.* Available evidence demonstrates that the treatment of various tissues pathologies by SCs grafting should always take into account the essential properties of the resident SCs. T. Maerz *et al.* [39] believe that development of new cell therapies for spine diseases requires an understanding of biology and phenotypic features of the intervertebral disc cells. Patappa *et al.* [52] suggest that regenerative therapy approaches to treatment of the damaged intervertebral disc should rely on the knowledge of specific features of the cartilage SCs which determine differentiation of the transplanted cells and preserve the 'correct' phenotype, since these factors ensure the cartilage functioning [55].

Stem cells/progenitor stem cells (SCPCs) niches were found in the articular cartilages, synovial

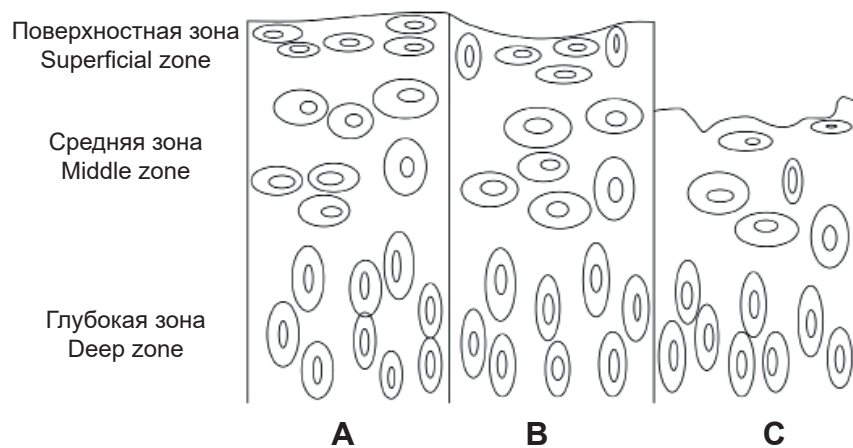


подходы регенеративной медицины к лечению поврежденного диска должны основываться на знании специфических особенностей СК хряща, которые определяют дифференцировку пересаженных клеток и сохраняют «правильный» фенотип, поскольку эти факторы обеспечивают работу хряща [55].

Ниши стволовых клеток/клеток-предшественниц (СККП) обнаружены в суставных хрящах, синовиальных мембранах, синовиальной жидкости, межпозвоночных дисках и эластических хрящах [40, 46]. Ниши обеспечивают условия для самообновления и дифференцировки СК. С.Р. Fellows и соавт. [12] считают, что СККП получают определенные сигналы из микроокружения и выходят из ниши для дифференцировки и репопуляции либо регенерации хряща.

*Гиалиновый хрящ диартрозов.* Ниша СККП суставного хряща находится в его поверхностной зоне. Именно из этой зоны у человека и лабораторных животных были выделены *in vitro* СККП, обладающие способностью к самообновлению, мультилинейной дифференцировке и миграции [23]. Кроме того, они активно реагируют на повреждение хряща. Установлено, что выращенные *in vitro* СККП экспрессируют CD105, VAP-1, CD166 и другие маркеры, идентичные МСККТ. На основании полученных данных было сделано заключение, что СККП представляют отдельную популяцию, не имеют специфического маркера, что затрудняет их идентификацию *in vivo* [24]. Кроме того, авторы установили, что СККП проявляют репаративную активность в зоне повреждения хряща (рисунок). Таким образом, способность СККП продуцировать внеклеточный матрикс и обеспечивать хондропротекцию делает их потенциальным терапевтическим средством для лечения ОА.

М. Mazor и соавт. [44] подтвердили наличие СККП в поверхностной зоне гиалинового хряща и экспрессию ими CD105, CD106 и CD166. Авторы культивировали фрагменты хрящей, полученные от пациентов с легкой и тяжелой формой ОА коленного сустава. Уровни мРНК CD105 и CD166 повышались в клетках, полученных от пациентов с легкой степенью ОА в 3 и 6 раз соответственно, тогда как у пациентов с тяжелой формой ОА наб-



Топография хондроцитов в нормальном суставном хряще (А), после травмы (В) и в условиях прогрессирующего ОА (С). Поверхностная зона хряща, в которой находятся СККП. (По Y. Jiang и соавт. [23, 24] с изменениями).

Topography of chondrocytes in normal articular cartilage (A), after injury (B) and in conditions of progressive OA (C). CSCs are located in the surface zone. (After Y. Jiang *et al.* [23, 24] with changes).

membranes, synovial fluid, intervertebral discs and elastic cartilages [40, 46]. These niches provide conditions for SCs self-renewal and differentiation. C.R. Fellows [12] believe that SCPCs receive special signals from their microenvironment and leave the niche for differentiation and repopulation or regeneration of the cartilage.

*Hyaline cartilage of the diarthroses.* SCPCs niche of the articular cartilage is located in its superficial zone. It is from this zone that SCPCs were isolated in humans and laboratory animals *in vitro*. These cells are capable of self-renewal, multilineage differentiation, and migration [23]. Besides, they actively respond to cartilage damage. *In vitro* cultivation of SCPCs has revealed that they express CD105, VAP-1, CD166, and some other markers identical to BDMSCs. Based on the data obtained, it was concluded that SCPCs represented a separate population, had no a specific marker, which complicated their identification *in vivo* [24]. In addition, the authors found that SCPC exhibited reparative activity in the area of cartilage damage (figure). So, SCPCs' ability to produce extracellular matrix and ensure chondroprotection make them a potential therapeutic agent for OA treatment.

М. Mazor *et al.* [44] confirmed the presence of SCPCs in the superficial zone of the hyaline cartilage and expression of CD105, CD106, and CD166 by them. The authors have cultivated fragments of cartilages obtained from patients with mild and severe knee OA. In the cells obtained from patients with mild OA the levels of mRNA CD105 and CD166 were three- and six-fold higher respec-



людалось незначительное их повышение: мРНК CD105 – в 1,5 раза и мРНК CD166 – в 2 раза. В клетках обеих групп пациентов поверхностные маркеры были идентичны маркерам МСККТ. Авторы пришли к выводу, что регенеративный потенциал СККП у пациентов с легкой степенью ОА выше, чем с тяжелой.

*Мениски коленных суставов.* Ниши СККП менисков находятся как в аваскулярной, так и васкулярной зонах [11]. Авторы в исследовании на кроликах сравнивали резидентные клетки из разных участков менисков с МСККТ. Показано, что СККП менисков и МСККТ экспрессируют *in vitro* сходные маркеры: нуклеостемин, CD44, CD90 и STRO-1. Был изучен потенциал мультидифференцировки СККП менисков и МСККТ. При этом степень экспрессии адипогенеза у них была практически одинаковой, степень остеогенеза МСККТ превышала таковую у резидентных клеток менисков почти в 2 раза, но была значительно меньше, чем при хондрогенезе. Авторы предположили, что резидентные СК менисков коленного сустава применимы в клинической практике для аллотрансплантации.

Исследование на клетках человека показало, что СККП менисков, сходные с МСККТ, экспрессируют высокие уровни мезенхимных маркеров СК (CD44, CD90, CD105, CD166), а не гематopoietических (CD34 и CD45) [59]. На основании полученных данных авторы предположили, что резидентные СК менисков коленного сустава пригодны для использования в клинической практике.

В отличие от предыдущих авторов J. Zellner и соавт. [74] выявили сходство хондрогенного потенциала у МСК и резидентных клеток менисков коленного сустава, что можно объяснить использованием разных экспериментальных моделей. J. Zellner и соавт. [74] создали дефект в аваскулярной зоне мениска, W. Shen и соавт. [59] провели полную менискэктомию, а Z. Ding и соавт. [11] получили результаты на культуре ткани.

*Дегенеративные изменения ВНЧС.* Сведений относительно свойств СК внутрисуставных дисков ВНЧС крайне мало. Только M. Detamore и соавт. [10] показали, что для пролиферации клеток и выработки гликозаминогликанов в дисках ВНЧС оптимальна комбинация PDGF и TGF- $\beta$  в отличие от различных сочетаний bFGF, TNF и IL-1.

*Синовиальные мембраны и синовиальная жидкость.* Стволовые клетки/клетки-предшественницы были выделены из синовиальных мембран [9] и синовиальной жидкости [58]. Установлено,

while in the cells obtained from patients with severe OA the increase was insignificant: mRNA CD105 by 1.5 times and two times higher for mRNA CD166. Cells from both groups of patients have demonstrated the presence of surface markers identical to those of BDMSCs. The authors concluded that the regenerative potential of SCPCs from patients with mild OA had been higher than that of the cells obtained from patients with severe OA.

*Knee joints menisci.* SCPCs niches of menisci are located in both the avascular, and vascular zones [11]. In their study on rabbits the authors compared the resident cells from different menisci parts with BDMSCs. It was shown that meniscal SCPCs and MSCs expressed similar markers *in vitro*: nucleostemin, CD44, CD90, and STRO-1. The multidifferentiation potential of the meniscal SCPCs and BDMSCs was studied. Moreover, the degree of adipogenesis expression in them was almost the same, the degree of osteogenesis of MSCs exceeded that of resident meniscal cells by almost 2 times, but was significantly lower than in chondrogenesis. The authors suggest the possibility of clinical use of the knee joint meniscal resident SCs by allografting.

The study in human cells showed that similar to BDMSCs meniscal SCPC expressed high levels of MSC markers, (CD44, CD90, CD105, and CD166), but not the hematopoietic ones (CD34 and CD45) [59]. Based on the data obtained, the authors suggested that knee joint meniscal resident SCs cells were suitable for use in clinical practice.

In contrast to previous authors, J. Zellner *et al.* [74] revealed a similarity of chondrogenic potential in MSCs and knee joint meniscal resident cells, which could be explained by the use of different experimental models. J. Zellner *et al.* [74] created a defect in the avascular zone of meniscus, W. Shen *et al.* [59] performed a total meniscectomy, and Z. Ding *et al.* [11] obtained results on tissue culture.

*TMJ degenerative changes.* Much less is known about the stem cells of the TMJ discs. Only M. Detamore *et al.* [10] showed that for the proliferation of cells and the production of glycosaminoglycans in TMJ discs, the combination of PDGF and TGF- $\beta$  was optimal, in contrast to various combinations of bFGF, TNF and IL-1.

*Synovial membranes and synovial fluid.* Stem cells/progenitor cells were isolated from both synovial membranes [9] and synovial fluid [58]. It was found that SCPCs niche was located in



что ниша СККП находится в синовиальных мембранах, из которых они попадают в синовиальную жидкость. Количество СККП у человека увеличивается на ранних стадиях развития ОА. В условиях *in vitro* данные клетки проявляют мультипотентность, их хондрогенный потенциал значительно выше, чем у МСККТ, а остео- и адипогенный потенциал значительно ниже.

*Межпозвоночные диски.* W. Chan и соавт. [4] представили результаты многочисленных исследований, подтверждающие наличие ниши СККП в студенистом ядре межпозвоночных дисков. Показано, что *in vitro* клетки экспрессируют маркеры CD90, CD73, CD105, CD166 и STRO-1, которые характерны для МСККТ. Подобно последним обладают хондрогенным потенциалом, который, снижается с возрастом или при прогрессировании дегенерации диска. Авторами были идентифицированы поверхностные маркеры СККП менисков. Так, CD55, брахиурия, нейропилин (Nrp-1), CD221, TGF- $\beta$  были предложены в качестве таких отличительных маркеров у крыс, а CD24, CD54 и брахиурия – у людей 25–30 лет.

*Эластический хрящ.* S. Kobayashi и соавт. [33] удалось идентифицировать нишу СККП в перихондрии наружного уха мыши. Эти клетки экспрессировали CD44 и интегрин- $\alpha 5$ . Перихондрциты человека экспрессировали CD44 и CD90. При трансплантации в зону дефекта (размером более 2 см<sup>2</sup>) ушной раковины мышей СККП формировали эластический хрящ, что позволило сделать вывод о перспективном их использовании для лечения черепно-лицевых дефектов. I.A. Otto и соавт. [51] продемонстрировал *in vitro* высокую способность лошадиных СККП к хондрогенной дифференцировке.

*Экспериментальные модели на животных.* Для внедрения в клиническую практику экспериментальных результатов необходима разработка соответствующих моделей патологии хряща, которые подразделяются на индуцированные и спонтанные [34].

К индуцированным моделям относятся хирургические и химические, первые из которых применяются чаще. Для моделирования патологии повреждают определенные структуры сустава, что приводит к изменению нагрузки на суставные поверхности, их нестабильному соединению и развитию ОА. На практике часто используются следующие модели: рассечение передней крестообразной связки [36], медиальная менискэктомия [71] и «модель канавки» (механическое поврежде-

synovial membranes, and SCPCs got into the synovial fluid from the latter. The number of SCPCs in humans increases at the early stages of OA. *In vitro* these cells exhibit multipotency, with their chondrogenic potential being significantly higher, than that of BDMSCs and osteogenic and adipogenic potential being significantly lower.

*Intervertebral discs.* W. Chan *et al.* [4] presented the results of numerous studies confirming the presence of SCPCs niche in the nucleus pulposus of intervertebral discs. It was shown that *in vitro* the cells expressed CD90, CD73, CD105, CD166, and STRO-1 markers that were characteristic of BDMSCs. Similar to the latter they have chondrogenic potential, which decreases with aging or progression of disk degeneration. The authors identified the surface markers of the meniscal SCPCs. Thus, CD55, brachyury, neuropilin (Nrp-1), CD221, TGF- $\beta$  were suggested as such differentiating markers in rats, and CD24, CD54, and brachyury – in humans of 25–30 years of age.

*Elastic cartilage.* S. Kobayashi *et al.* [33] managed to identify SCPCs niche in the perichondrium of the murine external ear. These cells expressed CD44 and integrin- $\alpha 5$ . Human perichondrocytes expressed CD44 and CD90. When grafted into the conchal defect (more than 2 cm<sup>2</sup> in size) of mice, SCPCs formed an elastic cartilage, which allowed to consider these cells to be a promising source for treatment of craniofacial defects. I.A. Otto *et al.* [51] showed *in vitro* the high capacity of equine conchal SCPCs for chondrogenic differentiation.

*Experimental animal models.* To introduce experimental results into clinical practice, it is necessary to develop appropriate models of cartilage pathology, which are divided into induced and spontaneous ones [34].

The induced models include the surgical and chemical ones, with the former being used more often. To simulate a pathology, certain joint structures are damaged, which leads to changed load on the articular surfaces, their unstable junction and the development of OA. The following modes are often used in practice: the anterior cruciate ligament transection [36], medial meniscectomy [71] and the so-called ‘groove model’ (mechanical damaging of the articular cartilage with a prolonged intensified loading of the affected joint [42]). The advantages of these models include reproducible results and quick development of OA, which make them suitable for short-term studies.



ние суставного хряща с длительной усиленной нагрузкой на пораженный сустав) [42]. Преимуществами данных моделей являются воспроизводимость результатов и быстрое развитие ОА, что позволяет проводить краткосрочные исследования. Для определения возможности восстановления структуры менисков или дисков при введении СК часть хряща резецируют [75].

При хирургических моделях дегенерации межпозвоночного диска наносят прямую травму путем высверливания или хирургического разреза [76], а для стимуляции патологии эластического хряща в хряще ушной раковины формируют дефект, размер которого соответствует 2–3 см<sup>2</sup> [32].

Химические модели ОА создаются внутрисуставным введением натрия йодоацетата [63]. Модель проста в выполнении и вызывает быстрые патологические изменения, однако не позволяет точно воссоздать хроническое прогрессирование ОА. Химическое моделирование дегенерации межпозвоночного диска воспроизводят путем инъекции хондроитиназы ABC [22].

Спонтанные модели подразделяются на природные и генетические. Они позволяют воспроизводить разные стадии дегенерации хрящевой ткани. Патология прогрессирует медленно и не зависит от посттравматических изменений, что является преимуществом этих моделей [2]. Однако они трудоемки и требуют значительных финансовых затрат [13, 70].

Встречающиеся в природе патологии хрящевой ткани описаны у некоторых видов лабораторных животных (песчанки, собаки, бабуины, макаки) [8, 20].

Генетические модели были разработаны для изучения вклада специфических белков в процесс дегенерации хряща [60]. Так, Т. Kimura и соавт. [31] предложили модель дегенерации суставного хряща и межпозвоночного диска у трансгенных мышей, экспрессирующих мутантный коллаген IX типа. J. Sahlman и соавт. [57] использовали модель дегенерации хряща на мышцах с нокаутом гена Col2a1 для коллагена II типа. Однако отмечено, что не существует единой модели, которая соответствовала бы «золотому стандарту» имитации патологии хрящевой ткани у лабораторных животных, поскольку каждая из них имеет свои преимущества и недостатки [45]. В связи с этим в любом исследовании необходим выбор подходящей модели конкретной патологии и разработка схемы адекватного ее лечения [30].

Модельные эксперименты проводили на разных видах животных (мыши, крысы, кролики, морские свинки, кошки, собаки, козы, овцы, лошади, приматы) [8, 27, 30]. Использование при

To identify the possibility of restoring the structure of menisci or discs part of the cartilage is resected during administration of stem cells [75].

Surgical models of intervertebral disc degeneration are created by way of direct injury by drilling or by surgical incision [76] and to simulate elastic cartilage pathology a defect of 2–3 square centimeters in size is created in the conchal cartilage [32].

Chemical models of OA are created by intra-articular injection of monosodium iodoacetate [63]. This model is easy to perform, and it quickly causes pathological changes, however it does not allow accurate simulation of the chronic OA progression. Chemical simulation of the intervertebral disc degeneration is achieved by injecting chondroitinase ABC [22].

Spontaneous models are subdivided into the natural and genetic ones. They allow to simulate various stages of cartilage tissue degeneration. The pathology progresses slowly and does not depend on posttraumatic changes, which is the advantage of these models [2]. However they are labour-intensive and costly [13, 70].

Naturally occurring cartilage tissue pathologies have been described in some species of laboratory animals, such as gerbils, dogs, baboons, and macaques [8, 20].

Genetic models were developed to study the contribution of specific proteins to the process of disc degeneration [60]. Thus T. Kimura *et al.* [31] suggested a model of articular cartilage and intervertebral discs degeneration in transgenic mice expressing a type IX collagen mutation. J. Sahlman *et al.* [57] used the model of cartilage degeneration in mice with Col2a1 gene knockout for type II collagen. However it was noted that there is no single model to meet the ‘gold standard’ of cartilage tissues pathology simulation in laboratory animals, since each model has its advantages and limitations [45]. In this regard, in any study, the selection of an appropriate model of a particular pathology and the development of an adequate treatment regimen are necessary [30].

Model experiments were conducted in various animal species (mice, rats, rabbits, guinea pigs, cats, dogs, goats, sheep, horses, and primates [8, 27, 30]. Use of each animal species in simulation has its benefits and limitations. In this case, their age and gender should be taken into account, since these parameters determine the severity of the disease and the timeline of its progression. In addition, the effects of the same procedure carried out when simulating the pathology in animals of different species can vary significantly [37]. Thus,





моделировании конкретного вида животных имеет преимущества и недостатки. При этом следует учитывать их возраст и пол, поскольку данные параметры определяют тяжесть заболевания и сроки его прогрессирования. Кроме того, эффекты одной и той же процедуры, проводимой при моделировании патологии у животных разных видов, могут значительно различаться [37]. Таким образом, при подборе модели важно учитывать индивидуальные особенности каждого вида животных.

*Применение экспериментальных данных в клинической практике.* Положительные результаты применения СККТ выявлены у пациентов с очаговыми дефектами суставного хряща и ОА, однако поверхность хряща и его механические функции, особенно в коленном суставе, в полном объеме не были восстановлены, что является основанием для усовершенствования протокола дальнейших клинических испытаний [35]. E. Rusu и соавт. [56] считают, что предварительные клинические результаты использования СК при лечении патологии хряща являются перспективными, однако важна оценка безопасности и преимуществ проводимой терапии с учетом этических норм. В последнее время были достигнуты определенные успехи в клиническом применении СК. Для решения этой проблемы необходим междисциплинарный подход – объединение знаний клиницистов и специалистов в области клеточной биологии и биомеханики [26]. Имеющиеся клинические результаты можно считать многообещающими, но требуют контроля надежными методами [14].

Известно, что МСККТ восстанавливают поврежденные ткани: мигрируют в зону дефекта, дифференцируются в клетки определенного типа и замещают погибшие клетки [68]. Однако показано, что МСККТ оказывают трофический эффект на соседние клетки: секретируют факторы, повышающие жизнеспособность последних, стимулируют их пролиферацию и продукцию внеклеточного матрикса. L. Wu и соавт. [69] показали, что при совместном культивировании МСККТ и СККП увеличивается формирование гиалинового хряща, что определяется трофическим действием МСККТ. Z. Zhao и соавт. [76] продемонстрировали на модели остеохондрального дефекта у крыс, что совместное введение МСККТ и СККП повышает жизнеспособность последних. Одновременное использование СККП ушной раковины и МСККТ при реконструкции уха также усиливало хрящеобразование [47]. Исследуя трофический эффект МСККТ на клетки других типов, включая СККП, можно полагать, что ко-имплантация МСККТ и

when choosing a model, it is important to consider the individual characteristics of each animal species.

*Use of experimental data in clinical practice.* Positive results of SCPCs use were found in patients with focal defects of the articular cartilage and osteoarthritis. Nevertheless, no complete restoration of the cartilage surface and its mechanical functions, especially in the knee joint, has been observed, which proves the need for improving the design of clinical trials [35]. E. Rusu *et al.* [56] believe that the preliminary clinical results of using stem cells for treating cartilage pathology are promising, however it is important to assess the safety and benefits of such therapy with regard to ethical considerations. Recently certain successes have been achieved in the clinical use of SCs. Solution of this problem calls for a multidisciplinary approach, that is pooling the knowledge of clinicians and specialists in cell biology and biomechanics [26]. Although the available clinical results may be considered quite promising, they need to be controlled by reliable methods [14].

BMSCs are known to restore the damaged tissues by migrating into the area of the defect, differentiating into a specific cell type and substituting the lost cells [68]. However currently BMSCs have been shown to have a trophic effect on the neighboring cells by secreting the factors increasing the viability of the latter, stimulating their proliferation and production of the extracellular matrix. L. Wu *et al.* [69] showed that co-cultivation of BDMSCs and SCPCs led to increased formation of the hyaline cartilage, which was determined by the trophic effect of BDMSCs. Z. Zhao *et al.* [76] demonstrated on rat osteochondral defect model that co-implantation of BDMSCs and SCPCs increased the viability of the latter. Simultaneous use of the auricular SCPCs with BDMSCs in the course of auricular reconstruction also promoted chondrogenesis [47]. Investigating the trophic effect of BDMSCs on other cell types, including SCPCs, it can be assumed that co-implantation of BDMSCs and SCPC can be a promising approach to the restoration of osteochondral defects and in the OA therapy in clinic [69, 76].

One should mention great attention being recently paid to the study of BDMSCs secretome and its influence on the resident cells [77], and particularly BDMSCs secretome effect on chondrocytes in the course of neochondrogenesis in particular [62]. The differences in BDMSCs secretome used at different stages of OA progression, that might be of clinical significance, were revealed [15].



СККП может быть перспективным подходом к восстановлению остеохондральных дефектов и при лечении ОА в клинических условиях [69, 76].

Следует отметить, что в последнее время уделяется большое внимание изучению секрета МСККТ и его влияния на резидентные клетки [77], в частности, влияния секрета МСКК на хондроциты в процессе неохондрогенеза [62]. Были выявлены различия в секрете МСККТ, используемых на разных стадиях прогрессирования ОА, что может иметь клиническое значение [15].

*Криоконсервирование СК.* При длительном культивировании СК *in vitro* могут возникать проблемы в плане биобезопасности (хромосомные аномалии, злокачественная трансформация) и нарушения функциональных свойств клеток, что ограничивает их использование в клинике. В этой связи перспективным методом является криоконсервирование СК. Было проведено большое количество исследований по оптимизации режимов криоконсервирования, разработке морозильных устройств и защитных сред. Создание низкотемпературных банков СК необходимо для осуществления их клинического применения в будущем [72].

В настоящее время с целью применения СК, полученных из разных источников, разработаны соответствующие протоколы замораживания, определены криопротекторы, сроки и температура хранения [73]. У пациентов с патологией коленного сустава были выделены резидентные СККП, которые помещали в биомиметический биоскаффолд, состоящий из плазмы, обогащенной тромбоцитами, и синовиальной жидкости [16]. Проведено тестирование нескольких защитных растворов на основе ДМСО, сахарозы и сыворотки крови человека. Замораживание проводили в несколько этапов: материал на 20 мин помещали на лед, затем в течение ночи он находился при  $-80^{\circ}\text{C}$  и затем на протяжении трех недель хранился при температуре жидкого азота. Отогрев проводили быстро при  $37^{\circ}\text{C}$ . Образцы, криоконсервированные с 10% ДМСО или в комбинированном растворе с 10% ДМСО и 0,2М сахарозы, после оттаивания демонстрировали лучшую (по сравнению с криоконсервированными в других сочетаниях ДМСО, сахарозы и сыворотки) жизнеспособность и дифференцировались в хондроциты.

Пациентам, имеющим патологию тазобедренного сустава [43], было предложено лечение – введение криоконсервированных СККП из синовиальных мембран. В исследовании была

*Cryopreservation of SCs.* Prolonged *in vitro* culturing of SCs culture may cause certain problems with biosafety (chromosomal abnormalities, malignant transformation) and impair functional properties of the cells limiting their clinical use. In this regard the cryopreservation of SCs is quite promising. A huge number of studies on enhancement of cryopreservation regimens, devising of freezers and composition of cryopreserving media was conducted. Establishing the low-temperature banks of SCs is necessary to ensure their clinical use in future [72].

Currently, with the aim of using the SCs obtained from various sources, the appropriate freezing protocols have been developed and cryoprotective agents, storage periods and temperatures have been determined [73]. Resident SCPCs were isolated from patients with the knee joint pathology, which were then placed in a biomimetic bioscaffold, consisting of platelet enriched plasma and synovial fluid [16]. Several protective solutions based on DMSO, sucrose and human blood serum have been tested. Freezing was carried out in several stages: the material was placed on ice for 20 minutes, then it was kept overnight at  $-80^{\circ}\text{C}$  and then it was stored for three weeks at liquid nitrogen temperature. Thawing was carried out quickly at  $37^{\circ}\text{C}$ . Samples cryopreserved with 10% DMSO or in a combined solution with 10% DMSO and 0.2 M sucrose showed better viability after thawing (compared to those cryopreserved with other combinations of DMSO, sucrose and serum) and differentiated into chondrocytes.

The treatment based on the administration of cryopreserved SCPCs derived from synovial membranes was offered to patients with hip pathology [43]. The study tested five cryoprotective agents. The samples were frozen in the following way: keeping on ice for 10 minutes, followed by an overnight at  $-80^{\circ}\text{C}$  with the subsequent storage at liquid nitrogen temperature for a week and quick thawing at  $37^{\circ}\text{C}$ . Cell morphology, their metabolic activity, quality of the RNA, cytokine secretion rate were similar to those of the non-frozen specimens. The results were the highest with a combination of DMSO and fetal bovine serum (FBS), commercial media CS10 (STEMCELL Technologies, Canada), CryoSFM (compared to the media CS2 and Biofreeze (Merck Millipore, Germany)).

Effectiveness of the knee joint osteochondral defect restoration was studied on three groups of rabbits. In the first group the defect was made without any additional interventions; in the second one SCPCs from the articular cartilage grown in the triple layered culture were administered into





проведена апробация пяти криопротекторов. Образцы замораживали следующим образом: содержание в течение 10 мин на льду, затем в течение ночи при  $-80^{\circ}\text{C}$  и хранение на протяжении недели при температуре жидкого азота. Отогрев образцов проводили быстро при  $37^{\circ}\text{C}$ . Морфологическое строение клеток, их метаболическая активность, качество РНК, уровень секреции цитокинов не отличались от данных показателей незамороженных образцов. Результаты были лучшими при комбинации ДМСО и фетальной бычьей сыворотки (ФБС), коммерческих сред «CS10», «CryoSFM» по сравнению с «CS2» и «Biofreeze» («Merck Millipore», Германия).

Эффективность восстановления остеохондрального дефекта коленного сустава исследовали на кроликах трех групп: животным первой группы травмировали сустав без последующего лечения; второй группе в дефект вводили СККП суставного хряща, выращенные в трехслойной культуре; третьей группе вводили выращенные в трехслойной культуре клетки, подвергнутые витрификации и оттаиванию. Морфологическая структура и иммуногистохимические характеристики СККП кроликов второй и третьей групп существенно не отличались. Через 12 месяцев у животных данных групп наблюдалось одинаковое восстановление дефекта [65].

Интерес представляет исследование на кроликах, в котором сравнивали хондрогенный потенциал криоконсервированных СККП из синовиальных мембран и суставного хряща коленного сустава. Установлено, что жизнеспособность и активность дифференцировки СККП, выделенных из синовиальных мембран, в хондроциты была выше, чем у клеток, полученных из гиалинового хряща [48].

Эффективность восстановления дефекта межпозвоночного диска исследовали на трех группах крыс. Животным первой группы создавали дефект без лечения; второй группе крыс вводили СККП из бедренной кости; третьей группе вводимые СККП подвергали медленному замораживанию до  $-80^{\circ}\text{C}$  и хранили в течение трех месяцев при температуре жидкого азота. Отогрев клеток проводили при  $40^{\circ}\text{C}$ . В качестве криопротектора использовали 10% ДМСО и 20% ФБС. Результаты гистоморфометрического анализа межпозвоночных дисков через 30, 60 и 90 суток после операции показали, что в ранние сроки наблюдения интенсивность образования хряща после введения криоконсервированных клеток была ниже, чем после введения нативных клеток, но через 90 суток у животных всех групп различия данного показателя нивелировались [67]. Ис-

the defect; in the third group the cells grown in the triple layered culture and subjected to vitrification, followed by thawing were administered. No significant differences were observed in morphology and immunohistochemical characteristics between SCPCs from groups two and three. Effective restoration of the defect was found in these groups 12 months later [65].

Study on rabbits to compare the chondrogenic potential of the cryopreserved SCPCs from synovial membranes and the articular cartilage of the knee joint is also of interest. It was found that viability and efficiency of SCPCs differentiation, isolated from the synovial membranes, into chondrocytes appeared to be higher in the cells obtained from the hyaline cartilage [48].

Efficiency of the intervertebral disc defect restoration was studied in three groups of rats. In the first group animals the defect was made without treatment; the second group received the SCPCs from the femoral bone; in the third group the SCPCs were subjected to slow freezing down to  $-80^{\circ}\text{C}$  and stored for three months at liquid nitrogen temperature. The cells were thawed at  $40^{\circ}\text{C}$ . 10% DMSO and 20% FBS were used as cryoprotectants. Histomorphometry of the intervertebral discs performed in 30, 60 and 90 days after the surgery showed that during the early follow up the intensity of chondrogenesis following the administration of the cryopreserved cells was lower than after administering the native cells, however in 90 days the differences in this index were leveled in animals of all the groups [67]. Effects of cryopreserved SCPCs from the canine and human intervertebral discs on viability of cells, their proliferation, level of glycosaminoglycan synthesis, and aggrecan synthesis coding gene expression were also studied [41]. The specimens were slowly frozen down to  $-80^{\circ}\text{C}$  and then stored for two weeks at the liquid nitrogen temperature and warmed at  $37^{\circ}\text{C}$ . 10% DMSO and 20% FBS were used as cryoprotectants. After warming the SCPCs were co-cultured with bone marrow SCs, which, according to the authors, led to activation of intervertebral discs SCPCs. No clear differences in the chondrogenic potential of the native and cryopreserved SCPCs were found. Based on the data obtained it was concluded that activated SCPCs could be used in clinical setting.

## Conclusion

Thus, the reported data analysis indicates that currently niches of SCs in all types of cartilage have been identified, specific features and mechanism of the cartilage SCs action tissue have been determined, and experimental models of its patho-



следовали также эффект криоконсервированных СККП межпозвоночных дисков собаки и человека на жизнеспособность клеток, их пролиферацию, уровень синтеза гликозаминогликанов и экспрессии генов, кодирующих синтез агреканов [41]. Образцы медленно замораживали до  $-80^{\circ}\text{C}$ , затем в течение двух недель хранили при температуре жидкого азота. Отогрев проводили при  $37^{\circ}\text{C}$ . В качестве криопротектора использовали 10% ДМСО и 20% ФБС. После размораживания СККП культивировали совместно с СК костного мозга, что, по мнению авторов, приводило к активации СККП межпозвоночных дисков. Четких различий в хондрогенном потенциале нативных и криоконсервированных СККП не установлено. На основании имеющихся данных было сделано заключение о возможности использования активированных СККП в клинической практике.

### Выводы

Таким образом, результаты анализа литературы свидетельствуют о том, что в настоящее время определены ниши СК во всех видах хряща, специфические особенности и механизм действия СК хрящевой ткани и разработаны экспериментальные модели ее патологии. Результаты экспериментальных исследований продемонстрировали возможность использования СК для лечения заболеваний, связанных с патологией хрящевой ткани. Показано, что применение криоконсервированных СККП хрящевой ткани во врачебной практике является эффективным и перспективным. Однако данная проблема требует проведения дальнейших исследований, направленных на разработку оптимальных режимов замораживания и криозащитных сред, а также на обеспечение безопасности проводимой терапии.

### Литература

1. Aryaei A, Vapniarsky N, Ma DV, et al. Recent tissue engineering advances for the treatment of temporomandibular joint disorders. *Curr Osteoporosis Rep.* 2016; 14: 269–79.
2. Bailey J, Fields A, Liebenberg E, et al. Comparison of vertebral and intervertebral disc lesions in aging humans and rhesus monkeys. *Osteoarthritis Cartilage.* 2014; 22: 980–5.
3. Bright P, Hambly K. A systematic review of reporting of rehabilitation in articular-cartilage-repair studies of third-generation autologous chondrocyte implantation in the knee. *J Sport Rehabil.* 2014; 23: 182–91.
4. Chan W, Tiffany Y, Au K, et al. Coming together is a beginning: the making of an intervertebral disc birth defects. *Research (Part C).* 2014; 102: 83–100.

logy have been developed. Our findings have demonstrated the possibility of using SCs for treatment of the diseases associated with cartilage tissue pathology. It has been shown that the use of cryopreserved cartilage tissue SCPCs in medical practice is effective and promising. However, quite a small number of reported data confirms the need for further research aimed at developing optimal freezing regimens and cryoprotective media, ensuring safety of this therapy.

### References

1. Aryaei A, Vapniarsky N, Ma DV, et al. Recent tissue engineering advances for the treatment of temporomandibular joint disorders. *Curr Osteoporosis Rep.* 2016; 14: 269–79.
2. Bailey J, Fields A, Liebenberg E, et al. Comparison of vertebral and intervertebral disc lesions in aging humans and rhesus monkeys. *Osteoarthritis Cartilage.* 2014; 22: 980–5.
3. Bright P, Hambly K. A systematic review of reporting of rehabilitation in articular-cartilage-repair studies of third-generation autologous chondrocyte implantation in the knee. *J Sport Rehabil.* 2014; 23: 182–91.
4. Chan W, Tiffany Y, Au K, et al. Coming together is a beginning: the making of an intervertebral disc birth defects. *Research (Part C).* 2014; 102: 83–100.
5. Chen S, Deng X, Ma K, et al. Icarin improves the viability and function of cryopreserved human nucleus pulposus-derived mesenchymal stem cells. *Oxid Med Cell Longev.* 2018; 18: 1–12.
6. Chisnoiu AM, Picos AM, Popa S, et al. Factors involved in the etiology of temporomandibular disorders – a literature review. *Clujul Med.* 2015; 88: 473–8.
7. Cui G, Wang Y, Li C, et al. Efficacy of mesenchymal stem cells in treating patients with osteoarthritis of the knee: a meta analysis. *Exp Ther Med.* 2016; 12: 3390–400.
8. Daly C, Ghosh P, Jenkin G, et al. A review of animal models of intervertebral disk degeneration: pathophysiology, regeneration, and translation to the clinic. *Spine.* 2011; 36: 1519–27.
9. De Bari C, Dell'Accio F, Tylzanowski P, Luyten FP. Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane. *Arthritis Rheum.* 2001; 44: 1928–42.
10. Detamore M, Athanasiou K. Motivation, characterization, and strategy for tissue engineering the temporomandibular joint disc. *Tissue Eng.* 2003; 9: 1065–87.
11. Ding Z, Huang H. Mesenchymal stem cells in rabbit meniscus and bone marrow exhibit a similar feature but a heterogeneous multi-differentiation potential: superiority of meniscus as a cell source for meniscus repair. *BMC Musculoskeletal Disorders.* 2015; 16: 65–6.
12. Fellows CR, Matta C, Zakany R, et al. Adipose, bone marrow and synovial joint-derived mesenchymal stem cells for cartilage repair. *Front Genet [Internet].* 2016 [cited 24.04.2019]; 7:23. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5167763/pdf/fgene-07-00213.pdf>
13. Feng Y, Egan B, Wang J. Genetic factors in intervertebral disk degeneration. *Genes Dis.* 2016; 3: 178–85.
14. Giri TK, Alexander A, Agrawal M, Ajazuddin S. Current status of stem cell therapies in tissue repair and regeneration. *Curr Stem Cell Res Ther.* 2018; 13(7): 1–10.



5. Chen S, Deng X, Ma K, et al. Icarin improves the viability and function of cryopreserved human nucleus pulposus-derived mesenchymal stem cells. *Oxid Med Cell Longev*. 2018; 18: 1–12.
6. Chisnoiu AM, Picos AM, Popa S, et al. Factors involved in the etiology of temporomandibular disorders – a literature review. *Clujul Med*. 2015; 88: 473–8.
7. Cui G, Wang Y, Li C, et al. Efficacy of mesenchymal stem cells in treating patients with osteoarthritis of the knee: a meta analysis. *Exp Ther Med*. 2016;12: 3390–400.
8. Daly C, Ghosh P, Jenkin G, et al. A review of animal models of intervertebral disk degeneration: pathophysiology, regeneration, and translation to the clinic. *Spine*. 2011;36: 1519–27.
9. De Bari C, Dell'Accio F, Tylzanowski P, Luyten FP. Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane. *Arthritis Rheum*. 2001; 44: 1928–42.
10. Detamore M, Athanasios K. Motivation, characterization, and strategy for tissue engineering the temporomandibular joint disc. *Tissue Eng*. 2003; 9: 1065–87.
11. Ding Z, Huang H. Mesenchymal stem cells in rabbit meniscus and bone marrow exhibit a similar feature but a heterogeneous multi-differentiation potential: superiority of meniscus as a cell source for meniscus repair. *BMC Musculoskeletal Disorders*. 2015; 16: 65–6.
12. Fellows CR, Matta C, Zakany R, et al. Adipose, bone marrow and synovial joint-derived mesenchymal stem cells for cartilage repair. *Front Genet* [Internet]. 2016 [cited 24.04.2019]; 7:23. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5167763/pdf/fgene-07-00213.pdf>
13. Feng Y, Egan B, Wang J. Genetic factors in intervertebral disk degeneration. *Genes Dis*. 2016;3: 178–85.
14. Giri TK, Alexander A, Agrawal M, Ajazuddin S. Current status of stem cell therapies in tissue repair and regeneration. *Curr Stem Cell Res Ther*. 2018;13(7): 1–10.
15. Gómez-Aristizábal A, Sharma A, Bakooshli MA, et al. Stage-specific differences in secretory profile of mesenchymal stromal cells (MSCs) subjected to early- vs late-stage OA synovial fluid. *Osteoarthritis Cartilage*. 2017;25: 737–41.
16. Gurruchaga H, Saenz del Burgo L, Garate A, et al. Cryopreservation of human mesenchymal stem cells in an allogeneic bioscaffold based on platelet rich plasma and synovial fluid. *Sci Rep*. [Internet]. 2017 [cited 24.04.2019]; 7: 15733. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41598-017-16134-6>
17. Hatsushika D, Muneta T, Nakamu T, et al. Repetitive allogeneic intraarticular injections of synovial mesenchymal stem cells promote meniscus regeneration in a porcine massive meniscus defect model. *Osteoarthritis Cartilage*. 2014;22: 941–50.
18. Hilkens P, Driesen RB, Wolfs E, et al. Cryopreservation and banking of dental stem cells. *Adv Exp Med Biol*. 2016;951: 199–235.
19. Hoffman RM, Kajiura S, Cao W, et al. Cryopreservation of hair-follicle associated pluripotent (HAP) stem cells maintains differentiation and hair-growth potential. *Adv Exp Med Biol*. 2016; 951: 191–8.
20. Hunter CJ, Matyas JR, Duncan NA. Cytomorphology of notochondral and chondrocytic cells from the nucleus pulposus: a species comparison. *J Anat*. 2004; 205: 357–62
21. Hwang S, Kim SY, Park SH, et al. Human inferior turbinate: an alternative tissue source of multipotent mesenchymal stromal cells. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 2012;147: 568–74.
22. Imai Y, Okuma M, An HS, et al. Restoration of disc height loss by recombinant human osteogenic protein-1 injection into intervertebral discs undergoing degeneration induced by an intradiscal injection of chondroitinase ABC. *Spine*. 2007;32: 1197–205.
23. Jiang Y, Tuan R. Origin and function of cartilage stem/progenitor cells in osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol*. 2015;11: 206–12.
24. Jiang Y, Cai Y, Zhang W, et al. Human cartilage-derived progenitor cells from committed chondrocytes for efficient
25. Gómez-Aristizábal A, Sharma A, Bakooshli MA, et al. Stage-specific differences in secretory profile of mesenchymal stromal cells (MSCs) subjected to early- vs late-stage OA synovial fluid. *Osteoarthritis Cartilage*. 2017;25: 737–41.
26. Gurruchaga H, Saenz del Burgo L, Garate A, et al. Cryopreservation of human mesenchymal stem cells in an allogeneic bioscaffold based on platelet rich plasma and synovial fluid. *Sci Rep*. [Internet]. 2017 [cited 24.04.2019]; 7: 15733. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41598-017-16134-6>
27. Hatsushika D, Muneta T, Nakamu T, et al. Repetitive allogeneic intraarticular injections of synovial mesenchymal stem cells promote meniscus regeneration in a porcine massive meniscus defect model. *Osteoarthritis Cartilage*. 2014;22: 941–50.
28. Hilkens P, Driesen RB, Wolfs E, et al. Cryopreservation and banking of dental stem cells. *Adv Exp Med Biol*. 2016;951: 199–235.
29. Hoffman RM, Kajiura S, Cao W, et al. Cryopreservation of hair-follicle associated pluripotent (HAP) stem cells maintains differentiation and hair-growth potential. *Adv Exp Med Biol*. 2016;951: 191–8.
30. Hunter CJ, Matyas JR, Duncan NA. Cytomorphology of notochondral and chondrocytic cells from the nucleus pulposus: a species comparison. *J Anat*. 2004; 205: 357–62
31. Hwang S, Kim SY, Park SH, et al. Human inferior turbinate: an alternative tissue source of multipotent mesenchymal stromal cells. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 2012;147: 568–74.
32. Imai Y, Okuma M, An HS, et al. Restoration of disc height loss by recombinant human osteogenic protein-1 injection into intervertebral discs undergoing degeneration induced by an intradiscal injection of chondroitinase ABC. *Spine*. 2007;32: 1197–205.
33. Jiang Y, Tuan R. Origin and function of cartilage stem/progenitor cells in osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol*. 2015;11: 206–12.
34. Jiang Y, Cai Y, Zhang W, et al. Human cartilage-derived progenitor cells from committed chondrocytes for efficient
35. Gómez-Aristizábal A, Sharma A, Bakooshli MA, et al. Stage-specific differences in secretory profile of mesenchymal stromal cells (MSCs) subjected to early- vs late-stage OA synovial fluid. *Osteoarthritis Cartilage*. 2017;25: 737–41.
36. Gurruchaga H, Saenz del Burgo L, Garate A, et al. Cryopreservation of human mesenchymal stem cells in an allogeneic bioscaffold based on platelet rich plasma and synovial fluid. *Sci Rep*. [Internet]. 2017 [cited 24.04.2019]; 7: 15733. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41598-017-16134-6>
37. Hatsushika D, Muneta T, Nakamu T, et al. Repetitive allogeneic intraarticular injections of synovial mesenchymal stem cells promote meniscus regeneration in a porcine massive meniscus defect model. *Osteoarthritis Cartilage*. 2014;22: 941–50.
38. Hilkens P, Driesen RB, Wolfs E, et al. Cryopreservation and banking of dental stem cells. *Adv Exp Med Biol*. 2016;951: 199–235.
39. Hoffman RM, Kajiura S, Cao W, et al. Cryopreservation of hair-follicle associated pluripotent (HAP) stem cells maintains differentiation and hair-growth potential. *Adv Exp Med Biol*. 2016; 951: 191–8.
40. Hunter CJ, Matyas JR, Duncan NA. Cytomorphology of notochondral and chondrocytic cells from the nucleus pulposus: a species comparison. *J Anat*. 2004; 205: 357–62
41. Hwang S, Kim SY, Park SH, et al. Human inferior turbinate: an alternative tissue source of multipotent mesenchymal stromal cells. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 2012;147: 568–74.
42. Imai Y, Okuma M, An HS, et al. Restoration of disc height loss by recombinant human osteogenic protein-1 injection into intervertebral discs undergoing degeneration induced by an intradiscal injection of chondroitinase ABC. *Spine*. 2007;32: 1197–205.
43. Jiang Y, Tuan R. Origin and function of cartilage stem/progenitor cells in osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol*. 2015;11: 206–12.
44. Jiang Y, Cai Y, Zhang W, et al. Human cartilage-derived progenitor cells from committed chondrocytes for efficient
45. Johnson VL, Hunter DJ. The epidemiology of osteoarthritis. *Best Pract Res Clin Rheumatol*. 2014;28: 5–15.
46. Johnstone B, Alini M, Cucchiari M, Dodge G, et al. Tissue engineering for articular cartilage repair – the state of the art. *Eur Cell Mater*. 2013;25: 248–67.
47. Kahn D, Les C, Xia Y. Effects of cryopreservation on the depth-dependent elastic modulus in articular cartilage and implications for osteochondral grafting. *J Biomech Eng*. 2015; 137(5): 54–9.
48. Kasai N, Mera H, Wakitani S, et al. Effect of epigallocatechin-3-o-gallate and quercetin on the cryopreservation of cartilage tissue. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2017;81(1): 192–9.
49. Katz JN. Lumbar disk disorders and low-back pain: socioeconomic factors and consequences. *J Bone Joint Surg Am*. 2006;88(2): 21–4.
50. Kim J, Song D, Kim S, et al. Development and characterization of various osteoarthritis models for tissue engineering. *PLoS ONE* [Internet]. 2018 [cited 24.07.2018]; 13(3): e0194288. Available from: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0194288>
51. Kimura T, Nakata K, Tsumaki N, et al. Progressive degeneration of articular cartilage and intervertebral discs. An experimental study in transgenic mice bearing a type IX collagen mutation. *Int Orthop*. 1996;20(3): 177–81.
52. Kobayashi S, Takebe T, Inuia M, et al. Reconstruction of human elastic cartilage by a CD44<sup>+</sup> CD90<sup>+</sup> stem cell in the ear perichondrium. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011; 108: 14479–84.
53. Kobayashi S, Takebe T, Zheng Y, et al. Presence of cartilage stem/progenitor cells in adult mice auricular perichondrium. *PLoS ONE* [Internet]. 2011 [cited 03.06.2018]; 6(10):



- cartilage repair and regeneration. *Stem Cells Trans Med* 2016;5: 733–44.
25. Johnson VL, Hunter DJ. The epidemiology of osteoarthritis. *Best Pract Res Clin Rheumatol*. 2014;28: 5–15.
  26. Johnstone B, Alini M, Cucchiari M, Dodge G, et al. Tissue engineering for articular cartilage repair – the state of the art. *Eur Cell Mater*. 2013;25: 248–67.
  27. Kahn D, Les C, Xia Y. Effects of cryopreservation on the depth-dependent elastic modulus in articular cartilage and implications for osteochondral grafting. *J Biomech Eng*. 2015;137(5): 54–9.
  28. Kasai N, Mera H, Wakitani S, et al. Effect of epigallocatechin-3-o-gallate and quercetin on the cryopreservation of cartilage tissue. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2017;81(1):192–9.
  29. Katz JN. Lumbar disk disorders and low-back pain: socio-economic factors and consequences. *J Bone Joint Surg Am*. 2006;88(2): 21–4.
  30. Kim J, Song D, Kim S, et al. Development and characterization of various osteoarthritis models for tissue engineering. *PLoS ONE* [Internet]. 2018 [cited 24.07.2018]; 13(3): e0194288. Available from: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0194288>
  31. Kimura T, Nakata K, Tsumaki N, et al. Progressive degeneration of articular cartilage and intervertebral discs. An experimental study in transgenic mice bearing a type IX collagen mutation. *Int Orthop*. 1996;20(3): 177–81.
  32. Kobayashi S, Takebe T, Inuia M, et al. Reconstruction of human elastic cartilage by a CD44<sup>+</sup> CD90<sup>+</sup> stem cell in the ear perichondrium. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011; 108: 14479–84.
  33. Kobayashi S, Takebe T, Zheng Y, et al. Presence of cartilage stem/progenitor cells in adult mice auricular perichondrium. *PLoS ONE* [Internet]. 2011 [cited 03.06.2018]; 6(10): e26393. Available from: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0026393>
  34. Lampropoulou-Adamidou K, Lelovas P, Karadimas EV, et al. Useful animal models for the research of osteoarthritis. *Eur J Orthop Surg Traumatol*. 2014; 24: 263–71.
  35. Lee WY, Wang B. Cartilage repair by mesenchymal stem cells: Clinical trial update and perspectives. *J Orthop Translant*. 2017; 9: 76–88.
  36. Levillain A, Boulocher C, Kaderli S, et al. Meniscal biomechanical alterations in ACLT rabbit model of early osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage*. 2015; 23: 1186–93.
  37. Little C, Smith M. Animal models of osteoarthritis. *Cur Rheumatol Rev*. 2008; 4: 1–8.
  38. Luo S, Shi Q, Zha Z, et al. Morphology and mechanics of chondroid cells from human adipose-derived stem cells detected by atomic force microscopy. *Mol Cell Biochem*. 2012; 365: 223–31.
  39. Maerz T, Herkowitz H, Baker K. Molecular and genetic advances in the regeneration of the intervertebral disc. *Surg Neurol Int*. 2013; 4(2): S94–S105.
  40. Marquez-Curtis LA, Janowska-Wieczorek A, McGann LE, et al. Mesenchymal stromal cells derived from various tissues: Biological, clinical and cryopreservation aspects. *Cryobiology*. 2015; 71(2): 181–97.
  41. Masahiro T, Sakai D, Hiyama A, et al. Effect of cryopreservation on canine and human activated nucleus pulposus cells: a feasibility study for cell therapy of the intervertebral disc. *Biores Open Access*. 2013; 2(4): 273–82.
  42. Mastbergen SC, Marijnissen AC, Vianen ME, et al. The canine 'groove' model of osteoarthritis is more than simply the expression of surgically applied damage. *Osteoarthritis Cartilage*. 2006; 14: 39–46.
  43. Mathijs GA, de Vries M, Bennink MB. Functional tissue analysis reveals successful cryopreservation of human osteoarthritic synovium. *PLoS One* [Internet]. 2016 [cited 24.04.2019]; 11(1):e0167076. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5117761/pdf/pone.0167076.pdf>
  44. Marmor M, Cesaro A, Ali M, Best TM, et al. Progenitor cells from cartilage: grade specific differences in stem cell marker expression. *Int J Mol Sci*. 2017; 18: 1759–60.
  45. McCoy AM. Animal models of osteoarthritis: comparisons and key considerations. *Vet Pathol*. 2015; 52: 803–18.
  46. McConagle D, Baboolal TG, Jones E. Native joint-resident mesenchymal stem cells for cartilage repair in osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol*. 2017; 12: 719–30.
  47. Morrison KA, Cohen BP, Asanbe O, et al. Optimizing cell sourcing for clinical translation of tissue engineered ears. *Biofabrication* [Internet]. 2016 [cited 03.06.2018]; 9: 015004. Available from: <https://iopscience.iop.org/article/10.1088/1758-5090/9/1/015004>
  48. Nam BM, Kim BY, Jo YH, et al. Effect of cryopreservation and cell passage number on cell preparations destined for autologous chondrocyte transplantation. *Transplant Proc*. 2014; 46(4): 1145–9.
  49. Nam Y, Rim Y, Lee J, Ju J. Current therapeutic strategies for stem cell-based cartilage regeneration. *Stem Cells Int* [Internet]. 2018 [cited 03.06.2018]; 2018: 8490489. Available from: <https://www.hindawi.com/journals/sci/2018/8490489/>
  50. Oldershaw RA. Cell Sources for the regeneration of articular cartilage: the past, the horizon and the future. *Int J Exp Pathol*. 2012; 93: 389–400.
  51. Otto IA, Levato R, Webb WR, et al. Progenitor cells in auricular cartilage demonstrate cartilage-forming capacity in 3D hydrogel culture. *Eur Cell Mater*. 2018; 35: 132–50.
  52. Pattappa G, Li Z, Peroglio M, et al. Diversity of intervertebral disc cells: phenotype and function. *J Anat*. 2012; 221: 480–96.
  53. Perdikakis E, Karachalios T, Katonis P, Karantanas A. comparison of MR-arthrography and MDCT-arthrography for detection of labral and articular cartilage hip pathology. *Skeletal Radiol*. 2011; 40: 1441–7.



44. Mazor M, Cesaro A, Ali M, Best TM, et al. Progenitor cells from cartilage: grade specific differences in stem cell marker expression. *Int J Mol Sci.* 2017; 18: 1759–60.
45. McCoy AM. Animal models of osteoarthritis: comparisons and key considerations. *Vet Pathol.* 2015; 52: 803–18.
46. McGonagle D, Baboolal TG, Jones E. Native joint-resident mesenchymal stem cells for cartilage repair in osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol.* 2017; 12: 719–30.
47. Morrison KA, Cohen BP, Asanbe O, et al. Optimizing cell sourcing for clinical translation of tissue engineered ears. *Biofabrication* [Internet]. 2016 [cited 03.06.2018]; 9: 015004. Available from: <https://iopscience.iop.org/article/10.1088/1758-5090/9/1/015004>
48. Nam BM, Kim BY, Jo YH, et al. Effect of cryopreservation and cell passage number on cell preparations destined for autologous chondrocyte transplantation. *Transplant Proc.* 2014; 46(4): 1145–9.
49. Nam Y, Rim Y, Lee J, Ju J. Current therapeutic strategies for stem cell-based cartilage regeneration. *Stem Cells Int* [Internet]. 2018 [cited 03.06.2018]; 2018: 8490489. Available from: <https://www.hindawi.com/journals/sci/2018/8490489/>
50. Oldershaw RA. Cell Sources for the regeneration of articular cartilage: the past, the horizon and the future. *Int J Exp Pathol.* 2012; 93: 389–400.
51. Otto IA, Levato R, Webb WR, et al. Progenitor cells in auricular cartilage demonstrate cartilage-forming capacity in 3D hydrogel culture. *Eur Cell Mater.* 2018; 35: 132–50.
52. Pattappa G, Li Z, Peroglio M, et al. Diversity of intervertebral disc cells: phenotype and function. *J Anat.* 2012; 221: 480–96.
53. Perdikakis E, Karachalios T, Katonis P, Karantanas A. Comparison of MR-arthrography and MDCT-arthrography for detection of labral and articular cartilage hip pathology. *Skeletal Radiol.* 2011; 40: 1441–7.
54. Rizk A, Rabie AB. Human dental pulp stem cells expressing transforming growth factor  $\beta$ 3 transgene for cartilage-like tissue engineering. *Cytotherapy.* 2013; 5: 712–25.
55. Rodrigues-Pinto R, Richardson SM, Hoyland JA. An understanding of intervertebral disc development, maturation and cell phenotype provides clues to direct cell-based tissue regeneration therapies for disk degeneration. *Eur Spine J.* 2014; 23: 1803–14.
56. Rusu E, Necula L, Neagu A, et al. Current status of stem cell therapy: Opportunities and limitations. *Turk J Biol.* 2016; 40: 955–67.
57. Sahlman J, Inkinen R, Hirvonen T, Lammi MJ. Premature vertebral endplate ossification and mild disc degeneration in mice after inactivation of one allele belonging to the gene for Type II collagen. *Spine.* 2001; 26(23): 2558–65.
58. Sekiya I, Ojima M, Suzuki S, et al. Human mesenchymal stem cells in synovial fluid increase in the knee with degenerated cartilage and osteoarthritis. *J Orthop Res.* 2012; 30(6): 943–9.
59. Shen W, Chen J, Zhu T, et al. Intra-articular injection of human meniscus stem/progenitor cells promotes meniscus regeneration and ameliorates osteoarthritis through stromal cell-derived factor-1/CXCR4-mediated homing. *Stem Cells Trans Med.* 2014; 3: 387–94.
60. Singh K, Masuda K, An HS. Animal models for human disc degeneration. *Spine J.* 2005; 6: 267S–279S.
61. Sriutha W, Uttamo N, Kongkaew A. Ex vivo and in vivo characterization of cold preserved cartilage for cell transplantation. *Cell Tissue Bank.* 2016; 17(4): 721–34.
62. Stoddart MJ, Bara J, Alini M. Cells and secretome – towards endogenous cell re-activation for cartilage repair. *Adv Drug Deliv Rev.* 2015; 84: 135–45.
63. Sun Y, Zhang G, Liu Q, et al. Chondroitin sulfate from sturgeon bone ameliorates pain of osteoarthritis induced by monosodium iodoacetate in rats. *Int J Biol Macromol.* 2018; 117: 95–101.
64. Tang R, Jing L, Willard V, et al. Differentiation of human induced pluripotent stem cells into nucleus pulposus-like cells. *Stem Cell Res Ther.* 2018; 9: 61–3.
65. Tani Y, Sato M, Maehara M, et al. The effects of using vitrified chondrocyte sheets on pain alleviation and articular cartilage repair. *J Tissue Eng Regen Med.* 2017; 11(12): 3437–44.
66. Vangsness CT Jr, Higgs G, Hoffman JK. Implantation of a novel cryopreserved viable osteochondral allograft for articular cartilage repair in the knee. *J Knee Surg.* 2018; 31(6): 528–35.
67. Volkova N, Yukhta M, Goltsev A. Cryopreserved mesenchymal stem cells stimulate regeneration in an intervertebral disc. *Biomed.* 2015; 3: 237–47.
68. Wei X, Yang X, Han Z, Shao Q, et al. Mesenchymal stem cells: a new trend for cell therapy. *Acta Pharmacologica Sinica.* 2013; 34: 747–54.
69. Wu L, Prins HJ, Helder MN, et al. Trophic effects of mesenchymal stem cells in chondrocyte co-cultures are independent of culture conditions and cell sources. *Tissue Eng Part A.* 2012; 18: 1542–51.
70. Yan J, Tian F, Wang W, et al. Age dependent changes in cartilage matrix, subchondral bone mass, and estradiol levels in blood serum, in naturally occurring osteoarthritis in guinea pigs. *Int J Mol Sci.* 2014; 15: 13578–95.
71. Yang N, Nayeb-Hashemi H, Canavan PK. The combined effect of frontal plane tibiofemoral knee angle and meniscectomy on the cartilage contact stresses and strains. *Ann Biomed Eng.* 2009; 37: 2360–72.
72. Yong KW, Choi JR, Wan Safwani WK. Biobanking of human mesenchymal stem cells: future strategy to facilitate clinical applications. *Adv Exp Med Biol.* 2016; 951: 99–110.
73. Yong KW, Wan Safwani WK, Xu F. Cryopreservation of human mesenchymal stem cells for clinical applications: current



64. Tang R, Jing L, Willard V, et al. Differentiation of human induced pluripotent stem cells into nucleus pulposus-like cells. *Stem Cell Res Ther*. 2018; 9: 61–3.
65. Tani Y, Sato M, Maehara M, et al. The effects of using vitrified chondrocyte sheets on pain alleviation and articular cartilage repair. *J Tissue Eng Regen Med*. 2017; 11(12): 3437–44.
66. Vangsness CT Jr, Higgs G, Hoffman JK. Implantation of a novel cryopreserved viable osteochondral allograft for articular cartilage repair in the knee. *J Knee Surg*. 2018; 31(6): 528–35.
67. Volkova N, Yukhta M, Goltsev A. Cryopreserved mesenchymal stem cells stimulate regeneration in an intervertebral disc. *Biomed*. 2015; 3: 237–47.
68. Wei X, Yang X, Han Z, Shao Q, et al. Mesenchymal stem cells: a new trend for cell therapy. *Acta Pharmacologica Sinica*. 2013; 34: 747–54.
69. Wu L, Prins HJ, Helder MN, et al. Trophic effects of mesenchymal stem cells in chondrocyte co-cultures are independent of culture conditions and cell sources. *Tissue Eng Part A*. 2012; 18: 1542–51.
70. Yan J, Tian F, Wang W, et al. Age dependent changes in cartilage matrix, subchondral bone mass, and estradiol levels in blood serum, in naturally occurring osteoarthritis in guinea pigs. *Int J Mol Sci*. 2014; 15: 13578–95.
71. Yang N, Nayeb-Hashemi H, Canavan PK. The combined effect of frontal plane tibiofemoral knee angle and meniscectomy on the cartilage contact stresses and strains. *Ann Biomed Eng*. 2009; 37: 2360–72.
72. Yong KW, Choi JR, Wan Safwani WK. Biobanking of human mesenchymal stem cells: future strategy to facilitate clinical applications. *Adv Exp Med Biol*. 2016; 951: 99–110.
73. Yong KW, Wan Safwani WK, Xu F. Cryopreservation of human mesenchymal stem cells for clinical applications: current methods and challenges. *Biopreserv Biobank*. 2015; 13(4): 231–9.
74. Zellner J, Pattappa G, Koch M, et al. Autologous mesenchymal stem cells or meniscal cells: what is the best cell source for regenerative meniscus treatment in an early osteoarthritis situation. *Stem Cell Res Ther*. 2017; 8: 225–31.
75. Zhang Y, Drapeau S, An H, et al. Histological features of the degenerating intervertebral disc in a goat disc-injury model. *Spine*. 2001; 26: 2558–65.
76. Zhao Z, Zhou X, Guan J, et al. Stem cells and chondrocytes increase the viability of chondrocytes in rat chondral defects. *Oncol Lett*. 2018; 15: 7021–7.
77. Zimmerlin L, Park T, Zambidis E, et al. Mesenchymal stem cell secretome and regenerative therapy after cancer. *Biochimie*. 2013; 95: 2235–45.

