

Экспериментальное и клиническое использование мультипотентных мезенхимальных стволовых клеток для стимуляции регенерации суставного хряща

Новиков А. В.

д.м.н., г.н.с, ФГБУ «ПФМИЦ» Минздрава России. E-mail: novik2.55@inbox.ru

Аннотация

Статья посвящена анализу данных публикаций последних лет, посвященных проблеме практического использования клеточных технологий в лечении больных с поражениями суставов. Рассмотрены источники получения мультипотентных клеток, способы доставки и основные патологии, при которых они применялись. Сделаны выводы, что нет убедительных данных о преимуществах того или иного способа доставки клеток к очагу поражения. Для подтверждения безопасности этой терапии требуются более длительные сроки наблюдения. Остаются не решенными вопросы, касающиеся оптимального источника стромальных клеток, метода их забора и обработки, дозировки, транспорта клеток к очагу поражения, воздействия на них различных физических факторов. Проблема четких показаний к применению клеточной терапии сохраняет актуальность.

Ключевые слова: мультипотентные мезенхимальные стволовые клетки (ММСК), клеточные технологии, сустав, суставной хрящ

Поражение суставного хряща вследствие врожденных аномалий, дегенеративно-дистрофических заболеваний или травм приводит к развитию остеоартроза – прогрессирующей патологии, которая оказывает негативное воздействие на качество жизни пациентов во всех возрастных группах. Нехирургические методы лечения, такие как физиотерапия, медикаментозная терапия, ортезирование, не всегда позволяют достичь желаемого эффекта, либо он бывает недолгим.

Для хирургического лечения ограниченных дефектов суставного хряща предложено много методов: абразивная хондропластика, микрофрактуринг, туннелизация, пересадка донорских или аутологичных костно-хрящевых трансплантатов, имплантация культур клеток, способных к хондрогенезу и его стимуляции.

В этом плане использование клеточных технологий представляется особенно перспективным, о чем свидетельствует увеличение числа зарубежных публикаций, посвященных этой проблеме.

Целью нашего исследования было проведение анализа последних литературных данных, касающихся теоретического обоснования и практических результатов применения мультипотентных мезенхимальных стволовых клеток (ММСК) в эксперименте и клинике для стимуляции регенерации суставного хряща. Полученные сведения предполагалось использовать для разработки будущей стратегии терапии пациентов с

посттравматическими и дегенеративно-дистрофическими поражениями различных суставов.

Был проведен анализ русских и англоязычных материалов, вошедших в информационные базы Medline, Pubmed, Cochrane Database of Systematic Reviews on the Cochrane Library, DisserCat, авторефератов, монографий отечественных и зарубежных авторов, статей в отечественных и зарубежных журналах, опубликованных после 2000 года.

Мультипотентные мезенхимальные стволовые клетки (ММСК), по образному выражению А.І. Carlan [10], действуют как «фельдшер и скорая помощь» – они играют ключевую роль в ответ на повреждение тканей не столько путем дифференцировки, сколько за счет индукции процессов регенерации через секрецию биоактивных молекул. Эти клетки способны подавлять иммунные и воспалительные реакции, выделяют большое количество биологически активных веществ, ускоряющих протекание реакций обмена в тканях, активизируют работу уже имеющихся высокоспециализированных клеток, обладают способностью к пролиферации и дифференциации в другие типы клеток. Способность к пролиферации сохраняется на протяжении нескольких дней после выделения культуры. Кроме того, ММСК можно замораживать при температуре -80°C без заметных потерь жизнеспособности и возможности к дифференцировке.

Доказано, что мультипотентные мезенхимальные стволовые клетки способны к хондрогенной дифференциации – они экспрессируют коллаген II типа и кислые мукополисахариды, типичные для гиалинового хряща, и могут быть использованы в тканевой инженерии [20].

Отмечено, что хондрогенный потенциал мезенхимальных стволовых клеток у пожилых лиц с остеоартрозом коленного сустава зависит от их происхождения – он был выше у клеток, полученных из подкожного жира, чем у культур, источником которых были тело Гоффа и синовиальная жидкость [25].

Дифференциации ММСК в хондроциты способствует обогащение их факторами роста, особенно TGF-beta3 и BMP-6 или TGF-beta3 и IGF-1 [52].

Получение ММСК возможно из разных субстратов: костного мозга (в виде суспензии или концентрата), периферической крови, жировой и синовиальной ткани.

Изложить основные результаты, полученные исследователями, мы решили исходя из используемого ими источника получения ММСК, патологии и способов доставки (табл.1).

Таблица 1. Источники получения мультипотентных клеток, способы доставки и основные патологии, при которых они применялись

Источник ММСК	Патология	Способ доставки
Синовиальная оболочка	Дефекты хряща коленного сустава, ювенильный артрит, остеоартроз, ревматоидный артрит	Внутрисуставные инъекции суспензии клеток
Венозная кровь	Посттравматический гонартроз, остеоартроз	Внутрисуставные инъекции суспензии клеток (в том числе в сочетании с фактором роста и гиалуроновой кислотой), на коллагеновой мембране
Костный мозг	Остеоартроз коленного сустава, поражения таранной кости, дефекты суставного хряща различной этиологии, поражения пателло-фemorального сочленения	Внутрисуставные инъекции клеток, подкожное введение, на фибриновом клее, коллагеновый гель, на гидроксипатит-керамической матрице, коллагеновой мембраны, на коллагеновом скаффолде
Жировая ткань	Хронический остеоартрит крупных суставов, асептический некроз головки бедренной кости, поражения таранной кости	Внутрисуставные инъекции

Способность мультипотентных мезенхимальных стволовых клеток к хондрогеной дифференциации была использована для лечения хрящевых дефектов суставов на ранних стадиях остеоартроза [12,41,44].

Целесообразность применения этих клеток при остеоартрозе обусловлена ещё и тем, что они могут оказывать иммуносупрессивное и противовоспалительное действие [42,2].

Отмечено, что внутрисуставное введение клеток приводит к купированию болевого синдрома у пациентов с остеоартрозом (отличные и хорошие результаты получены в 74,5% случаев). Результаты зависели от возраста пациента, размера дефекта хряща, индекса массы тела: у тучных пациентов, больных старше 60 лет и при дефекте свыше 6,0 см² они были хуже [58,38].

Положительные результаты от инъекций ММСК были отмечены и у пациентов с поражением таранной кости стопы. Причем применяли их у лиц старше 50 лет, имеющих большую площадь поражения кости и наличие в ней кист [15].

В то же время у больных с повреждением менисков введение клеток в полость сустава не приводило к увеличению плотности и размеров мениска, что, по мнению авторов, лишь подтверждало невозможность их регенерации [3].

Инъекции аутологичных ММСК были выполнены шести пациентам с поражением запястно-пястного сустава большого пальца кисти [11]. У всех достигнуто купирование болевого синдрома и улучшение функции пальца. Однако авторы справедливо опасаются

делать какие-либо выводы в виду малого числа наблюдений и отсутствия отдаленных результатов.

H.S.Varma et al. [69] после артроскопического дебридмента коленного сустава выполняли простую инъекцию мезенхимальных клеток в полость сустава, получив хорошие результаты.

Сравнительный анализ результатов артроскопического лечения двух групп пациентов с остеоартрозом коленного сустава, которым проводилось инъекционное введение ММСК в комбинации с обогащенной плазмой (1 группа), а другим – имплантация клеток на фибриновом скаффолде (2 группа), выявил преимущества последней методики, хотя результаты зависели от стадии заболевания [39].

В качестве потенциального источника аутологичных стволовых клеток могут быть ткани, удаленные при замене коленного сустава [62].

Экспериментальные исследования показали высокую хондрогенную активность и пролиферативный потенциал клеток, полученных из синовиальной оболочки [24,43,9]. Есть мнение, что фенотип этих клеток является оптимальным для восстановления хряща [18,37].

Помимо хондроцитов возможна дифференцировка этих клеток в остеобласты, адипоциты, клетки нервной ткани [50].

Обнадёживают результаты использования культуры таких клеток в клинике: 10 пациентов с дефектами хряща коленного сустава, которым вводилась суспензия таких клеток и выполнялось артроскопическое вмешательство, отмечали улучшение состояния, положительная динамика наблюдалась по данным магнитно-резонансной томографии сустава [5]. У пациентов с ювенильными артритами быстро купировался воспалительный процесс, и удавалось предотвратить дальнейшее разрушение сустава [48].

Использование мезенхимальных стволовых клеток, полученных из синовиальной ткани, может быть альтернативной стратегией лечения больных, страдающих остеоартрозом и ревматоидным артритом.

Ведутся исследования по применению **стволовых клеток, полученных из тканей плода** [14]. Предполагается, что пуповинная кровь может содержать мультипотентные стволовые клетки, которые могут дифференцироваться в хондрогенном, остеогенном и адипогенном направлениях.

Аутологичные стволовые клетки, полученные за счет роста культуры из венозной крови, были использованы в виде послеоперационных внутрисуставных инъекций с гиалуроновой кислотой у пяти пациентов с посттравматическим гонартрозом, которым

выполнялось артроскопическое вмешательство в сочетании с субхондральной туннелизацией [6]. Данные повторной артроскопии и гистологического исследования подтверждали положительную динамику регенерации суставного хряща. Осложнений не было.

Хорошие результаты дает имплантация стволовых клеток, полученных за счет роста культуры из венозной крови, как непосредственно в сустав, так и на коллагеновой мембране. Это подтверждают результаты шестилетнего наблюдения за 52 пациентами с остеоартрозом, у которых было достигнуто стабильное улучшение [59].

Сравнительный анализ результатов лечения двух групп пациентов с поражением коленного сустава, в одной из которых использовали стволовые клетки, полученные из костного мозга, на коллагеновой мембране, а в другой – из периферической крови, выявил преимущества последних, хотя через пять лет результаты ухудшились в обеих группах [60].

На ранних стадиях остеоартроза хороший эффект получен от введения стволовых клеток из периферической крови в сочетании с фактором роста и гиалуроновой кислотой. Электронная микроскопия и гистологический анализ показали увеличение в клетках протеогликана и гликозаминогликана, что подтверждало формирование гиалиноподобного хряща [19].

Проведенные исследования доказывают, что свежие клеточные фракции, полученные из костного мозга человека, хотя и различаются по составу, обладают высокой способностью к пролиферации и дифференцировке в направлении хондробластов, остеобластов, адипоцитов.

Экспериментальные исследования на лошадях хотя и не показали значимого клинического улучшения после внутрисуставного введения клеток, полученных из костного мозга, но выявили значительное повышение в тканях уровня агрекана, известного как хрящевой специфичный протеогликановый ядерный белок или протеогликановый хондроитинсульфат-1. Это свидетельствовало об улучшении физико-химических характеристик пораженного внутрисуставного хряща [29,30].

Забор клеток у человека производится, как правило, из крыла подвздошной кости.

Обычные внутрисуставные инъекции культуры клеток у пациентов с остеоартрозом коленного сустава приводят к купированию симптомов заболевания и высокой удовлетворенности пациентов достигнутым результатом. Так, после внутрисуставных инъекций аутологичных мезенхимальных стволовых клеток, полученных из костного мозга, через год отмечалось улучшение клинического состояния у 75% [68]. По данным МРТ также имелась положительная динамика в виде улучшения качества хряща у 11 из 12 пациентов. Аналогичные результаты получены при двухлетнем наблюдении за

пациентами после операции на коленном суставе в сочетании с высокой остеотомией большеберцовой кости [34].

У пациентов моложе 45 лет, имеющих небольшие дефекты хряща, результаты лечения лучше – в 80% случаев отмечено формирование на месте дефекта гиалиноподобной ткани [32].

Введение клеток потенцирует регенерацию суставного хряща в течение шести месяцев, после чего эффект от инъекции снижается и её следует выполнять повторно [35].

Преимущества однократной внутрисуставной инъекции мезенхимальных стволовых клеток, по сравнению с введением гиалуроновой кислоты, были отмечены в исследованиях A. Vega et al. [67]. Авторы особо отмечают простоту манипуляции, её эффективность в плане купирования болевого синдрома, повышения качества жизни пациента, положительной динамики состояния суставного хряща по данным МРТ спустя год после манипуляции.

Описаны попытки подкожного введения мезенхимальных стволовых клеток в область коленного сустава, что в течение 24 недель приводило к увеличению диапазона движений в суставе, уменьшению болевого синдрома, а по данным МРТ – росту хряща и менисков [33].

Наибольшее число клинических наблюдений (339 пациентов, которым вводились стромальные клетки) представлено S.J. Centeno et al [55]. В среднем через 11,3 месяца после инъекции улучшение отметили 53,1% больных остеоартрозом коленного сустава. Побочных эффектов и осложнений не было.

Эффективным оказалось применение стромальных клеток на фибриновом клее [17]. Через год после имплантации имело место полное заполнение дефекта суставного хряща размером около 3 см², что подтверждалось данными магнитно-резонансной томографии.

Коллагеновый гель с этими клетками, взятыми из крыла подвздошной кости, использовали для закрытия дефекта хряща размером 2×3 мм у дзюдоиста. Артроскопия, проведенная через семь месяцев, показала наличие гладкой суставной поверхности, а гистологические исследования – гиалиноподобного хряща [65]. Через год после операции пациент не предъявлял никаких жалоб и продолжал активно заниматься спортом.

Аналогичную технологию введения стромальных клеток с положительными результатами при поражении пателло-фemorального сочленения использовали S. Wakitani et al. [54].

Как основу при имплантации культивированных стромальных клеток костного мозга применяли гидроксиапатит-керамическую матрицу, получив у пациента с тяжелым

поражением хряща после септического артрита коленного сустава хорошие результаты и отмечая явления регенерации хрящевой и костной тканей [64].

Использование коллагеновой мембраны, содержащей эти клетки, при артроскопическом вмешательстве у девяти пациентов с дефектами хряща дало положительный результат. Все пациенты отмечали улучшение состояния, при повторной артроскопии через 12 месяцев макроскопически хрящ восстанавливался почти до нормального. Гистологические исследования показали наличие гиалиноподобного, волокнистого хряща и их сочетания [4,47].

Для закрытия больших дефектов суставного хряща с положительными результатами в двух случаях посттравматического гонартроза использовали клетки на коллагеновом скаффолде [8].

Аналогичная методика была использована при артроскопическом вмешательстве у 30 пациентов с костно-хрящевыми повреждениями коленного сустава. Результаты МРТ и контрольной биопсии подтвердили регенерацию в зоне повреждения [45]. Авторы использовали эту методику и у больных гемофилией при поражении голеностопного сустава, где также, по данным МРТ, имелись признаки регенерации хрящевой и костной ткани. Прогрессирования разрушения сустава не было [66].

Аналогичный метод был применен у 48 пациентов с поражением таранной кости [31]. Гистологические исследования, выполненные через два года, показали разную степень восстановления хряща, но признаков полной регенерации гиалинового хряща не было. Клинические результаты были стабильны спустя четыре года, МРТ показывала наличие гиалиноподобного хряща в большинстве пораженных участков. Интересно, что, по мнению авторов, срок, прошедший между травмой и вмешательством, оказывал негативное влияние на отдаленные клинические результаты, возраст пациента и размер дефекта – на ближайшие исходы, но не отдаленные результаты. Позднее эффективность применения скаффолдов с клетками при патологии таранной кости была подтверждена работами R. Buda et al. [46].

Широкое использование мезенхимальных стволовых клеток, получаемых из **жировой ткани**, обусловлено несколькими причинами:

- Высокое содержание жира в организме человека (у мужчин – 15%, женщин – 27% массы тела).
- Легкость забора жировой ткани для получения клеточной культуры практически без риска для донора. Она может быть взята с передней брюшной стенки, жировой клетчатки коленного сустава (тело Гоффа), бедра.

- Высокий пролиферативный потенциал. Полученные стволовые клетки могут дифференцироваться в адипоциты, остеобласты, миобласты, хондробласты.

Кроме того, показано, что фенотип мезенхимальных стволовых клеток, получаемых из **жировой ткани**, лучше, чем у пассажей, получаемых из костного мозга, они генетически стабильны и пролиферативный потенциал их выше [70,13].

Мезенхимальные стволовые клетки, полученные из жировой ткани, оказывают противовоспалительное действие, угнетая продукцию интерлейкина, фактора некроза опухоли и др. [2]. В сравнении с хондроцитами эти клетки в меньшей степени продуцируют коллаген II и X типа, но больше агрекан, гликозаминогликан и коллаген I типа [23].

Может быть, поэтому хондрогенный потенциал этих клеток ниже, чем у культур, выделенных из костного мозга или синовиальной ткани [24,70].

Экспериментальные исследования на собаках с хроническим остеоартритом крупных суставов подтвердили клиническую эффективность метода: у животных уменьшался болевой синдром, исчезала хромота, возрастал объем движений в пораженном суставе [27,51].

Подобные результаты с подтверждением гистологии, иммунохимического анализа, электронной микроскопии были получены и в экспериментах на других животных – козах, кроликах [61,57,53].

Внутрисуставные инъекции стромальной васкулярной фракции клеток, полученных из жировой ткани, у больных остеоартрозом коленного сустава приводят к купированию болевого синдрома, улучшению функции сустава, что подтверждалось данными специальных шкал и опросников [40,63,]. Авторы отмечают увеличение толщины суставного хряща по данным МРТ.

Особый интерес вызывает тот факт, что более выраженное снижение болевого синдрома и улучшение функции пораженного сустава имели место при низких концентрациях вводимых клеток [1].

Проведенный Р. Xia et al [28] мета-анализ семи рандомизированных контролируемых клинических исследований по использованию стромальной васкулярной фракции клеток у 314 пациентов с остеоартрозом коленного сустава показал эффективность методики.

Аналогичные результаты были получены и при использовании таких клеток у пациентов с асептическим некрозом головки бедренной кости [49].

Повторное артроскопическое исследование сустава показало, что у 50% пациентов, которым выполнялись инъекции мезенхимальных клеток с обогащенной плазмой, улучшалось состояние хряща, в то время как после инъекций только обогащенной плазмы такой эффект наблюдался лишь у 10% больных [22]. Примерно у трети пациентов в месте введения отмечалось наличие припухлости, что связывают с гибелью клеток, у пожилых отмечено развитие тендинита и теносиновита, которые были купированы обычными терапевтическими мерами [56].

О положительном эффекте от введения клеток, который также был подтвержден результатами повторной артроскопии, сообщают и Y.S. Kim et al. [21]. Проведенные гистологические исследования показали формирование гиалиноподобного хряща на суставной поверхности [63].

Внутрисуставное введение стромальной васкулярной фракции, полученной из жировой ткани, в комбинации с артроскопическим лаважем сустава у 30 пожилых пациентов с остеоартрозом коленного сустава было эффективным. Почти у всех отмечалось купирование болевого синдрома, улучшение функции сустава; у 87,5% при повторной артроскопии выявлено улучшение состояния суставного хряща [16].

Положительные клинические и рентгенологические (МРТ) результаты получены даже у пожилых лиц, при наличии большой площади поражения голеностопного сустава, субхондральных кист в таранной кости [26].

В 2015 году были опубликованы результаты мультицентрового исследования, касающиеся 1128 пациентов с поражением 1856 суставов, которым выполнялись инъекции клеток стромальной васкулярной фракции, полученной из жировой ткани [7]. Через год после введения клеток улучшение состояния было зафиксировано в 91% случаев. Результаты были хуже у пациентов с ожирением и выраженными дегенеративно-дистрофическими изменениями в суставе.

Эффект от клеточной терапии определялся количеством вводимых клеток. Концентрация $1,0 \times 10^8$ не вызвала побочных реакций, улучшала функцию сустава, купировала болевой синдром и уменьшала дефект хряща за счет образования гиалиноподобной ткани [36].

Таким образом, анализ данных публикаций последних лет показал растущий интерес исследователей к проблеме практического использования клеточных технологий в лечении больных с поражениями суставов. Однако хочется отметить, что практически нет работ, посвященных применению ММСК при поражениях суставов кисти (болезнях Кинбека, Прейсера, артрозе ПМФ сустава, ризартрозе).

Наиболее широко применяемым способом доставки клеток к очагу поражения являются внутрисуставные инъекции, хотя как поведут себя клетки в полости сустава неизвестно. Открытым остается вопрос о «терапевтической» дозе вводимой культуры. Не изучено

влияние лечебных физических факторов на введенные в полость сустава клетки. Нет убедительных данных о преимуществах того или иного способа доставки.

Однако большинство результатов получено на малом числе клинических наблюдений с низкой доказательной базой. Для подтверждения безопасности этой терапии требуются более длительные сроки наблюдения. Остаются не решенными вопросы, касающиеся оптимального источника стромальных клеток, метода их забора и обработки, дозировки, транспорта клеток к очагу поражения, воздействия на них различных физических факторов. С позиций врача-клинициста актуальна проблема четких показаний к применению клеточной терапии. Надеемся, что ответы на эти вопросы могут быть получены уже в недалеком будущем.

Литература

1. Pers, Y.M., Rackwitz L., Ferreira R. et al. Adipose mesenchymal stromal cell-based therapy for severe osteoarthritis of the knee: a phase i dose-escalation trial. *Stem Cells Transl. Med.* 2016; 5 (7): 847-856.
2. Manferdini, C., Maumus M., Gabusi E. et al. Adipose-derived mesenchymal stem cells exert antiinflammatory effects on chondrocytes and synoviocytes from osteoarthritis patients through prostaglandin E2. *Arthritis Rheum.* 2013; 65 (5): 1271-1281.
3. Vangsness, C.T. Jr., Farr J. 2nd, Boyd J. et al. Adult human mesenchymal stem cells delivered via intra-articular injection to the knee following partial medial meniscectomy: a randomized, double-blind, controlled study. *J. Bone Joint Surg. Am.* 2014; 96 (2): 90-98.
4. Gigante, A., Cecconi S., Calcagno S. et al. Arthroscopic knee cartilage repair with covered microfracture and bone marrow concentrate. *Arthrosc. Tech.* 2012; 1 (2): 175-180.
5. Sekiya, I., Muneta T., Horie M. et al. Arthroscopic transplantation of synovial stem cells improves clinical outcomes in knees with cartilage defects. *Clin. Orthop. Relat. Res.* 2015; 473 (7): 2316-2326.
6. Saw, K.Y., Anz A., Merican S. et al. Articular cartilage regeneration with autologous peripheral blood progenitor cells and hyaluronic acid after arthroscopic subchondral drilling: a report of 5 cases with histology. *Arthroscopy* 2011; 27, (4): 493-506.
7. Michalek, J., Moster R., Lukac L. et al. Autologous adipose tissue-derived stromal vascular fraction cells application in patients with osteoarthritis. *Cell Transplant.* 2015. Jan.20.
8. Kasemkijwattana, C., Hongeng S., Kesprayura S. et al. Autologous bone marrow mesenchymal stem cells implantation for cartilage defects: two cases report. *J. Med. Assoc. Thai.* 2011; 94 (3): 395-400.
9. Bertram, K.L., Krawetz R.J. Osmolarity regulates chondrogenic differentiation potential of synovial fluid derived mesenchymal progenitor cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2012; 422 (3): 455-461.
10. Caplan, A.I. MSCs: the sentinel and safe-guards of injury. *J. Cell Physiol.* 2016; 231 (7): 1413-1416.
11. Centeno C.J., Freeman M.D. Percutaneous injection of autologous, culture-expanded mesenchymal stem cells into carpometacarpal hand joints: a case series with an untreated comparison group. *Wien Med. Wochenschr.* 2014; 164 (5-6): 83-87.

12. Kulyaba, T.A., Kornilov N.N., Deev R.V. et al. The characteristic of mesenchymal stromal cells culture derived from knee fat pad. *Osteoarthritis Cartilage* 2009; 17, Suppl.1: 265.
13. Jang, Y., Koh Y.G., Choi Y.J. et al. Characterization of adipose tissue-derived stromal vascular fraction for clinical application to cartilage regeneration. *In Vitro Cell Dev. Biol. Anim.* 2015; 51 (2): 142-150.
14. Berg, L., Koch T., Heerkens T. et al. Chondrogenic potential of mesenchymal stromal cells derived from equine bone marrow and umbilical cord blood. *Vet. Comp. Orthop. Traumatol.* 2009; 22 (5): 363-370.
15. Kim, Y.S., Park E.H., Kim Y.S., Koh Y.G. Clinical outcomes of mesenchymal stem cell injection with arthroscopic treatment in older patients with osteochondral lesions of the talus. *Am. J. Sports Med.* 2013; 41 (5): 1090-1099.
16. Koh, Y.G., Choi Y.J., Kwon S.K. et al. Clinical results and second-look arthroscopic findings after treatment with adipose-derived stem cells for knee osteoarthritis. *Knee Surg. Sports Traumatol. Arthrosc.* 2015; 23 (5): 1308-1316.
17. Haleem, A.M., Singergy A.A., Sabry D. et al. The clinical use of human culture-expanded autologous bone marrow mesenchymal stem cells transplanted on platelet-rich fibrin glue in the treatment of articular cartilage defects: a pilot study and preliminary results. *Cartilage* 2010; 1 (4): 253-261.
18. Ando, W., Kutcher J.J., Krawetz R. et al. Clonal analysis of synovial fluid stem cells to characterize and identify stable mesenchymal stromal cell/mesenchymal progenitor cell phenotypes in a porcine model: a cell source with enhanced commitment to the chondrogenic lineage. *Cytotherapy* 2014; 16 (6): 776-788.
19. Turajane, T., Chaweewannakorn U., Larbpaiboonpong V. et al. Combination of intra-articular autologous activated peripheral blood stem cells with growth factor addition/preservation and hyaluronic acid in conjunction with arthroscopic microdrilling mesenchymal cell stimulation Improves quality of life and regenerates articular cartilage in early osteoarthritic knee disease. *J. Med. Assoc. Thai.* 2013; 96 (5): 580-588.
20. Danišovič, L., Boháč M, Zamborský R, Oravcová L, Provazníková Z, Csöbönyeiová M, Varga I. Comparative analysis of mesenchymal stromal cells from different tissue sources in respect to articular cartilage tissue engineering. *Gen. Physiol. Biophys.* 2016; 35 (2): 207-214.
21. Kim, Y.S., Kwon O.R., Choi Y.J. et al. Comparative matched-pair analysis of the injection versus implantation of mesenchymal stem cells for knee osteoarthritis. *Am. J. Sports Med.* 2015; 43 (11): 2738-2746.
22. Koh, Y.G., Kwon O.R., Kim Y.S. et al. Comparative outcomes of open-wedge high tibial osteotomy with platelet-rich plasma alone or in combination with mesenchymal stem cell treatment: a prospective study. *Arthroscopy* 2014; 30 (11): 1453-1460.
23. Mardani, M., Hashemibeni B., Ansar M.M. et al. Comparison between chondrogenic markers of differentiated chondrocytes from adipose derived stem cells and articular chondrocytes in vitro. *Iran J. Basic Med. Sci.* 2013; 16 (6): 763-773.
24. Koga, H., Muneta T., Nagase T. et al. Comparison of mesenchymal tissues-derived stem cells for in vivo chondrogenesis: suitable conditions for cell therapy of cartilage defects in rabbit. *Cell Tissue Res.* 2008; 303 (2): 207-215.
25. Alegre-Aguarín, E., Desportes P., Garcia-Alvarez F. et al. Differences in surface marker expression and chondrogenic potential among various tissue-derived mesenchymal cells from elderly patients with osteoarthritis. *Cells Tissues Organs.* 2012; 196 (3): 231-240.
26. Kim, Y.S., Lee H.J., Choi Y.J. et al. Does an injection of a stromal vascular fraction containing adipose-derived mesenchymal stem cells influence the outcomes of marrow stimulation in osteochondral lesions of the talus? A clinical and magnetic resonance imaging study. *Am. J. Sports Med.* 2014; 42 (10): 2424-2434.

27. Black, L.L., Gaynor J., Gahring D. et al. Effect of intraarticular injection of autologous adipose-derived mesenchymal stem and regenerative cells on clinical signs of chronic osteoarthritis of the elbow joint in dogs. *Vet. Ther.* 2008; 9 (3): 192-200.
28. Xia, P., Wang X., Lin Q., Li X. Efficacy of mesenchymal stem cells injection for the management of knee osteoarthritis: a systematic review and meta-analysis. *Int.Orthop.* 2015; 39 (12): 2363-2372.
29. Frisbie, D.D., Kisiday J.D., Kawcak C.E. et al. Evaluation of adipose-derived stromal vascular fraction or bone marrow-derived mesenchymal stem cells for treatment of osteoarthritis. *J. Orthop. Res.* 2009; 27 (12): 1675-1680.
30. McIlwraith, C.W., Frisbie D.D., Rodkey W.G. et al. Evaluation of intra-articular mesenchymal stem cells to augment healing of microfractured chondral defects. *Arthroscopy* 2011; 27 (11): 1552-1561.
31. Giannini S., Buda R., Battaglia M. One-step repair in talar osteochondral lesions: 4-year clinical results and t2-mapping capability in outcome prediction. *Am. J. Sports Med.* 2013; 467 (12): 511-508.
32. Gobbi A., Karnatzikos G., Sankineani S.R. One-step surgery with multipotent stem cells for the treatment of large full-thickness chondral defects of the knee. *Am. J. Sports Med.* 2014; 42 (3): 648-657.
33. Centeno, C.J., Busse D., Kisiday J. et al. Increased knee cartilage volume in degenerative joint disease using percutaneously implanted, autologous mesenchymal stem cells. *Pain Physician* 2008; 11 (3): 343-353.
34. Wong, K.L., Lee K.B., Tai B.C. et al. Injectable cultured bone marrow-derived mesenchymal stem cells in varus knees with cartilage defects undergoing high tibial osteotomy: a prospective, randomized controlled clinical trial with 2 years' follow-up. *Arthroscopy* 2013; 29 (12): 2020-2028.
35. Emadedin, M., Aghdami N., Taghiyar L. et al. Intra-articular injection of autologous mesenchymal stem cells in six patients with knee osteoarthritis. *Arch. Iran Med.* 2012; 15 (7): 422-428.
36. Jo, C.H., Lee Y.G., Shin W.H. et al. Intra-articular injection of mesenchymal stem cells for the treatment of osteoarthritis of the knee: a proof-of-concept clinical trial. *Stem Cells* 2014; 32 (5):1254-1266.
37. Lee, W.J., Park J.S., Jang S.J. et al. Isolation and cellular phenotyping of mesenchymal stem cells derived from synovial fluid and bone marrow of minipigs. *J. Vis. Exp.* 2016; 113: e54077. doi:10.3791/54077.
38. Kim Y.S., Choi Y.J., Koh Y.G. Mesenchymal stem cell implantation in knee osteoarthritis: an assessment of the factors influencing clinical outcomes. *Am. J.Sports Med.* 2015; 43 (9): 2293-2301.
39. Kim, Y.S., Choi Y.J., Suh D.S. et al. Mesenchymal stem cell implantation in osteoarthritic knees: is fibrin glue effective as a scaffold? *Am. J. Sports Med.* 2014; 43 (1): 176-185.
40. Koh, Y.G., Jo S.B., Kwon S.K. et al. Mesenchymal stem cell injections improve symptoms of knee osteoarthritis. *Arthroscopy* 2013; 29 (4): 748-755.
41. Davatchi, F., Abdollahi B.S., Mohyeddin M. et al. Mesenchymal stem cell therapy for knee osteoarthritis. Preliminary report of four patients. *Int. J.Rheum. Dis.* 2011; 14 (2): 211-215.
42. Filardo, G., Madry H., Jelic M. et al. Mesenchymal stem cells for the treatment of cartilage lesions: from preclinical findings to clinical application in orthopaedics. *Knee Surg. Sports Traumatol. Arthrosc.* 2013; 21 (8): 1717-1729.
43. Morito, T., Muneta T., Hara K. Synovial fluid-derived mesenchymal stem cells increase after intra-articular ligament injury in humans. *Rheumatology (Oxford).* 2008; 47 (8): 1137-1143.
44. Kon, E., Filardo G., Roffi A. et al. New trends for knee cartilage regeneration: from cell-free scaffolds to mesenchymal stem cells. *Curr. Rev. Musculoskelet. Med.* 2012; 5 (3): 236-243.

45. Buda, R., Vannini F., Cavallo M. et al. One-step arthroscopic technique for the treatment of osteochondral lesions of the knee with bone-marrow-derived cells: three years results. *Musculoskelet. Surg.* 2013; 97 (2): 145-151.
46. Buda, R., Castagnini F., Cavallo M. et al. «One-step» bone marrow-derived cells transplantation and joint debridement for osteochondral lesions of the talus in ankle osteoarthritis: clinical and radiological outcomes at 36 months. *Arch. Orthop. Trauma Surg.* 2016; 136 (1): 107-116.
47. Enea, D., Cecconi S., Calcagno S. et al. One-step cartilage repair in the knee: collagen-covered microfracture and autologous bone marrow concentrate. A pilot study. *Knee* 2015; 22 (1): 30-35.
48. Lazić, E., Jelušić M., Grčević D. et al. Osteoblastogenesis from synovial fluid-derived cells is related to the type and severity of juvenile idiopathic arthritis. *Arthritis Res. Ther.* 2012; 14 (3): R.139.
49. Pak J. Autologous adipose tissue-derived stem cells induce persistent bone-like tissue in osteonecrotic femoral heads. *Pain Physician* 2012; 15 (1): 75-85.
50. Koyama, N., Okubo Y., Nakao K. et al. Pluripotency of mesenchymal cells derived from synovial fluid in patients with temporomandibular joint disorder. *Life Sci.* 2011; 89 (19-20): 741-747.
51. Guercio, A., Di Marco P., Casella S. et al. Production of canine mesenchymal stem cells from adipose tissue and their application in dogs with chronic osteoarthritis of the humeroradial joints. *Cell Biol. Int.* 2012; 36 (2): 189-194.
52. Puetzer, J.L., Petite J.N., Lobo E.G. Comparative review of growth factors for induction of three-dimensional in vitro chondrogenesis in human mesenchymal stem cells isolated from bone marrow and adipose tissue. *Tissue Eng. Part B Rev.* 2010; 16 (4): 435-444.
53. Wang, Z.J., An R.Z., Zhao J.Y. et al. Repair of articular cartilage defects by tissue-engineered cartilage constructed with adipose-derived stem cells and acellular cartilaginous matrix in rabbits. *Genet. Mol. Res.* 2014; 13 (2): 4599-4606.
54. Wakitani, S., Nawata M., Tensho K. et al. Repair of articular cartilage defects in the patello-femoral joint with autologous bone marrow mesenchymal cell transplantation: three case reports involving nine defects in five knees. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* 2007; 1 (1): 74-79.
55. Centeno, C.J., Schultz J.R., Cheever M. et al. Safety and complications reporting update on the re-implantation of culture-expanded mesenchymal stem cells using autologous platelet lysate technique. *Curr. Stem Cell Res. Ther.* 2011; 6 (4): 368-378.
56. Pak, J., Chang J.J., Lee J.H., Lee S.H. Safety reporting on implantation of autologous adipose tissue-derived stem cells with platelet-rich plasma into human articular joints. *BMC Musculoskelet. Disord.* 2013; 1 (14): 337.
57. Toghraie, F.S., Razmkhah M., Gholipour M.A. et al. Scaffold-free adipose-derived stem cells (ASCs) improve experimentally induced osteoarthritis in rabbits. *Arch. Iran Med.* 2012; 15 (8): 495-499.
58. Koh, Y.G., Choi Y.J., Kwon O.R. et al. Second-look arthroscopic evaluation of cartilage lesions after mesenchymal stem cell implantation in osteoarthritic knees. *Am. J. Sports Med.* 2014; 42 (7): 1628-1637.
59. Skowroński J., Rutka M. Osteochondral lesions of the knee reconstructed with mesenchymal stem cells – results. *Ortop. Traumatol. Rehabil.* 2013; 15 (3): 195-204.
60. Skowronski J., Skowronski R., Rutka M. Large cartilage lesions of the knee treated with bone marrow concentrate and collagen membrane – results. *Ortop. Traumatol. Rehabil.* 2013; 15 (1): 69-76.
61. Murphy, J.M., Fink D.J., Hunziker E.B., Barry F.P. Stem cell therapy in a caprine model of osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* 2004; 48 (12): 3462-3474.

62. Labusca, L.S., Botez P., Zugun Eloae F., Mashayekhi K. Stem cells derived from osteoarthritic knee mesenchymal tissues: a pilot study. *Eur. J. Orthop. Surg. Traumatol.* 2013; 23 (2): 169-176.
63. Bui, K.H.T., Duong T.D., Nguyen N.T. et al. Symptomatic knee osteoarthritis treatment using autologous adipose derived stem cells and platelet-rich plasma: a clinical study. *Biomed.Res.Ther.* 2014; 1 (1): 2-8.
64. Adachi, N., Ochi M., Deie M., Ito Y. Transplant of mesenchymal stem cells and hydroxyapatite ceramics to treat severe osteochondral damage after septic arthritis of the knee. *J.Rheumatol.* 2005; 32 (8): 1615-1618.
65. Kuroda, R., Ishida K., Matsumoto T. et al. Treatment of a full-thickness articular cartilage defect in the femoral condyle of an athlete with autologous bone-marrow stromal cells. *Osteoarthritis Cartilage.* 2007; 15 (5): 226-231.
66. Buda, R., Cavallo M., Castagnini F. et al. Treatment of hemophilic ankle arthropathy with one-step arthroscopic bone marrow-derived cells transplantation. *Cartilage.* 2015; 6 (3): 150-155.
67. Vega, A., Martin-Ferrero, M.A., Del Canto F. et al. Treatment of knee osteoarthritis with allogeneic bone marrow mesenchymal stem cells: a randomized controlled trial. *Transplantation* 2015; 99 (8): 1681-1690.
68. Orozco, L., Munar A., Soler R. et al. Treatment of knee osteoarthritis with autologous mesenchymal stem cells: a pilot study. *Transplantation* 2013; 95 (12): 1535-1541.
69. Varma, H.S., Dadarya B., Vidyarthi A. The new avenues in the management of osteo-arthritis of knee-stem cells. *J. Indian Med. Assoc.* 2010; 108 (9): 583-585.
70. Webb, T.L., Quimby J.M., Dow S.W. In vitro comparison of feline bone marrow-derived and adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. *J. Feline Med. Surg.* 2012; 14 (2): 165-168.

Experimental and clinical use of multipotent mesenchymal stem cells to stimulate articular cartilage regeneration

Novikov A. V.

Doctor of Medicine, Leading Researcher, Nizhny Novgorod Research Institute of Traumatology and Orthopedics of Public Health Ministry of Russian Federation. E-mail: novik2.55@inbox.ru

Abstract

The article analyzes the data published in recent years concerning application of cell technologies in treatment of patients with arthronosos. Author examines the sources of multipotent cells, delivery methods and main pathological conditions they were used under. The conclusion is drawn on the absence of convincing data on advantages of a particular method of cell delivery to the affected area. To confirm the safety of this therapy longer observation periods are required. Issues concerning the best source of stromal cells, technique of their harvesting and processing, dosage, cell transport to the affected area, influence of various physical factors remain unsolved. The problem of explicit indications for the cell therapy use continues to be relevant.

Key words: multipotent mesenchymal stem cells (MMSC), cell technology, joint, articular cartilage

References

1. Pers, Yves-Marie, Lars Rackwitz, Rosanna Ferreira, Oliver Pullig, Christophe Delfour, Frank Barry, Luc Sensebe, Louis Casteilla, Sandrine Fleury, Philippe Bourin, Danièle Noël, François Canovas, Catherine Cyteval, Gina Lisignoli, Joachim Schrauth, Daniel Haddad, Sophie Domergue, Ulrich Noeth, and Christian Jorgensen. "Adipose

Mesenchymal Stromal Cell-Based Therapy for Severe Osteoarthritis of the Knee: A Phase I Dose-Escalation Trial." *STEM CELLS Translational Medicine* 5, no. 7 (2016): 847-56. doi:10.5966/sctm.2015-0245.

2. Manferdini, Cristina, Marie Maumus, Elena Gabusi, Anna Piacentini, Giuseppe Filardo, Julie-Anne Peyrafitte, Christian Jorgensen, Philippe Bourin, Sandrine Fleury-Cappellesso, Andrea Facchini, Danièle Noël, and Gina Lisignoli. "Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells Exert Antiinflammatory Effects on Chondrocytes and Synoviocytes From Osteoarthritis Patients Through Prostaglandin E2." *Arthritis & Rheumatism* 65, no. 5 (2013): 1271-281. doi:10.1002/art.37908.
3. Vangsness, C. Thomas, Jack Farr, Joel Boyd, David T. Dellaero, C. Randal Mills, and Michelle Leroux-Williams. "Adult Human Mesenchymal Stem Cells Delivered via Intra-Articular Injection to the Knee Following Partial Medial Meniscectomy." *The Journal of Bone and Joint Surgery-American Volume* 96, no. 2 (2014): 90-98. doi:10.2106/jbjs.m.00058.
4. Gigante, Antonio, Stefano Cecconi, Silvano Calcagno, Alberto Busilacchi, and Davide Enea. "Arthroscopic Knee Cartilage Repair With Covered Microfracture and Bone Marrow Concentrate." *Arthroscopy Techniques* 1, no. 2 (2012). doi:10.1016/j.eats.2012.07.001.
5. Sekiya, Ichiro, Takeshi Muneta, Masafumi Horie, and Hideyuki Koga. "Arthroscopic Transplantation of Synovial Stem Cells Improves Clinical Outcomes in Knees With Cartilage Defects." *Clinical Orthopaedics and Related Research* 473, no. 7 (2015): 2316-326. doi:10.1007/s11999-015-4324-8.
6. Saw, Khay-Yong, Adam Anz, Shahrin Merican, Yong-Guan Tay, Kunasegaran Ragavanaidu, Caroline S.y. Jee, and David A. McGuire. "Articular Cartilage Regeneration With Autologous Peripheral Blood Progenitor Cells and Hyaluronic Acid After Arthroscopic Subchondral Drilling: A Report of 5 Cases With Histology." *Arthroscopy: The Journal of Arthroscopic & Related Surgery* 27, no. 4 (2011): 493-506. doi:10.1016/j.arthro.2010.11.054.
7. Michalek, J., R. Moster, and L. Lukac. "Autologous adipose tissue-derived stromal vascular fraction cells application in patients with osteoarthritis." *Cell Transplantation*, 2015. doi:10.3727/096368915x686760.
8. Kasemkijwattana, C., S. Hongeng, and S. Kesprayura. "Autologous bone marrow mesenchymal stem cells implantation for cartilage defects: two cases report." *J. Med. Assoc. Thai.* 94, no. 3 (2011): 395-400.
9. Bertram, Karri L., and Roman J. Krawetz. "Osmolarity regulates chondrogenic differentiation potential of synovial fluid derived mesenchymal progenitor cells." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 422, no. 3 (2012): 455-61. doi:10.1016/j.bbrc.2012.05.015.
10. Caplan, Arnold I. "MSCs: The Sentinel and Safe-Guards of Injury." *Journal of Cellular Physiology* 231, no. 7 (2015): 1413-416. doi:10.1002/jcp.25255.
11. Centeno, Christopher J., and Michael D. Freeman. "Percutaneous injection of autologous, culture-expanded mesenchymal stem cells into carpometacarpal hand joints: a case series with an untreated comparison group." *Wiener Medizinische Wochenschrift* 164, no. 5-6 (2013): 83-87. doi:10.1007/s10354-013-0222-4.
12. Kulyaba, T. A., N. N. Kornilov, R. V. Deev, V. S. Gornostaev, A. I. Bryanskaya, I. J. Borzo, N. V. Cupkina, and G. P. Pinaev. "The Characteristic Of Mesenchymal Stromal Cells Culture Derived From Knee Fat Pad." *Osteoarthritis and Cartilage* 17 (2009). doi:10.1016/s1063-4584(09)60514-8.
13. Jang, Yeonsue, Yong Gon Koh, Yun-Jin Choi, Sung-Hwan Kim, Dong Suk Yoon, Moses Lee, and Jin Woo Lee. "Characterization of adipose tissue-derived stromal vascular fraction for clinical application to cartilage regeneration." *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Animal* 51, no. 2 (2014): 142-50. doi:10.1007/s11626-014-9814-6.
14. Berg, Lise, Thomas Koch, Tammy Heerkens, Kirill Bessonov, Preben Thomsen, and Dean Betts. "Chondrogenic potential of mesenchymal stromal cells derived from equine bone marrow and umbilical cord blood." *Veterinary and Comparative Orthopaedics and Traumatology*, 2009. doi:10.3415/vcot-08-10-0107.

15. Kim, Yong Sang, Eui Hyun Park, Yong Chan Kim, and Yong Gon Koh. "Clinical Outcomes of Mesenchymal Stem Cell Injection With Arthroscopic Treatment in Older Patients With Osteochondral Lesions of the Talus." *The American Journal of Sports Medicine* 41, no. 5 (2013): 1090-099. doi:10.1177/0363546513479018.
16. Koh, Yong-Gon, Yun-Jin Choi, Sae-Kwang Kwon, Yong-Sang Kim, and Jee-Eun Yeo. "Clinical results and second-look arthroscopic findings after treatment with adipose-derived stem cells for knee osteoarthritis." *Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy* 23, no. 5 (2013): 1308-316. doi:10.1007/s00167-013-2807-2.
17. Haleem, Amgad M., Abdel Aziz El Singergy, Dina Sabry, Hazem M. Atta, Laila A. Rashed, Constance R. Chu, Mohammed T. El Shewy, Akram Azzam, and Mohammed T. Abdel Aziz. "The Clinical Use of Human Culture–Expanded Autologous Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Transplanted on Platelet-Rich Fibrin Glue in the Treatment of Articular Cartilage Defects." *Cartilage* 1, no. 4 (2010): 253-61. doi:10.1177/1947603510366027.
18. Ando, Wataru, Josh J. Kutcher, Roman Krawetz, Arindom Sen, Norimasa Nakamura, Cyril B. Frank, and David A. Hart. "Clonal analysis of synovial fluid stem cells to characterize and identify stable mesenchymal stromal cell/mesenchymal progenitor cell phenotypes in a porcine model: a cell source with enhanced commitment to the chondrogenic lineage." *Cytotherapy* 16, no. 6 (2014): 776-88. doi:10.1016/j.jcyt.2013.12.003.
19. Turajane, T., U. Chaweewannakorn, J. Aojanepong, W. Fongsarun, and K. Papadopoulos. "Avoidance of total knee arthroplasty in early osteoarthritis of the knee with intra-articular implantation of autologous activated peripheral blood stem cells versus hyaluronic acid: A randomized controlled trial with differential effects of growth factor addition." *Cytotherapy* 19, no. 5 (2017). doi:10.1016/j.jcyt.2017.02.324.
20. Danišovič, Ľuboš, Martin Boháč, Radoslav Zamborský, Lenka Oravcová, Zuzana Provazníková, Mária Csöbönyeiová, and Ivan Varga. "Comparative analysis of mesenchymal stromal cells from different tissue sources in respect to articular cartilage tissue engineering." *General physiology and biophysics* 35, no. 02 (2016): 207-14. doi:10.4149/gpb_2015044.
21. Kim, Yong Sang, Oh Ryong Kwon, Yun Jin Choi, Dong Suk Suh, Dong Beom Heo, and Yong Gon Koh. "Comparative Matched-Pair Analysis of the Injection Versus Implantation of Mesenchymal Stem Cells for Knee Osteoarthritis." *The American Journal of Sports Medicine* 43, no. 11 (2015): 2738-746. doi:10.1177/0363546515599632.
22. Koh, Yong-Gon, Oh-Ryong Kwon, Yong-Sang Kim, and Yun-Jin Choi. "Comparative Outcomes of Open-Wedge High Tibial Osteotomy With Platelet-Rich Plasma Alone or in Combination With Mesenchymal Stem Cell Treatment: A Prospective Study." *Arthroscopy: The Journal of Arthroscopic & Related Surgery* 30, no. 11 (2014): 1453-460. doi:10.1016/j.arthro.2014.05.036.
23. Mardani, M., B. Hashemibeni, and M. M. Ansar. "Comparison between chondrogenic markers of differentiated chondrocytes from adipose derived stem cells and articular chondrocytes in vitro." *Iran J. Basic Med. Sci.* 16, no. 6 (2013): 763-73.
24. Koga, Hideyuki, Takeshi Muneta, Tsuyoshi Nagase, Akimoto Nimura, Young-Jin Ju, Tomoyuki Mochizuki, and Ichiro Sekiya. "Comparison of mesenchymal tissues-derived stem cells for in vivo chondrogenesis: suitable conditions for cell therapy of cartilage defects in rabbit." *Cell and Tissue Research* 333, no. 2 (2008): 207-15. doi:10.1007/s00441-008-0633-5.
25. Alegre-Aguarón, Elena, Paula Desportes, Felícito García-Álvarez, Tomás Castiella, Luis Larrad, and María José Martínez-Lorenzo. "Differences in Surface Marker Expression and Chondrogenic Potential among Various Tissue-Derived Mesenchymal Cells from Elderly Patients with Osteoarthritis." *Cells Tissues Organs*, 2012. doi:10.1159/000334400.
26. Kim, Yong Sang, Ho Jin Lee, Yun Jin Choi, Yong Il Kim, and Yong Gon Koh. "Does an Injection of a Stromal Vascular Fraction Containing Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells Influence the Outcomes of Marrow Stimulation in Osteochondral Lesions of the Talus?" *The American Journal of Sports Medicine* 42, no. 10 (2014): 2424-434. doi:10.1177/0363546514541778.

27. Black, L. L., J. Gaynor, and D. Gahrng. "Effect of intraarticular injection of autologous adipose-derived mesenchymal stem and regenerative cells on clinical signs of chronic osteoarthritis of the elbow joint in dogs." *Vet. Ther.* 9, no. 3 (2008): 192-200.
28. Xia, Peng, Xiaoju Wang, Qiang Lin, and Xueping Li. "Efficacy of mesenchymal stem cells injection for the management of knee osteoarthritis: a systematic review and meta-analysis." *International Orthopaedics* 39, no. 12 (2015): 2363-372. doi:10.1007/s00264-015-2785-8.
29. Frisbie, David D., John D. Kisiday, Chris E. Kawcak, Natasha M. Werpy, and C. Wayne McIlwraith. "Evaluation of adipose-derived stromal vascular fraction or bone marrow-derived mesenchymal stem cells for treatment of osteoarthritis." *Journal of Orthopaedic Research* 27, no. 12 (2009): 1675-680. doi:10.1002/jor.20933.
30. McIlwraith, C. Wayne, David D. Frisbie, William G. Rodkey, John D. Kisiday, Natasha M. Werpy, Christopher E. Kawcak, and J. Richard Steadman. "Evaluation of Intra-Articular Mesenchymal Stem Cells to Augment Healing of Microfractured Chondral Defects." *Arthroscopy: The Journal of Arthroscopic & Related Surgery* 27, no. 11 (2011): 1552-561. doi:10.1016/j.arthro.2011.06.002.
31. Giannini, Sandro, Roberto Buda, Milva Battaglia, Marco Cavallo, Alberto Ruffilli, Laura Ramponi, Gherardo Pagliuzzi, and Francesca Vannini. "One-Step Repair in Talar Osteochondral Lesions." *The American Journal of Sports Medicine* 41, no. 3 (2012): 511-18. doi:10.1177/0363546512467622.
32. Gobbi, Alberto, Celeste Scotti, Georgios Karnatzikos, Abhishek Mudhigere, Marc Castro, and Giuseppe M. Peretti. "One-step surgery with multipotent stem cells and Hyaluronan-based scaffold for the treatment of full-thickness chondral defects of the knee in patients older than 45 years." *Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy* 25, no. 8 (2016): 2494-501. doi:10.1007/s00167-016-3984-6.
33. Centeno, C. J., D. Busse, and J. Kisiday. "Increased knee cartilage volume in degenerative joint disease using percutaneously implanted, autologous mesenchymal stem cells." *Pain Physician* 11, no. 3 (2008): 343-53.
34. Wong, Keng Lin, Kevin Boon Leng Lee, Bee Choo Tai, Ping Law, Eng Hin Lee, and James H.p. Hui. "Injectable Cultured Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells in Varus Knees With Cartilage Defects Undergoing High Tibial Osteotomy: A Prospective, Randomized Controlled Clinical Trial With 2 Years Follow-up." *Arthroscopy: The Journal of Arthroscopic & Related Surgery* 29, no. 12 (2013): 2020-028. doi:10.1016/j.arthro.2013.09.074.
35. Emadedin, M., N. Aghdami, and L. Taghiyar. "Intra-articular injection of autologous mesenchymal stem cells in six patients with knee osteoarthritis." *Arch. Iran Med.* 15, no. 7 (2012): 422-28.
36. Jo, Chris Hyunchul, Young Gil Lee, Won Hyoung Shin, Hyang Kim, Jee Won Chai, Eui Cheol Jeong, Ji Eun Kim, Hackjoon Shim, Ji Sun Shin, Il Seob Shin, Jeong Chan Ra, Sohee Oh, and Kang Sup Yoon. "Intra-Articular Injection of Mesenchymal Stem Cells for the Treatment of Osteoarthritis of the Knee: A Proof-of-Concept Clinical Trial." *Stem Cells* 32, no. 5 (2014): 1254-266. doi:10.1002/stem.1634.
37. Lee, Won-Jae, Ji-Sung Park, Si-Jung Jang, Seung-Chan Lee, Hyeonjeong Lee, Jae-Hoon Lee, Gyu-Jin Rho, and Sung-Lim Lee. "Isolation and Cellular Phenotyping of Mesenchymal Stem Cells Derived from Synovial Fluid and Bone Marrow of Minipigs." *Journal of Visualized Experiments*, no. 113 (2016). doi:10.3791/54077.
38. Kim, Yong Sang, Yun Jin Choi, and Yong Gon Koh. "Mesenchymal Stem Cell Implantation in Knee Osteoarthritis." *The American Journal of Sports Medicine* 43, no. 9 (2015): 2293-301. doi:10.1177/0363546515588317.
39. Kim, Yong Sang, Yun Jin Choi, Dong Suk Suh, Dong Beom Heo, Yong Il Kim, Jae-Sung Ryu, and Yong Gon Koh. "Mesenchymal Stem Cell Implantation in Osteoarthritic Knees." *The American Journal of Sports Medicine* 43, no. 1 (2014): 176-85. doi:10.1177/0363546514554190.

40. Koh, Yong-Gon, Seung-Bae Jo, Oh-Ryong Kwon, Dong-Suk Suh, Seung-Woo Lee, Sung-Ho Park, and Yun-Jin Choi. "Mesenchymal Stem Cell Injections Improve Symptoms of Knee Osteoarthritis." *Arthroscopy: The Journal of Arthroscopic & Related Surgery* 29, no. 4 (2013): 748-55. doi:10.1016/j.arthro.2012.11.017.
41. Davatchi, Fereydoun, Bahar Sadeghi Abdollahi, Mandana Mohyeddin, Farhad Shahram, and Behrooz Nikbin. "Mesenchymal stem cell therapy for knee osteoarthritis. Preliminary report of four patients." *International Journal of Rheumatic Diseases* 14, no. 2 (2011): 211-15. doi:10.1111/j.1756-185x.2011.01599.x.
42. Filardo, Giuseppe, Henning Madry, Mislav Jelic, Alice Roffi, Magali Cucchiari, and Elizaveta Kon. "Mesenchymal stem cells for the treatment of cartilage lesions: from preclinical findings to clinical application in orthopaedics." *Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy* 21, no. 8 (2013): 1717-729. doi:10.1007/s00167-012-2329-3.
43. Morito, T., T. Muneta, K. Hara, Y.-J. Ju, T. Mochizuki, H. Makino, A. Umezawa, and I. Sekiya. "Synovial fluid-derived mesenchymal stem cells increase after intra-articular ligament injury in humans." *Rheumatology* 47, no. 8 (2008): 1137-143. doi:10.1093/rheumatology/ken114.
44. Kon, Elizaveta, Giuseppe Filardo, Alice Roffi, Luca Andriolo, and Maurilio Marcacci. "New trends for knee cartilage regeneration: from cell-free scaffolds to mesenchymal stem cells." *Current Reviews in Musculoskeletal Medicine* 5, no. 3 (2012): 236-43. doi:10.1007/s12178-012-9135-x.
45. Buda, Roberto, Francesca Vannini, Marco Cavallo, Matteo Baldassarri, Deianira Luciani, Antonio Mazzotti, Camilla Pungetti, Alessandra Olivieri, and Sandro Giannini. "One-step arthroscopic technique for the treatment of osteochondral lesions of the knee with bone-marrow-derived cells: three years results." *Musculoskeletal Surgery* 97, no. 2 (2013): 145-51. doi:10.1007/s12306-013-0242-7.
46. Buda, Roberto, Francesco Castagnini, Marco Cavallo, Laura Ramponi, Francesca Vannini, and Sandro Giannini. "One-step bone marrow-derived cells transplantation and joint debridement for osteochondral lesions of the talus in ankle osteoarthritis: clinical and radiological outcomes at 36 months." *Archives of Orthopaedic and Trauma Surgery* 136, no. 1 (2015): 107-16. doi:10.1007/s00402-015-2344-1.
47. Enea, D., S. Cecconi, S. Calcagno, A. Busilacchi, S. Manzotti, and A. Gigante. "One-step cartilage repair in the knee: Collagen-covered microfracture and autologous bone marrow concentrate. A pilot study." *The Knee* 22, no. 1 (2015): 30-35. doi:10.1016/j.knee.2014.10.003.
48. Lazić, Elvira, Marija Jelušić, Danka Grčević, Ana Marušić, and Nataša Kovačić. "Osteoblastogenesis from synovial fluid-derived cells is related to the type and severity of juvenile idiopathic arthritis." *Arthritis Research & Therapy* 14, no. 3 (2012). doi:10.1186/ar3872.
49. Pak, J. "Autologous adipose tissue-derived stem cells induce persistent bone-like tissue in osteonecrotic femoral heads." *Pain Physician* 15, no. 1 (2012): 75-85.
50. Koyama, Noriaki, Yasunori Okubo, Kazumasa Nakao, Kenji Osawa, Kazuma Fujimura, and Kazuhisa Bessho. "Pluripotency of mesenchymal cells derived from synovial fluid in patients with temporomandibular joint disorder." *Life Sciences* 89, no. 19-20 (2011): 741-47. doi:10.1016/j.lfs.2011.09.005.
51. Guercio, Annalisa, Patrizia Di Marco, Stefania Casella, Vincenza Cannella, Laura Russotto, Giuseppa Purpari, Santina Di Bella, and Giuseppe Piccione. "Production of canine mesenchymal stem cells from adipose tissue and their application in dogs with chronic osteoarthritis of the humeroradial joints." *Cell Biology International* 36, no. 2 (2012): 189-94. doi:10.1042/cbi20110304.
52. Puetzer, Jennifer L., John N. Petitte, and Elizabeth G. Lobo. "Comparative Review of Growth Factors for Induction of Three-Dimensional In Vitro Chondrogenesis in Human Mesenchymal Stem Cells Isolated from Bone Marrow and Adipose Tissue." *Tissue Engineering Part B: Reviews* 16, no. 4 (2010): 435-44. doi:10.1089/ten.teb.2009.0705.

53. Wang, Z.J., R. Z. An, J. Y. Zhao, Q. Zhang, J. Yang, J. B. Wang, G. Y. Wen, X. H. Yuan, X. W. Qi, S. J. Li, and X. C. Ye. "Repair of articular cartilage defects by tissue-engineered cartilage constructed with adipose-derived stem cells and acellular cartilaginous matrix in rabbits." *Genetics and Molecular Research* 13, no. 2 (2014): 4599-606. doi:10.4238/2014.june.18.2.
54. Wakitani, Shigeyuki, Masashi Nawata, Keiji Tensho, Takahiro Okabe, Hiroko Machida, and Hajime Ohgushi. "Repair of articular cartilage defects in the patello-femoral joint with autologous bone marrow mesenchymal cell transplantation: three case reports involving nine defects in five knees." *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine* 1, no. 1 (2007): 74-79. doi:10.1002/term.8.
55. Centeno, Christopher J., John R. Schultz, Michelle Cheever, Michael Freeman, Stephen Faulkner, Brent Robinson, and Ronald Hanson. "Safety and Complications Reporting Update on the Re-Implantation of Culture-Expanded Mesenchymal Stem Cells Using Autologous Platelet Lysate Technique." *Current Stem Cell Research & Therapy* 6, no. 4 (2011): 368-78. doi:10.2174/157488811797904371.
56. Pak, Jaewoo, Jae-Jin Chang, Jung Hun Lee, and Sang Hee Lee. "Safety reporting on implantation of autologous adipose tissue-derived stem cells with platelet-rich plasma into human articular joints." *BMC Musculoskeletal Disorders* 14, no. 1 (2013). doi:10.1186/1471-2474-14-337.
57. Toghraie, F. S., M. Razmkhah, and M. A. Gholipour. "Scaffold-free adipose-derived stem cells (ASCs) improve experimentally induced osteoarthritis in rabbits." *Arch. Iran Med.* 15, no. 8 (2012): 495-99.
58. Koh, Yong Gon, Yun Jin Choi, Oh Ryong Kwon, and Yong Sang Kim. "Second-Look Arthroscopic Evaluation of Cartilage Lesions After Mesenchymal Stem Cell Implantation in Osteoarthritic Knees." *The American Journal of Sports Medicine* 42, no. 7 (2014): 1628-637. doi:10.1177/0363546514529641.
59. Skowroński, Jan, and Marcin Rutka. "Osteochondral lesions of the knee reconstructed with mesenchymal stem cells – results." *Ortopedia Traumatologia Rehabilitacja* 15, no. 3 (2013): 1. doi:10.5604/15093492.1058409.
60. Skowronski, J., R. Skowronski, and M. Rutka. "Large cartilage lesions of the knee treated with bone marrow concentrate and collagen membrane – results." *Ortopedia Traumatologia Rehabilitacja* 15, no. 1 (2013): 69-76.
61. Murphy, J. Mary, David J. Fink, Ernst B. Hunziker, and Frank P. Barry. "Stem cell therapy in a caprine model of osteoarthritis." *Arthritis & Rheumatism* 48, no. 12 (2003): 3464-474. doi:10.1002/art.11365.
62. Labusca, Luminita Simion, Paul Botez, Florin Zugun Eloae, and Kaveh Mashayekhi. "Stem cells derived from osteoarthritic knee mesenchymal tissues: a pilot study." *European Journal of Orthopaedic Surgery & Traumatology* 23, no. 2 (2012): 169-76. doi:10.1007/s00590-012-0949-4.
63. Pham, Phuc Van, Khanh Hong-Thien Bui, Triet Dinh Duong, Nhan Thanh Nguyen, Thanh Duc Nguyen, Vien Tuong Le, Viet Thanh Mai, Nhan Lu-Chinh Phan, Dung Minh Le, and Ngoc Kim Ngoc. "Symptomatic knee osteoarthritis treatment using autologous adipose derived stem cells and platelet-rich plasma: a clinical study." *Biomedical Research and Therapy* 1, no. 1 (2014). doi:10.7603/s40730-014-0002-9.
64. Adachi, N., Ochi M., Deie M., Ito Y. Transplant of mesenchymal stem cells and hydroxyapatite ceramics to treat severe Adachi, N., M. Ochi, M. Deie and Y. Ito. "Transplant of mesenchymal stem cells and hydroxyapatite ceramics to treat severe osteochondral damage after septic arthritis of the knee." *J. Rheumatol.* 32, no. 8 (2005): 1615-618.
65. Kuroda, R., K. Ishida, T. Matsumoto, T. Akisue, H. Fujioka, K. Mizuno, H. Ohgushi, S. Wakitani, and M. Kurosaka. "Treatment of a full-thickness articular cartilage defect in the femoral condyle of an athlete with autologous bone-marrow stromal cells." *Osteoarthritis and Cartilage* 15, no. 2 (2007): 226-31. doi:10.1016/j.joca.2006.08.008.

66. Buda, Roberto, Marco Cavallo, Francesco Castagnini, Annarita Cenacchi, Simone Natali, Francesca Vannini, and Sandro Giannini. "Treatment of Hemophilic Ankle Arthropathy with One-Step Arthroscopic Bone Marrow-Derived Cells Transplantation." *Cartilage* 6, no. 3 (2015): 150-55. doi:10.1177/1947603515574286.
67. Vega, Aurelio, Miguel Angel Martín-Ferrero, Francisco Del Canto, Mercedes Alberca, Veronica García, Anna Munar, Lluís Orozco, Robert Soler, Juan Jose Fuertes, Marina Huguet, Ana Sánchez, and Javier García-Sancho. "Treatment of Knee Osteoarthritis With Allogeneic Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells." *Transplantation* 99, no. 8 (2015): 1681-690. doi:10.1097/tp.0000000000000678.
68. Orozco, Lluís, Anna Munar, Robert Soler, Mercedes Alberca, Francesc Soler, Marina Huguet, Joan Sentís, Ana Sánchez, and Javier García-Sancho. "Treatment of Knee Osteoarthritis With Autologous Mesenchymal Stem Cells." *Transplantation Journal* 95, no. 12 (2013): 1535-541. doi:10.1097/tp.0b013e318291a2da.
69. Varma, H. S., B. Dadarya, and A. Vidyarthi. "The new avenues in the management of osteo-arthritis of knee-stem cells." *J. Indian Med. Assoc.* 108, no. 9 (2010): 583-85.
70. Webb, Tracy L., Jessica M. Quimby, and Steven W. Dow. "In vitro comparison of feline bone marrow-derived and adipose tissue-derived mesenchymal stem cells." *Journal of Feline Medicine and Surgery* 14, no. 2 (2012): 165-68. doi:10.1177/1098612x11429224.