

DOI: 10.15825/1995-1191-2021-3-90-100

# СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ХОНДРОГЕНЕЗА МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК ЖИРОВОЙ ТКАНИ ЧЕЛОВЕКА ПРИ КУЛЬТИВИРОВАНИИ НА КОЛЛАГЕНСОДЕРЖАЩИХ НОСИТЕЛЯХ В УСЛОВИЯХ *IN VITRO*

Ю.Б. Басок<sup>1</sup>, А.М. Григорьев<sup>1</sup>, Л.А. Кирсанова<sup>1</sup>, А.Д. Кириллова<sup>1</sup>, А.М. Суббот<sup>2</sup>, А.В. Цветкова<sup>3</sup>,  
Е.А. Немец<sup>1</sup>, В.И. Севастьянов<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр трансплантологии и искусственных органов имени академика В.И. Шумакова» Минздрава России, Москва, Российская Федерация

<sup>2</sup> ФГБНУ «Научно-исследовательский институт глазных болезней», Москва, Российская Федерация

<sup>3</sup> ФГБНУ «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича», Москва, Российская Федерация

По способу получения коллагеновые носители подразделяются на материалы, полученные на основе компонентов внеклеточного матрикса (ВКМ), в частности, коллагенсодержащие гидрогели и децеллюляризованные ткани. **Цель работы:** сравнить *in vitro* способность биополимерного микрогетерогенного коллагенсодержащего гидрогеля (БМКГ) и тканеспецифического матрикса из децеллюляризованного суставного хряща свиньи (ДХ) поддерживать адгезию, пролиферацию и хондрогенную дифференцировку мезенхимальных стромальных клеток жировой ткани человека (МСК ЖТч). **Материалы и методы.** Для децеллюляризации хряща использовали обработку поверхностно-активными веществами (додецилсульфат натрия, Тритон X-100) с последующей экспозицией в ДНКазе. Оценку метаболической активности МСК ЖТч проводили методом окрашивания PrestoBlue™ (Invitrogen, США). Морфологическое исследование клеточно-инженерных конструкций (КИК), формирующихся при культивировании МСК ЖТч в присутствии матриксов, проводили с использованием методов гистологического окрашивания и сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) с лантаноидным контрастированием. **Результаты.** Количество клеток на поверхности как БМКГ, так и ДХ увеличивалось в течение 14 дней. Митохондриальная активность клеток на 3, 10 и 14-е сутки при культивировании на ДХ была выше в 1,7; 1,7 и 1,3 раза по сравнению с БМКГ соответственно. На 14-е сутки культивирования в хондрогенной культуральной среде МСК ЖТч образовали клеточные пласты на поверхности ДХ и на поверхности БМКГ. Цитоплазма клеток включала многочисленные гранулы, по окраске напоминающие сам матрикс. На поверхности матрикса ДХ клетки распределялись более равномерно, тогда как в случае БМКГ адгезия и пролиферация клеток наблюдались только на отдельных участках. При этом нарабатанный клетками ВКМ содержал коллаген и гликозаминогликаны (ГАГ). **Заключение.** Способность полученного по разработанному протоколу ДХ образовывать с МСК ЖТч КИК с равномерным распределением клеток и наработкой ими специфического ВКМ, содержащего коллаген и ГАГ, свидетельствует о потенциале ДХ в регенерации поврежденного хряща. Хондрогенную дифференцировку МСК ЖТч наблюдали как при культивировании с БМКГ, так и с ДХ. При создании тканевого эквивалента хряща *in vitro* следует учитывать преимущество применения тканеспецифического матрикса по сравнению с БМКГ.

*Ключевые слова:* хрящевая ткань, хондрогенная дифференцировка, мезенхимальные стромальные клетки, децеллюляризованный матрикс, тканевая инженерия.

**Для корреспонденции:** Басок Юлия Борисовна. Адрес: 123182, Москва, ул. Щукинская, д. 1.  
Тел. (916) 637-88-63. E-mail: bjb2005@mail.ru

**Corresponding author:** Yuliya Basok. Address: 1, Shchukinskaya str., Moscow, 123182, Russian Federation.  
Phone: (916) 637-88-63. E-mail: bjb2005@mail.ru

# COMPARATIVE STUDY OF CHONDROGENESIS OF HUMAN ADIPOSE-DERIVED MESENCHYMAL STEM CELLS WHEN CULTURED IN COLLAGEN-CONTAINING MEDIA UNDER *IN VITRO* CONDITIONS

Y.B. Basok<sup>1</sup>, A.M. Grigoriev<sup>1</sup>, L.A. Kirsanova<sup>1</sup>, A.D. Kirillova<sup>1</sup>, A.M. Subbot<sup>2</sup>,  
A.V. Tsvetkova<sup>3</sup>, E.A. Nemets<sup>1</sup>, V.I. Sevastianov<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Shumakov National Medical Research Center of Transplantology and Artificial Organs, Moscow, Russian Federation

<sup>2</sup> Research Institute of Eye Diseases, Moscow, Russian Federation

<sup>3</sup> Orekhovich Institute of Biomedical Chemistry, Moscow, Russian Federation

In terms of method of production, collagen carriers are subdivided into materials obtained on the basis of extracellular matrix (ECM) components, particularly collagen-containing hydrogels and decellularized tissue. **Objective:** to compare *in vitro* the ability of biopolymer microheterogeneous collagen-containing hydrogel (BMCH) and tissue-specific matrix from decellularized porcine articular cartilage (DPAC) to support adhesion, proliferation and chondrogenic differentiation of human adipose-derived mesenchymal stem cells (hAMSCs). **Materials and methods.** For cartilage decellularization, we carried out treatment with surfactants (sodium dodecyl sulfate, Triton X-100) followed by exposure in DNAase. The metabolic activity of hAMSCs was assessed by PrestoBlue™ (Invitrogen, USA) staining. The morphological study of cell-engineered constructs (CECs) formed by culturing hAMSCs in the presence of matrices was performed using histological staining and scanning electron microscopy (SEM) with lanthanide contrasting. **Results.** The number of cells on the surface of both BMCH and DPAC increased within 14 days. Mitochondrial activity of the cells was 1.7, 1.7, and 1.3 times higher on days 3, 10, and 14 when cultured on DPAC compared to BMCH, respectively. On day 14 of cultivation in the chondrogenic culture medium, hAMSCs formed cell layers on the DPAC surface and on the BMCH surface. Cytoplasm of the cells included numerous granules, which, when stained, resembled the matrix itself. On the DPAC matrix surface, cells were more evenly distributed, whereas in the case of BMCH, cell adhesion and proliferation were observed only in certain areas. The ECM produced by the cells contained collagen and glycosaminoglycans (GAGs). **Conclusion.** The ability of DPAC obtained according to the developed protocol to form CECs with hAMSCs with uniform distribution of cells and their production of specific collagen- and GAG-containing ECM suggests that DPAC is effective in regeneration of damaged cartilage. Chondrogenic differentiation of hAMSCs was observed both when cultured with BMCH and with DPAC. When creating a tissue equivalent of cartilage *in vitro*, the advantage of using tissue-specific matrix over BMCH should be considered.

*Keywords:* cartilage tissue, chondrogenic differentiation, mesenchymal stem cells, decellularized matrix, tissue engineering.

## ВВЕДЕНИЕ

Суставной хрящ представляет собой аваскулярную плотную ткань с ограниченной способностью к регенерации, что указывает на целесообразность разработки терапевтических подходов к его восстановлению с использованием технологий клеточной терапии и тканевой инженерии [1].

«Золотым стандартом» в клеточной терапии заболеваний суставов на сегодняшний день является трансплантация аутологичных хондроцитов. Однако этот метод имеет ряд недостатков, к которым в первую очередь относят травматичность биопсии и высокую вероятность дедифференцировки хондроцитов при экспансии [2]. В качестве альтернативы аутологичным хондроцитам рассматриваются мезенхимальные стромальные клетки (МСК). По своей природе эти клетки обладают способностью к направленной

дифференцировке в различные мезенхимные ткани, включая хрящевую, и иммуномодулирующими свойствами. Отметим, что благодаря высокому хондрогенному потенциалу, простоте выделения и минимальной травматичности жировую ткань человека (ЖТч) относят к перспективным источникам МСК для тканевой инженерии хряща [3, 4].

Для повышения эффективности клеточной терапии пораженных суставов МСК вводят во внутрисуставную сумку на биodeградируемых носителях – миметиках внеклеточного матрикса (ВКМ), способствующих поддержанию жизнеспособности и хондрогенной дифференцировки МСК [5].

Коллаген, основной структурный белок естественного ВКМ хряща, используют в большинстве биомедицинских клеточных продуктов для лечения дефектов хрящевой ткани [6]. Из отечественных раз-

работок можно выделить биополимерный микрогетерогенный коллагенсодержащий гидрогель (БМКГ) из линейного ряда композиции имплантируемого гетерогенного геля Сферо®ГЕЛЬ (АО «Биомир сервис», Россия). Была доказана эффективность использования БМКГ в качестве матрикса в биомедицинских клеточных продуктах для регенерации поврежденного суставного хряща, печени и поджелудочной железы [7, 8]. Большой, с нашей точки зрения, интерес для тканевой инженерии хряща представляют децеллюляризованные носители – биологические миметики ВКМ, получаемые путем удаления клеток и их фрагментов из ткани с максимальным сохранением структуры и состава естественного ВКМ [9, 10]. Показано, что децеллюляризованный хрящ (ДХ) не только поддерживает адгезию и пролиферацию клеток, но и стимулирует дифференцировку МСК в хондроциты [11–13]. Сравнительная оценка способностей полученных БМКГ и ДХ поддерживать адгезию, пролиферацию и хондрогенную дифференцировку МСК *in vitro* позволит выбрать матрикс, имеющий наибольший потенциал для применения в регенеративной медицине для восстановления поврежденной хрящевой ткани, что явилось целью данной работы.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### Гетерогенный гель Сферо®ГЕЛЬ

Для создания клеточно-инженерной конструкции (КИК) была выбрана композиция гетерогенного имплантируемого геля из линейного ряда Сферо®ГЕЛЬ (АО «Биомир сервис», Россия) со следующими характеристиками:

- средний размер микрочастиц –  $145,79 \pm 0,09$  мкм;
- модуль упругости –  $1170 \pm 12$  Па;
- модуль вязкости –  $62,9 \pm 7,9$  Па;
- набухаемость – не ниже  $86,6 \pm 3,0$  мас. %.

### Получение микрочастиц суставного хряща

Свиные бедренные и коленные суставы были получены на бойне (ООО «АПК «ПРОМАГРО», г. Старый Оскол) после забоя здоровых животных (вес около 120 кг) в соответствии с Европейской директивой 64/433/ЕЕС. После транспортировки в охлажденном виде (+4 °С) хрящ удаляли с суставных поверхностей скальпелем, нарезали фрагментами размером  $0,5 \times 0,5 \times 0,1$  см. Микронизацию полученных фрагментов проводили на криомельнице StyoMill (Retz GmbH, Германия). Фракцию микродисперсных частиц в диапазоне 100–250 мкм выделяли просеиванием помола через набор сит с соответствующим размером пор.

### Режим децеллюляризации

Децеллюляризацию осуществляли обработкой микрочастиц в трех сменах фосфатного буфера (138 мМ NaCl, 2,67 мМ KCl, 1,47 мМ  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 8,1 мМ  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , pH 7,4), содержащего 0,1% додецилсульфат натрия и повышающуюся концентрацию Тритона X100 (1, 2 и 3% соответственно) при комнатной температуре и периодическом перемешивании. Далее образцы помещали в буферный раствор (10 мМ Трис-HCl, 2,5 мМ  $\text{MgCl}_2$ , 0,5 мМоль  $\text{CaCl}_2$ ; pH = 7,6), содержащий 50 Е/мл ДНКазы I типа (New England Biolabs Inc., США) на 48 часов при температуре 37 °С. Отмывку матрикса осуществляли в бидистиллированной воде. Для стерилизации матрикса использовали гамма-облучение в дозе 1,5 Мрад.

### Выделение клеток

Источником МСК ЖТч была подкожная жировая клетчатка здорового донора, взятая у него при информированном добровольном согласии. Образец подкожной жировой ткани объемом 2–3 г измельчали скальпелем, подвергали двукратной промывке холодным (+4...+6 °С) раствором Хенкса, а затем инкубировали в 0,1% растворе коллагеназы I типа (Gibco, США) при 37 °С в течение 20 мин.

Все клетки осаждали центрифугированием, ресуспендировали в полной ростовой среде состава DMEM/F12 (1 : 1) с добавлением 10% фетальной сыворотки крупного рогатого скота, 100 ед/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина сульфата и 2 мМ L-глутамин (Gibco, США) и культивировали до формирования монослоя, меняя среду 2 раза в неделю. Перевод клеток в суспензию осуществляли путем обработки раствором Версена при 37 °С в течение 1 мин с последующим добавлением диссоциирующего агента TrypLe™ (Invitrogen, США). Для экспериментов брали клетки 3-го пассажа.

### Дифференцировка клеток

Для подтверждения наличия в культуре мультипотентных клеток были проведены эксперименты по ее разнонаправленной дифференцировке. Хондрогенную дифференцировку клеток проводили в микросферах, полученных путем осаждения  $2 \times 10^5$  клеток в 96-луночных планшетах с коническим дном. Через 2 недели культивирования в хондрогенной культуральной среде (DMEM HG с добавкой GlutaMAX™ (Gibco, США), 10% ITS+ (Corning, США), 1% пируват натрия (Gibco, США), 0,25% аскорбат-2-фосфата (Sigma-Aldrich, США), 0,0001% дексаметазона (Sigma-Aldrich, США), 0,002% TGF-β1 (PeproTech, США) и 1% культурального антибиотика-антимикотика (Gibco, США). Препараты фиксировали в

забуференном растворе 10% формалина, заливали в парафин. Срезы депарафинировали, регидратировали и окрашивали альциановым синим. Адипогенную дифференцировку изучаемых культур проводили в среде DMEM/F12, содержащей 10% лошадиной сыворотки, 0,5 мМ изобутилметилксантина и 60 мМ индометацина в течение 7 дней, затем препараты фиксировали 4% параформальдегидом и окрашивали масляным красным. Дифференцировку полученных культур в костную ткань проводили в бессывороточной среде DMEM/F12 с добавлением 0,2 мМ аскорбиновой кислоты, 10 мМ b-глицерофосфата кальция, 10<sup>-7</sup> М дексаметазона (Sigma), 100 ед/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина сульфата и 2 мМ L-глутамина (Gibco). Клетки культивировали в течение 3 недель, меняя среду 2 раза в неделю. По окончании препараты фиксировали в 4% растворе формальдегида и окрашивали ализариновым красным.

В предыдущих исследованиях [14] было показано, что культуры МСК из всех источников обладали сходным фенотипом CD29, CD34, CD44, CD49b, CD45, CD73, CD90, HLA-DR, что свидетельствует о высоком содержании мультипотентных клеток мезенхимального происхождения. Большинство из этих макромолекул включены в список маркеров, рекомендуемых Международным обществом клеточной терапии для характеристики культур МСК [15].

### Метод определения метаболической активности

Определение метаболической активности клеток проводили с помощью теста с реактивом PrestoBlue™ (Invitrogen, США) согласно инструкции производителя. Метод основан на дегидрогеназной активности клеток, превращающих резазурин в резорурфин, который возможно определить в том числе и спектрофотометрически. Спектрофотометрический анализ выполняли на планшетном ридере Tecan Spark10 (Tecan, Австрия). При исследовании метаболической активности на 5 мг децеллюляризованного хряща (ДХ) вносили 2 × 10<sup>4</sup> МСК ЖТ. При исследовании метаболической активности на 100 мкл БМКГ вносили 2 × 10<sup>4</sup> МСК ЖТ. Данные измерения поглощения использовали для расчета коэффициента метаболической активности (К) по формуле:

$$K = \frac{117,216 \times Abs_{570} - 80,586 \times Abs_{600}}{155,677 \times Abs_{600} - 14,652 \times Abs_{570}} \times 100\%$$

где Abs<sub>570</sub> – поглощение при длине волны 570 нм; Abs<sub>600</sub> – поглощение при длине волны 600 нм.

### Создание клеточно-инженерных конструкций

КИК состояла из 1 × 10<sup>6</sup> клеток и 5 мг децеллюляризованного хряща (ДХ) или 0,25 мл БМКГ. Матрицы заселяли клетками путем вращения в пробирках с культуральной средой на платформе шейкера типа «балерина» Multi Bio 3D (Biosan, Латвия). Первые 5 суток КИК культивировали в ростовой культуральной среде. Далее культуральную среду заменяли на дифференцировочную хондрогенную среду. Замену среды осуществляли на каждый третий день. Анализ образцов на 14-е и 42-е сутки культивирования в дифференцировочной культуральной среде проводили с использованием гистологических методов окрашивания.

### Метод сканирующей электронной микроскопии

Морфологию поверхности и ближайшего подповерхностного слоя образцов изучали совместно с сотрудниками лаборатории фундаментальных исследований в офтальмологии ФГБНУ «НИИ глазных болезней» методом сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) с использованием лантаноидного контрастирования [16].

Пробоподготовка сильно обводненных образцов для СЭМ затруднена, т. к. требует их обезвоживания, напыления токопроводящего слоя, а это приводит не только к сильным структурным изменениям таких объектов, но и затрудняет дифференциацию клеточных элементов от подложки. Метод лантаноидного контрастирования позволяет наблюдать необезвоженные биологические образцы в режиме низкого вакуума после выдержки их в насыщенном растворе редкоземельного металла. При этом максимально сохраняется нативное состояние исследуемого объекта, а изображение, полученное в режиме детекции обратно рассеянных электронов, несет расширенную информацию о внутриклеточных структурах [16].

Протокол обработки включал первичную промывку, выдержку 45 мин в контрастирующем растворе BioREE (ООО «Глаукон», Россия) и финальную промывку дистиллированной водой. После контрастирования с поверхности образца удаляли избыток влаги воздушной кистью и размещали его на предметном столике микроскопа EVO LS10 (Zeiss, Германия). Наблюдения проводились в режиме низкого вакуума (EP, 70 Па), при ускоряющем напряжении 20 кВ.

## Методы гистологического анализа образцов

Для гистологических исследований образцы фиксировали в забуференном 10% растворе формалина, промывали в проточной воде и обезвоживали в спиртах восходящих концентраций (в двух порциях 70, 80, 96% этанола), выдерживали в смеси этанола и хлороформа, в хлороформе и заливали в парафин. Срезы толщиной 4–5 мкм, полученные с помощью микротомы Leica RM3255, депарафинировали, регидратировали и окрашивали, следуя стандартным методикам, гематоксилином и эозином, альциановым синим для выявления гликозаминогликанов (ГАГ) и на соединительную ткань по методу Массона по стандартным методикам.

Анализ и фотосъемку полученных препаратов проводили, используя микроскоп Nikon Eclipse, оснащенный цифровой фотокамерой.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Способность МСК ЖТч дифференцироваться в хондрогенном, адипогенном, остеогенном направлениях показана на рис. 1.

Из кривых роста видно, что количество клеток на поверхности как БМКГ, так и ДХ увеличивалось в течение 14 дней (рис. 2). В первые сутки измере-

ния значения оптической плотности в образцах не различались, что свидетельствует о схожей численности клеточной популяции на поверхности БМКГ и ДХ в начале эксперимента, а также, вероятно, об одинаковой адгезионной способности носителей для МСК в первоначально внесенном в КИК количестве. Однако значимая разница в объеме клеточной популяции начиная с третьих суток позволила выявить влияние носителей на пролиферативную способность культуры МСК ЖТч. Митохондриальная активность клеток, обеспечивающая превращение синего резазурина в розовый резорурфин, на 3, 10 и 14-е сутки при культивировании МСК на ДХ была выше в 1,7; 1,7 и 1,3 раза по сравнению с БМКГ. Форма кривых роста схожа, однако в случае БМКГ к 14-м суткам мы наблюдали тенденцию приближения к стационарной фазе, тогда как в случае БМКГ на 14-е сутки признаков замедления роста МСК ЖТч не визуализировали. По всей видимости, замедление клеточного роста связано с ограниченностью площади носителя для колонизации, так как оптимальное количество факторов роста и питательных веществ поддерживали, регулярно заменяя культуральную среду. Отметим, что полученные результаты позволяют оценить количество МСК ЖТч, обладающих метаболической активностью, присутствие которых

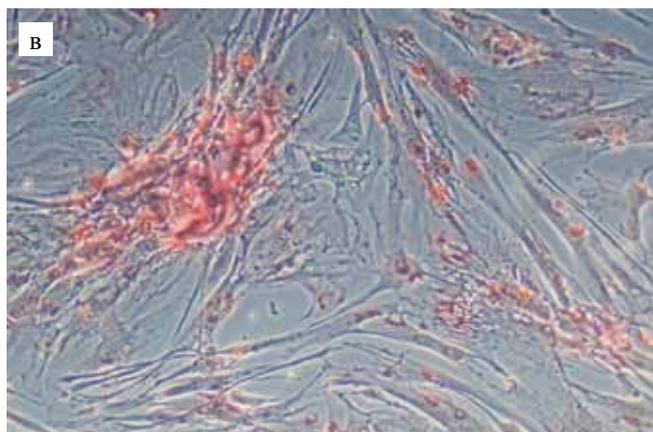
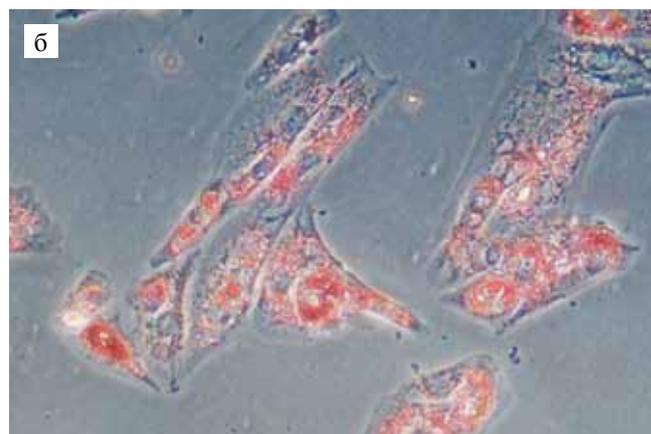
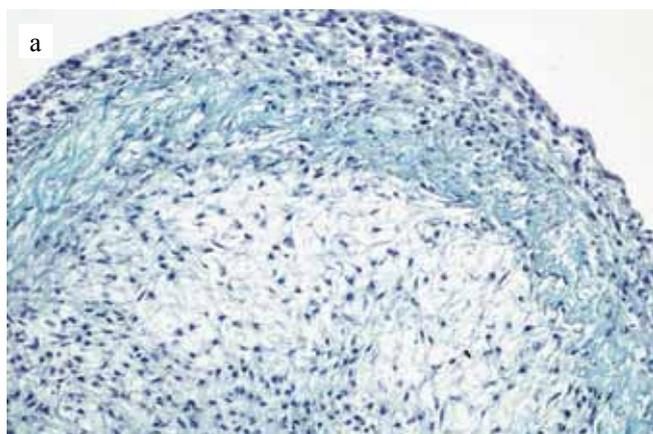


Рис. 1. Дифференцировка МСК ЖТ в хондрогенном (а, окрашивание альциановым синим), адипогенном (б, окрашивание масляным красным) и остеогенном (в, окрашивание ализариновым красным) направлениях.  $\times 200$

Fig. 1. Differentiation of hAMSCs in chondrogenic (a, alcian blue stain), adipogenic (б, Oil Red O stain) and osteogenic (в, Alizarin Red stain).  $\times 200$

в образцах важно для функционирования клеток в составе КИК, так как в восстановлении резазурина до резорфина принимают участие митохондриальные дегидрогеназы, цитохромы и дегидрогеназы, находящиеся в цитоплазме [17]. Разница в количестве клеток при наблюдении в течение 14 суток (рис. 2) свидетельствует о большей способности ДХ стимулировать рост МСК ЖТч по сравнению с БМКГ. Отметим, что для полной сравнительной оценки *in vitro*

перспективы использования клеточных носителей в тканевой инженерии хряща необходимо исследовать их способность к поддержанию хондрогенной дифференцировки МСК ЖТч.

На рис. 3 представлены результаты СЭМ морфологии КИК, состоящих из МСК ЖТч и ДХ или БМКГ после 14 суток культивирования.

На 14-е сутки культивирования в хондрогенной культуральной среде МСК ЖТч образовывались

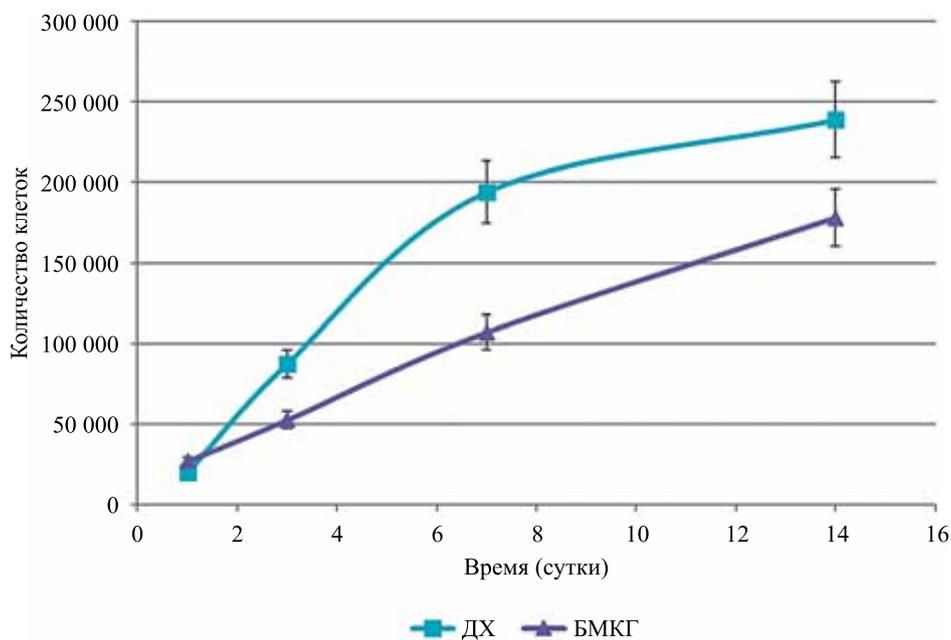


Рис. 2. Кривые роста МСК ЖТч при культивировании в присутствии ДХ и БМКГ

Fig. 2. Growth curve of hAMSCs when cultured in DPAC and BMCH

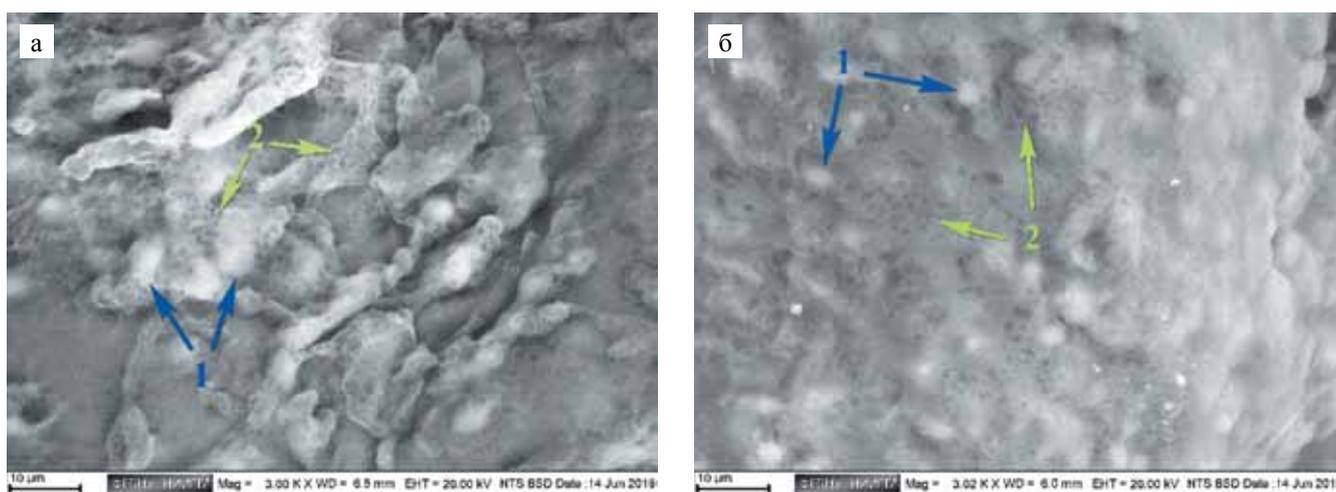


Рис. 3. Микрофотографии структуры поверхности КИК, состоящих из МСК ЖТч и ДХ (а) или БМКГ (б) в дифференцировочной хондрогенной среде после 14 суток культивирования. СЭМ в режиме BSD с использованием лантаноидного контрастирования BioREE. Размер масштабной линейки 10 мкм. 1 – ядра, 2 – внутриклеточные везикулы

Fig. 3. Microphotographs of the CEC surface structure, including hAMSCs, cultured in DPAC (a) and in BMCH (б) in a chondrogenic differentiation medium for 14 days. SEM using lanthanide contrasting BioREE. The scale bar size is 10  $\mu$ m. 1 – nuclei, 2 – intracellular vesicles

клеточные пласты как на поверхности ДХ, так и на поверхности БМКГ (рис. 3). В части клеток использование лантаноидного контрастирования позволило визуализировать внутриклеточные структуры за счет накопления лантаноидов в зонах, богатых кальцием и фосфором (в том числе  $Ca^{2+}$ -каналов различных мембран, белков клеточных контактов). Удалось идентифицировать ядра и края плазматической мембраны в некоторых клетках. Интересно, что цитоплазма клеток включала многочисленные гранулы, содержимое которых по яркости сходно с используемым матриксом. Эти внутриклеточные везикулы могут быть связаны как с секрецией компонентов внеклеточного хрящевого матрикса, так и с резорбцией носителя. Оба описанных процесса наблюдали в гистологических исследованиях образцов КИК

хряща. Отметим, что, суммируя это с наблюдаемой распластанной формой клеток, можно заключить, что в культивируемых на поверхности тканеспецифического носителя и коллагенсодержащего гидрогеля клетках активно происходили физиологические метаболические процессы.

Как видно на рис. 4, на поверхности ДХ происходил активный рост фибробластоподобных клеток с формированием многослойных пластов. Клетки и наработанный ими ВКМ скрепляли многочисленные микрочастицы ДХ, образуя крупные конгломераты.

В образцах КИК, включающих БМКГ, наблюдали гетерогенную клеточную популяцию, формирующую многослойные участки. Клетки прорастали в толщу БМКГ, что сопровождалось его резорбцией. Также визуализировали участки разрушения клеточного

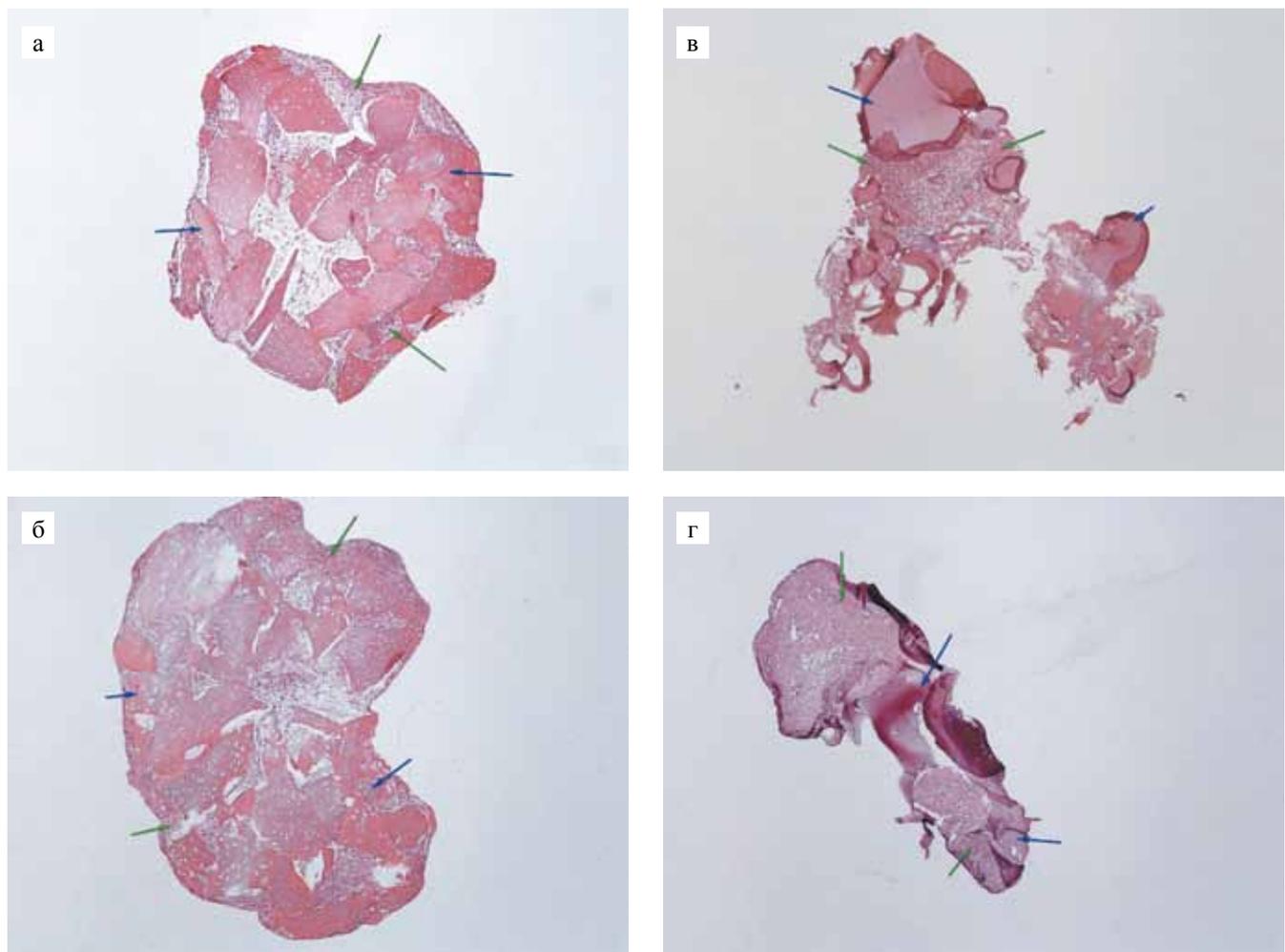


Рис. 4. Гистологическая картина динамики формирования КИК: а, б – КИК на основе ДХ, в, г – КИК на основе БМКГ; а, в – 14-е сутки культивирования в хондрогенной культуральной среде, б, г – 42-е сутки культивирования в хондрогенной культуральной среде. Синие стрелки – клеточный носитель, зеленые стрелки – клетки с наработанным ВКМ. Окрашивание гематоксилином и эозином.  $\times 40$

Fig. 4. Histological picture of CEC formation dynamics: а, б – DPAC-based CECs, в, г – BMCH-based CECs; а, в – 14 days of cultivation in chondrogenic differentiation medium, б, г – 42 days of cultivation in chondrogenic differentiation medium. arrows – cell carrier, green arrows – cells with the obtained ECM. H&E staining.  $\times 40$

пласта. В образце присутствовали зоны, не окрашенные гематоксилином – клеточный детрит.

Количество клеточного детрита в КИК, как на основе ДХ, так и БМКГ, со временем увеличивалось. Отметим, что на поверхности матрикса ДХ клетки распределялись более равномерно, а для БМКГ адгезия и пролиферация клеток наблюдалась только на отдельных участках. Необходимо обратить внимание, что для обоих матриксов объем клеточной массы визуально не различается. Однако на поверхности ДХ клетки с синтезируемым ими ВКМ образуют тонкие тяжи, что приводит к формированию агрегатов из микродисперсных частиц. На поверхности гидрогелевого матрикса МСК ЖТч распределены по поверхности неравномерно в виде крупных скоплений, что может привести к дефициту питательных веществ в объеме клеточных пластов.

В наработанных клетками ВКМ в КИК, включающих оба типа матриксов, на 14-е сутки культивирования в дифференцировочной среде наблюдали локальное положительное окрашивание на ГАГ и коллаген в многослойных участках (рис. 5, а, в и рис. 6, а, в). Равномерное окрашивание ВКМ на ГАГ наблюдали в КИК, содержащих БМКГ, и в КИК с ДХ на 42-е сутки (рис. 5, б, г). К 42-м суткам в образцах наблюдали значительное увеличение содержания коллагена (рис. 6, б, г).

Полученные результаты показывают, что МСК ЖТ способны образовывать КИК хряща при культивировании в хондрогенной дифференцировочной среде на коллагенсодержащих матриксах. Можно предположить, что на хондрогенез МСК ЖТч в КИК с коллагенсодержащими миметиками, полученными из тканей ВКМ, оказывали влияние макромолекуляр-

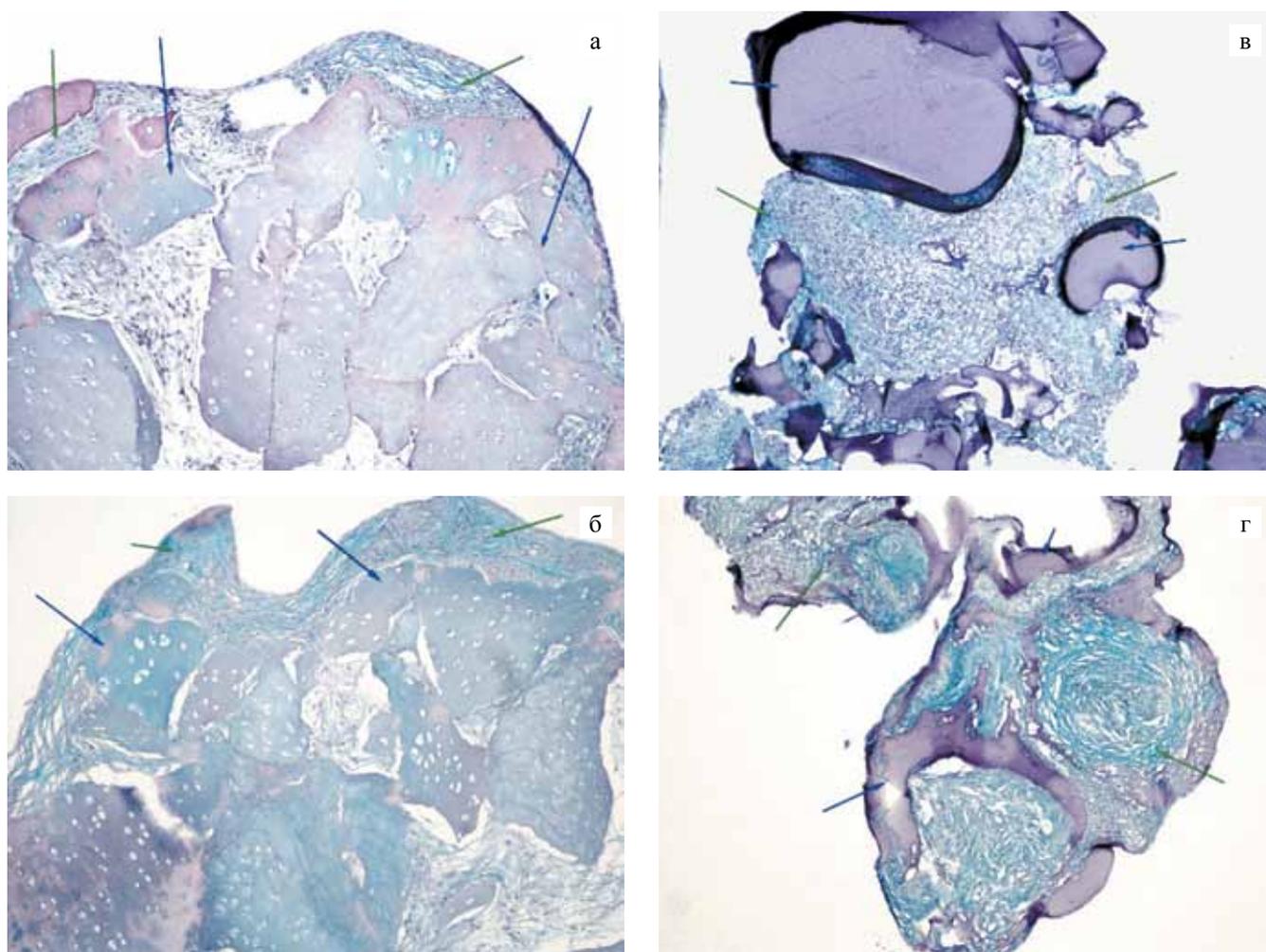


Рис. 5. Гистологическая картина динамики формирования КИК хряща: а, б – КИК на основе ДХ, в, г – КИК на основе БМКГ; а, в – 14-е сутки культивирования в хондрогенной культуральной среде, б, г – 42-е сутки культивирования в хондрогенной культуральной среде. Синие стрелки – клеточный носитель, зеленые стрелки – клетки с наработанным ВКМ. Окрашивание алциановым синим на ГАГ.  $\times 100$

Fig. 5. Histological picture of cartilage CEC formation dynamics: а, б – DPAC-based CEC, в, г – BMCH-based CECs; а, в – 14 days of cultivation in chondrogenic differentiation medium, б, г – 42 days of cultivation in chondrogenic differentiation medium. Blue arrows – cell carrier, green arrows – cells with the obtained ECM. Alcian blue stain for GAGs.  $\times 100$

ные компоненты ВКМ. Макромолекулы, такие как гиалуроновая кислота, хондроитин сульфат и коллаген II типа, широко изучались в качестве агента для восстановления хряща. Предполагается, что причина их стимулирующего действия на хондрогенез лежит в их взаимодействии с клетками. Например, введение гиалуроновой кислоты в культуру хондроцитов усиливало синтез ВКМ. В качестве возможного механизма предполагается, что поверхностный рецептор хондроцитов CD44 сначала связывается со стимулирующей его молекулой гиалуроновой кислоты, а затем взаимодействует с цитоплазматическим доменом рецептора TGF- $\beta$ 1, регулируя, в конечном итоге, гены, ответственные за сигнализацию TGF- $\beta$ 1, и улучшая синтез ВКМ [18, 19]. Кроме того, было показано, что коллаген II типа, являющийся основным белковым компонентом ВКМ гиалинового хряща,

из которого был получен ДХ, может способствовать сохранению хондроцитарной морфологии и синтезу большего количества ГАГ, чем коллаген I типа [20]. Также было показано, что коллаген II типа усиливает хондрогенную дифференцировку МСК при добавлении в агарозные матриксы [21]. Отметим, что в КИК с ДХ клетки распределялись более равномерно, тогда как в КИК с БМКГ клетки адгезировали и пролиферировали только на отдельных участках поверхности матрикса. Вероятно, это связано с сохранением участков адгезии клеток на поверхности микрочастиц ДХ благодаря более щадящей процедуре децеллюляризации в сравнении с уксуснокислым гидролизом, которому подвергаются ткани сельскохозяйственных животных при изготовлении БМКГ.

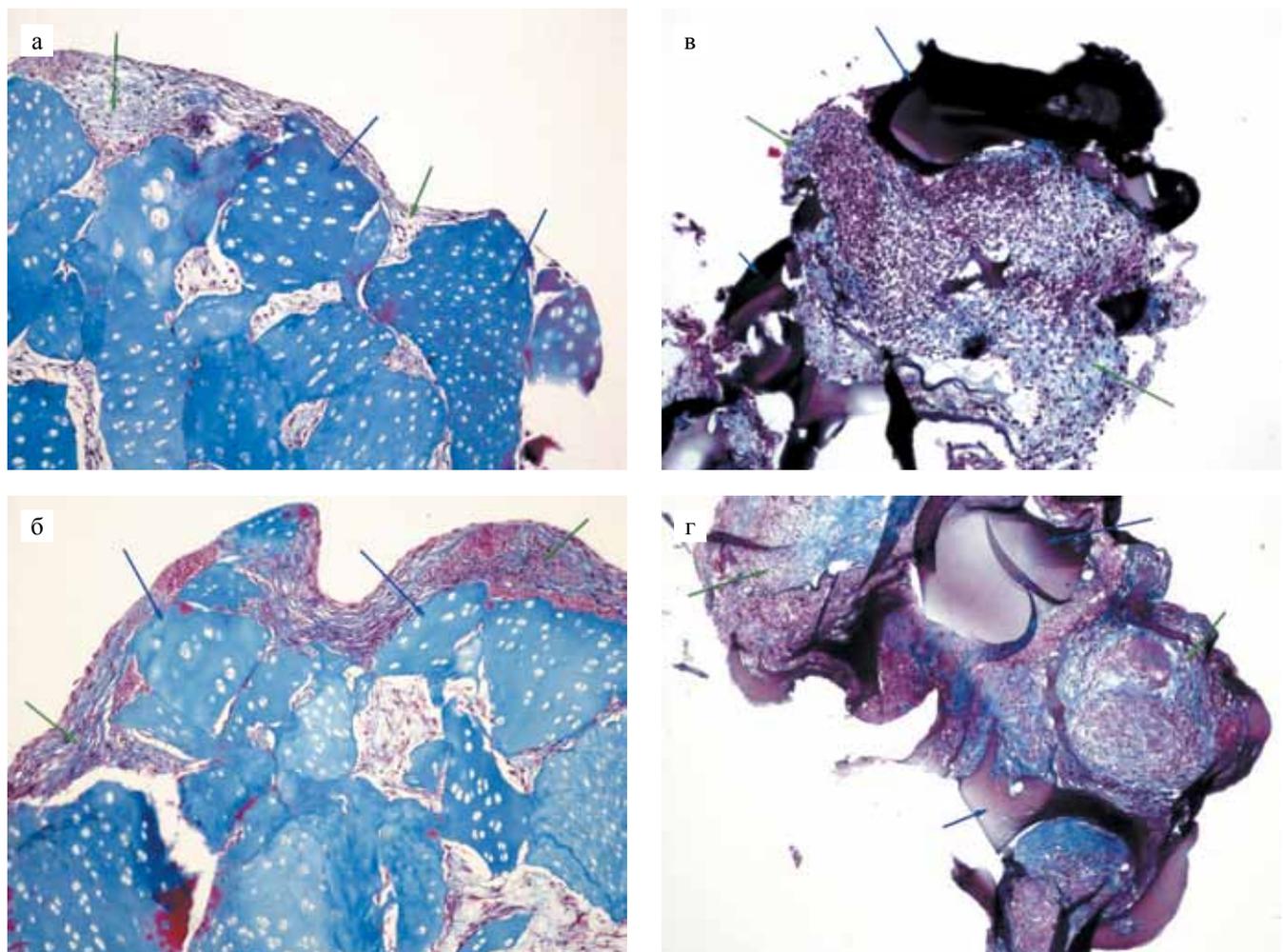


Рис. 6. Гистологическая картина динамики формирования КИК: а, б – КИК на основе ДХ, в, г – КИК на основе БМКГ; а, в – 14-е сутки культивирования в хондрогенной культуральной среде, б, г – 42-е сутки культивирования в хондрогенной культуральной среде. Синие стрелки – клеточный носитель, зеленые стрелки – клетки с наработанным ВКМ. Окрашивание гематоксилином и эозином.  $\times 100$

Fig. 6. Histological picture of CEC formation dynamics: а, б – DPAC-based CEC, в, г – BMCH-based CECs; а, в – 14 days of cultivation in chondrogenic differentiation medium, б, г – 42 days of cultivation in chondrogenic differentiation medium. Blue arrows – cell carrier, green arrows – cells with the obtained ECM. H&E staining.  $\times 100$

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Установленная способность полученного по разработанному протоколу ДХ образовывать с МСК ЖТ КИК с равномерным распределением клеток и наработкой ими специфического ВКМ, содержащего коллаген и ГАГ, свидетельствует о ее потенциале для регенерации поврежденного хряща. БМКГ и тканеспецифический ДХ проявили способность поддерживать хондрогенную дифференцировку МСК ЖТч. При создании тканевого эквивалента хряща *in vitro* следует учитывать преимущество применения тканеспецифического матрикса по сравнению с БМКГ.

Высокая способность полученного ДХ матрикса поддерживать адгезию, пролиферацию и хондрогенную дифференцировку МСК ЖТч в сравнении с применяемым в клинической практике аналогом указывает на перспективность его применения в тканевой инженерии.

*Авторы выражают благодарность И.А. Новикову (лаборатория фундаментальных исследований в офтальмологии, ФГБНУ «НИИ глазных болезней») за помощь в проведении СЭМ.*

*Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 21-15-00251, <https://rscf.ru/project/21-15-00251/>.*

*Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.*

*The authors declare no conflict of interest.*

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Kwon H, Brown WE, Lee CA, Wang D, Paschos N, Hu JC et al. Surgical and tissue engineering strategies for articular cartilage and meniscus repair. *Nat Rev Rheumatol*. 2019; 15 (9): 550–570. doi: 10.1038/s41584-019-0255-1. PMID: 31296933.
2. Bernhard JC, Vunjak-Novakovic G. Should we use cells, biomaterials, or tissue engineering for cartilage regeneration? *Stem Cell Res Ther*. 2016; 7 (1): 56. doi: 10.1186/s13287-016-0314-3. PMID: 27089917.
3. Schneider S, Unger M, van Griensven M, Balmayor ER. Adipose-derived mesenchymal stem cells from liposuction and resected fat are feasible sources for regenerative medicine. *Eur J Med Res*. 2017; 22 (1): 17. doi: 10.1186/s40001-017-0258-9. PMID: 28526089.
4. Tsvetkova AV, Vakhrushev IV, Basok YB, Grigor'ev AM, Kirsanova LA, Lupatov AY et al. Chondrogenic potential of MSC from different sources in spheroid culture. *Bull Exp Biol Med*. 2021; 170 (4): 528–536. doi: 10.1007/s10517-021-05101-x. PMID: 33725253.
5. Rai V, Dilisio MF, Dietz NE, Agrawal DK. Recent strategies in cartilage repair: A systemic review of the scaffold development and tissue engineering. *J Biomed Mater Res A*. 2017; 105 (8): 2343–2354. doi: 10.1002/jbm.a.36087. PMID: 28387995.
6. Wylie JD, Hartley MK, Kapron AL, Aoki SK, Maak TG. What is the effect of matrices on cartilage repair? *Clin Orthop Relat Res*. 2015; 473 (5): 1673–1682. doi: 10.1007/s11999-015-4141-0. PMID: 25604876.
7. Севастьянов ВИ, Перова НВ. Биополимерный гетерогенный гидрогель Сферо®ГЕЛЬ – инъекционный биодеградируемый имплантат для заместительной и регенеративной медицины. *Практическая медицина*. 2014; 8 (84): 120–126. Sevastianov VI, Perova NV. Bio-polymer heterogenic hydrogel Sphero®GEL – an injection biodegradable implant for substitutive and regenerative medicine. *Practical medicine*. 2014; 8 (84): 120–126. [In Russ, English abstract].
8. Sevastianov VI, Basok YB, Grigor'ev AM, Kirsanova LA, Vasilets VN. Formation of tissue-engineered construct of human cartilage tissue in a flow-through bioreactor. *Bull Exp Biol Med*. 2017; 164 (2): 269–273. doi: 10.1007/s10517-017-3971-z. PMID: 29177908.
9. Cramer MC, Badylak SF. Extracellular matrix-based biomaterials and their influence upon cell behavior. *Ann Biomed Eng*. 2020; 48 (7): 2132–2153. doi: 10.1007/s10439-019-02408-9. PMID: 31741227.
10. Basok YuB, Kirillova AD, Grigoryev AM, Kirsanova LA, Nemets EA, and Sevastianov VI. Fabrication of microdispersed tissue-specific decellularized matrix from porcine articular cartilage. *Inorganic Materials: Applied Research*. 2020; 11 (5): 1153–1159.
11. Sun Y, Yan L, Chen S, Pei M. Functionality of decellularized matrix in cartilage regeneration: A comparison of tissue versus cell sources. *Acta Biomater*. 2018; 74: 56–73. doi: 10.1016/j.actbio.2018.04.048. PMID: 29702288.
12. Pei M, Li JT, Shoukry M, Zhang Y. A review of decellularized stem cell matrix: a novel cell expansion system for cartilage tissue engineering. *Eur Cell Mater*. 2011; 22: 333–343. doi: 10.22203/ecm.v022a25. PMID: 22116651.
13. Севастьянов ВИ, Перова НВ, Басок ЮБ, Немец ЕА. Биомиметики внеклеточного матрикса в тканевой инженерии и регенеративной медицине для травматологии и ортопедии. *Opinion Leader*. 2020; 6 (35): 35–46. Sevastyanov VI, Perova NV, Basok JuB, Nemets EA. Biomimetiki vnekletochnogo matriksa v tkanevoj inzhenerii i regenerativnoj medicine dlja travmatologii i ortopedii. *Opinion Leader*. 2020; 6 (35): 35–46.
14. Tsvetkova AV, Vakhrushev IV, Basok YB, Grigor'ev AM, Kirsanova LA, Lupatov AY et al. Chondrogenic Potential of MSC from Different Sources in Spheroid Culture. *Bull Exp Biol Med*. 170 (4): 528–536. doi: 10.1007/s10517-021-05101-x. Epub 2021 Mar 16. PMID: 33725253.
15. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006; 8 (4): 315–317. doi: 10.1080/14653240600855905. PMID: 16923606.

16. *Novikov I, Subbot A, Turenok A, Mayanskiy N, Chebotar I.* A rapid method of whole cell sample preparation for scanning electron microscopy using neodymium chloride. *Micron.* 2019; 124: 102687. doi: 10.1016/j.micron.2019.102687. PMID: 31302532.
17. *Иксанова АГ, Бондарь ОВ, Балакин КВ.* Методы исследования цитотоксичности при скрининге лекарственных препаратов. Учебно-методическое пособие к практическим занятиям по курсу «Методы скрининга физиологически активных веществ». Казань: Казанский университет, 2016. 40. *Iksanova AG, Bondar' OV, Balakin KV.* Metody issledovanija citotoksichnosti pri skrininge lekarstvennyh preparatov. Uchebno-metodicheskoe posobie k prakticheskim zanjatijam po kursu «Metody skrininga fiziologicheskij aktivnyh veshchestv». Kazan': Kazanskij universitet, 2016. 40.
18. *Bourguignon LY, Singleton PA, Zhu H, Zhou B.* Hyaluronan promotes signaling interaction between CD44 and the transforming growth factor beta receptor I in metastatic breast tumor cells. *J Biol Chem.* 2002; 277 (42): 39703–39712. doi: 10.1074/jbc.M204320200. PMID: 12145287.
19. *Responde DJ, Natoli RM, Athanasiou KA.* Identification of potential biophysical and molecular signalling mechanisms underlying hyaluronic acid enhancement of cartilage formation. *J R Soc Interface.* 2012; 9 (77): 3564–3573. doi: 10.1098/rsif.2012.0399. PMID: 22809846.
20. *Nehrer S, Breinan HA, Ramappa A, Shortkroff S, Young G, Minas T et al.* Canine chondrocytes seeded in type I and type II collagen implants investigated *in vitro*. *J Biomed Mater Res.* 1997; 38 (2): 95–104. doi: 10.1002/(sici)1097-4636(199722)38:2<95::aid-jbm3>3.0.co;2-b. PMID: 9178736.
21. *Tiruvannamalai Annamalai R, Mertz DR, Daley EL, Stegemann JP.* Collagen Type II enhances chondrogenic differentiation in agarose-based modular microtissues. *Cytotherapy.* 2016; 18 (2): 263–277. doi: 10.1016/j.jcyt.2015.10.015. PMID: 26794716.

*Статья поступила в редакцию 4.06.2021 г.  
The article was submitted to the journal on 4.06.2021*

**УВАЖАЕМЫЕ ЧИТАТЕЛИ!**

Подписку на журнал «Вестник трансплантологии и искусственных органов»  
можно оформить в ближайшем к вам почтовом отделении.

**Подписной индекс** нашего издания в каталоге **ООО «Прессинформ» «Газеты и журналы» – 80248**

Ф. СП-1

**ВЕСТНИК**  
ТРАНСПЛАНТОЛОГИИ  
И ИСКУССТВЕННЫХ  
ОРГАНОВ

**80248**  
(индекс издания)

количество комплектов	
-----------------------	--

на 2021 год по месяцам

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12

Куда \_\_\_\_\_  
(почтовый индекс)

\_\_\_\_\_ (адрес)

Кому \_\_\_\_\_  
(фамилия, инициалы)

---

Ф. СП-1

**ВЕСТНИК**  
ТРАНСПЛАНТОЛОГИИ  
И ИСКУССТВЕННЫХ  
ОРГАНОВ

**80248**  
(индекс издания)

на журнал **80248**  
(индекс издания)

**ДОСТАВочная КАРТОчка**

пв	место	ли-тер
----	-------	--------

на 2021 год по месяцам

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12

Куда \_\_\_\_\_  
(почтовый индекс)

\_\_\_\_\_ (адрес)

Кому \_\_\_\_\_  
(фамилия, инициалы)