

DOI: 10.15825/1995-1191-2023-4-121-129

# ОЦЕНКА ДЕЙСТВИЯ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК ИЗ РАЗЛИЧНЫХ ИСТОЧНИКОВ НА ПРОЛИФЕРАЦИЮ ХОНДРОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА

А.Д. Белова<sup>1</sup>, Ю.Б. Басок<sup>1</sup>, А.М. Григорьев<sup>1</sup>, Л.А. Кирсанова<sup>1</sup>, Е.Г. Кузнецова<sup>1</sup>,  
И.В. Вахрушев<sup>2</sup>, А.В. Ковалев<sup>3</sup>, К.Н. Ярыгин<sup>2</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 биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича», Москва, Российская Федерация

<sup>3</sup> ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр травматологии и ортопедии имени Н.Н. Приорова» Минздрава России, Москва, Российская Федерация

**Цель:** изучить влияние кондиционированной среды от мезенхимальных стромальных клеток (МСК) из различных источников на пролиферацию хондроцитов человека. **Материалы и методы.** Для подтверждения функциональной активности хондроциты культивировали в составе клеточно-инженерной конструкции (КИК) хряща, включающей  $5 \times 10^5$  клеток и 5 мг тканеспецифического матрикса из децеллюляризованного хряща. Кондиционированную среду получали после культивирования МСК жировой ткани человека (ЖТч), пульпы молочного зуба и Вартонова студня пуповины в полной ростовой среде (ПРС). Для оценки влияния секрета МСК на пролиферацию хондроцитов кондиционированную среду, разбавленную в соотношении 1 : 1 с ПРС, вносили в лунки с хондроцитами. Влияние МСК на пролиферацию хондроцитов человека изучали при непрямом сокультивировании клеток в ПРС с использованием вставок Transwell. На дно нижней камеры наносили  $5 \times 10^4$  МСК, в верхнюю камеру помещали  $5 \times 10^4$  хондроцитов человека и 5 мг матрикса. Пролиферацию хондроцитов оценивали на 7-е и 14-е сутки путем количественного определения ДНК. В качестве маркера секреторной активности МСК в кондиционированной среде определяли содержание интерлейкина-6. Морфологию образцов исследовали с использованием гистологических методов окрашивания. **Результаты.** Способность хондроцитов вырабатывать характерный для хряща внеклеточный матрикс была подтверждена при формировании КИК хряща с тканеспецифическим матриксом в хондрогенной дифференцировочной среде. При сравнении влияния кондиционированной среды от МСК из различных источников на рост хондроцитов человека *in vitro* наблюдалось повышение пролиферации во всех образцах в сравнении с контролем. Непрямое сокультивирование МСК с хондроцитами в составе КИК показало повышение количества ДНК во все образцах к 14-м суткам, при этом количество ДНК в образце с кондиционированной средой от МСК ЖТч значительно превышало контроль. **Заключение.** Проведенные исследования по изучению влияния кондиционированной среды от МСК на пролиферацию хондроцитов в 2D-культуре указывают на возможный регенераторный потенциал МСК по восстановлению хрящевой ткани. В рамках данной работы мы не выявили достоверных различий в действии секрета МСК из различных источников на пролиферацию хондроцитов, однако в дальнейшем целесообразно проведение дополнительных исследований *in vivo*.

**Ключевые слова:** хрящевая ткань, мезенхимальные стромальные клетки, кондиционированная среда, тканевая инженерия.

**Для корреспонденции:** Белова Александра Дмитриевна. Адрес: 123182, Москва, ул. Щукинская, д. 1.  
Тел. (963) 633-94-34. E-mail: sashak1994@mail.ru

**Corresponding author:** Alexandra Belova. Address: 1, Shchukinskaya str., Moscow, 123182, Russian Federation.  
Phone: (963) 633-94-34. E-mail: sashak1994@mail.ru

# EVALUATION OF THE EFFECT OF MESENCHYMAL STROMAL CELLS FROM DIFFERENT SOURCES ON HUMAN CHONDROCYTE PROLIFERATION

A.D. Belova<sup>1</sup>, Yu.B. Basok<sup>1</sup>, A.M. Grigoriev<sup>1</sup>, L.A. Kirsanova<sup>1</sup>, E.G. Kuznetsova<sup>1</sup>,  
I.V. Vakhrushev<sup>2</sup>, A.V. Kovalev<sup>3</sup>, K.N. Yarygin<sup>2</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> Institute of Biomedical Chemistry, Moscow, Russian Federation

<sup>3</sup> Priorov National Medical Research Center for Traumatology and Orthopedics, Moscow, Russian Federation

**Objective:** to study the effect of a conditioned medium of mesenchymal stromal cells (MSCs) from different sources on human chondrocyte proliferation. **Materials and methods.** To confirm functional activity, chondrocytes were cultured in a cartilage cell-engineered construct (CEC), including  $5 \times 10^5$  cells and 5 mg of tissue-specific matrix from decellularized cartilage. The conditioned medium was obtained after culturing MSCs derived from human adipose tissue (AT), MSCs derived from the pulp of primary teeth and MSCs isolated from umbilical cord-derived Wharton's jelly in a complete cell growth medium (CCGM). To evaluate the effect of MSC-derived secretome on chondrocyte proliferation, the conditioned medium, diluted 1 : 1 with CCGM, was added to wells containing chondrocytes. The effect of MSCs on human chondrocyte proliferation was studied by indirectly co-culturing cells in CCGM using Transwell inserts.  $5 \times 10^4$  MSCs were applied to the bottom of the lower chamber, and  $5 \times 10^4$  human chondrocytes and 5 mg of matrix were placed in the upper chamber. Chondrocyte proliferation was assessed at days 7 and 14 by DNA quantification. Interleukin-6 content was determined as a marker of secretory activity of MSCs in the conditioned medium. The morphology of the samples was studied using histological staining methods. **Results.** The ability of chondrocytes to produce cartilage-specific extracellular matrix was confirmed when forming cartilage CEC with tissue-specific matrix in a chondrogenic differentiation medium. When comparing the effect of the conditioned medium of MSCs obtained from different sources on the growth of human chondrocytes in vitro, increased proliferation was observed in all samples compared to controls. Indirect co-culture of MSCs with chondrocytes as part of CEC showed increased DNA amount in all samples at day 14, with the amount of DNA in the sample with MSC conditioned medium significantly higher than the control. **Conclusion.** Studies on the effect of MSC conditioned medium on chondrocyte proliferation in 2D culture indicate a possible regenerative potential of MSCs for cartilage tissue repair. Within the scope of this work, we did not identify significant differences in the effect of secretome derived from MSCs that were obtained from different sources on chondrocyte proliferation. However, additional in vivo studies are warranted in the future.

*Keywords:* cartilage tissue, mesenchymal stromal cells, conditioned medium, tissue engineering.

## ВВЕДЕНИЕ

Остеоартроз (ОА) представляет собой заболевание, характеризующееся недостаточностью функции сустава, в основе которого лежат деструктивные структурные изменения гиалинового суставного хряща с последующими дегенеративными процессами подлежащей кости [1, 2]. Заболеваемость ОА в мире с каждым годом растет, что приводит к увеличению уровня инвалидизации населения в целом [3].

Суставной хрящ состоит из хондроцитов и внеклеточного матрикса (ВКМ), включающего коллагены (в основном коллаген II типа), протеогликаны и неколлагеновые белки [4]. На ранних стадиях ОА колленного сустава наблюдаются изменения в структуре коллагена и протеогликанов, приводящие к эрозиям суставного хряща. В ответ на эрозию хряща хондроциты проходят фазу гипертрофической активности, продуцируя медиаторы воспаления, которые спо-

собствуют дальнейшей деградации хряща. Конечной стадией является апоптоз хондроцитов, смещающий баланс синтеза и катаболизма коллагена и протеогликанов в сторону катаболизма. Экспрессия коллагена II типа снижается во время роста хондроцитов, следовательно, зрелые хондроциты не способны производить коллаген II типа *de novo* [3, 5–7]. Ситуация усугубляется отсутствием кровоснабжения и низким уровнем метаболизма в хряще, что ведет к его ограниченной способности к самовосстановлению [8, 9].

Среди способов лечения ОА можно выделить симптоматическую терапию, заключающуюся в применении обезболивающих средств, а также радикальное хирургическое вмешательство [10, 11]. Однако применение таких методов не всегда приводит к нужным результатам [12]. Поэтому в последние годы проявляется большой интерес к разработке менее инвазивных, но более перспективных клеточных

технологий для восстановления структуры хрящевой ткани и лечения ОА.

Последние несколько десятилетий мезенхимальные стволовые клетки (МСК) находятся в центре внимания благодаря своему высокому терапевтическому потенциалу. Клеточная терапия МСК применяется для лечения различных заболеваний, в том числе и ОА, которым страдают 13% населения России старше 18 лет [13–16]. К преимуществам применения МСК можно отнести их высокий хондрогенный потенциал, широкую доступность источников для выделения (костный мозг, жировая ткань, пульпа молочного зуба, Вартонов студень, пуповина, а также то, что МСК не индуцируют иммунный ответ «трансплантат против хозяина» [17–22].

Хотя МСК и присутствуют во многих тканях, их общее количество в организме невелико, в то время как протоколы клеточной терапии обычно требуют сотен миллионов МСК на курс лечения, что требует дополнительного времени для их культивирования *in vitro*. Исследования показали, что время имплантации МСК обычно слишком короткое, чтобы оказать эффективное терапевтическое воздействие [22]. К тому же ряд исследований указывают на низкий процент (<1%) выживания МСК через неделю после их введения [23]. Это позволяет предположить, что основные эффекты МСК основаны на паракринных механизмах, опосредованных продуцированием и секрецией МСК широкого спектра цитокинов, хемокинов и факторов роста [24].

В связи с этим большой интерес вызывает применение бесклеточных препаратов на основе секретомы МСК – кондиционированных сред. На моделях *in vivo* было продемонстрировано, что кондиционированная среда от МСК из различных источников столь же эффективна, как и трансплантация соответствующих МСК [22]. Предполагается, что секретомы МСК сможет стимулировать внутренний регенераторный потенциал хряща благодаря секреции различных молекул, например, интерлейкина (IL)-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, фактора роста эндотелия сосудов (VEGF), простагландина E2 (PGE2), трансформирующего фактора роста (TGF- $\beta$ ) и других [25].

Заметим, что такой метод направлен не только на симптоматическое лечение или на замедление развития ОА, но самое главное – на восстановление структуры хрящевой ткани. Более того, преимуществом использования бесклеточных препаратов является иммуносовместимость, исключающая выбор доноров и реципиентов при терапии [26]. При этом МСК имеют разные характеристики в зависимости от происхождения, а идеальный источник МСК для использования при лечении ОА коленных суставов до сих пор не определен.

Целью работы являлось изучение влияния кондиционированной среды от МСК из различных источников на пролиферацию хондроцитов человека.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### Выделение клеток

Культуры МСК Вартонова студня пуповины и МСК пульпы молочного зуба (МСК ПМЗ) были получены из коллекции клеточных культур лаборатории клеточной биологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича». Хондроциты реберного хряща человека получены из коллекции клеточных культур ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр травматологии и ортопедии имени Н.Н. Приорова» Минздрава России. Источником МСК жировой ткани человека (ЖТч) была подкожная жировая клетчатка здорового донора, полученная при информированном добровольном согласии.

Фенотип клеток МСК ПМЗ, МСК ЖТч и МСК Вартонова студня был исследован на соответствие критериям мультипотентности методом проточной цитофлуориметрии в предыдущих исследованиях [27].

### Культивирование хондроцитов на тканеспецифическом матриксе

Для подтверждения способности формировать клеточно-инженерную конструкцию (КИК) хряща хондроциты человека культивировали на близком по составу к естественному ВКМ тканеспецифическом матриксе из децеллюляризованного хряща свиньи, полученном по ранее разработанной нами методике [28].

КИК хряща состояли из  $5 \times 10^5$  клеток и 5 мг матрикса. Матрикс заселяли клетками путем вращения в пробирках с культуральной средой на программируемом шейкере Multi Bio 3D (Biosan, Латвия). Первые 5 суток КИК культивировали в полной ростовой среде (ПРС), содержащей DMEM/F12 («ПанЭко», Россия) (1 : 1) с добавлением 10% фетальной сыворотки крупного рогатого скота (Cytiva, США), 1% антибиотика-антимикотика (Thermo Fisher Scientific, США) и 2 мМ L-глутамин («ПанЭко», Россия). Затем ПРС заменяли на хондрогенную дифференцировочную среду, содержащую DMEM High Glucose с добавкой GlutaMAX (Thermo Fisher Scientific, США), 10% ITS+ (Corning, США), 1% пируват натрия (Thermo Fisher Scientific, США), 0,25% L-аскорбат-2-фосфата (Sigma-Aldrich, США), 0,0001% дексаметазона (Merck, ФРГ), 0,002% TGF- $\beta$ 1 (Thermo Fisher Scientific, США) и 1% антибиотика-антимикотика (Thermo Fisher Scientific, США). Замену среды осуществляли каждые трое суток.



Оценку жизнеспособности клеток в составе КИК исследовали методом флуоресцентного окрашивания с применением красителя LIVE/DEAD (Thermo Fisher Scientific, США) и микроскопа Leica DMI8 Thunder (Leica Microsystems, ФРГ).

Морфологию КИК исследовали на 21-е сутки культивирования с применением гистологического окрашивания.

### **Получение кондиционированной среды**

МСК ЖТч, МСК ПМЗ, МСК Вартонова студня пуповины и хондроциты человека культивировали во флаконах 75 см<sup>2</sup>. Для эксперимента были использованы клетки третьего пассажа. Замену ПРС осуществляли раз в трое суток. Кондиционированную среду собирали на 10-е сутки культивирования (при достижении конfluenceности монослоя >70%) перед началом эксперимента и хранили при +4 °С. Степень конfluenceности монослоя клеток определяли визуально с применением инвертированного светового микроскопа Nikon Eclipse TS100 (Nikon, Япония).

### **Исследование пролиферации хондроцитов в 2D-культуре**

Для оценки влияния кондиционированных сред от различных типов МСК хондроциты культивировали в 24-луночных планшетах. Кондиционированную среду, разбавленную в соотношении 1 : 1 с ПРС, вносили в лунки с хондроцитами (3000 клеток на лунку). Прижизненное наблюдение за клетками и фотосъемку, а также определение степени конfluenceности монослоя хондроцитов выполняли с помощью системы прижизненного наблюдения за клетками и анализа динамических процессов в культуральной среде IncuCyte Zoom System (Essen BioScience, США). Контролем служила кондиционированная среда от хондроцитов, разбавленная в соотношении 1 : 1 с ПРС.

### **Сокультивирование хондроцитов и мезенхимальных стромальных клеток**

Влияние МСК на пролиферацию хондроцитов человека изучали при непрямом сокультивировании клеток в ПРС с использованием вставок Transwell с поликарбонатной мембраной для 24-луночных планшетов с размером пор 3 мкм (Corning, США). На дно нижней камеры наносили  $5 \times 10^4$  МСК. В верхнюю камеру помещали  $5 \times 10^4$  хондроцитов человека и 5 мг тканеспецифического матрикса из децеллюляризованного хряща свиньи. Контролем служили планшеты с Transwell, содержащие хондроциты в обеих камерах. Пролиферацию хондроцитов на 7-е и 14-е сутки оценивали путем количественного определения ДНК с применением флуоресцентного кра-

сителя Quant-iT Picogreen (Thermo Fisher Scientific, США).

### **Определение содержания ДНК**

ДНК выделяли с применением набора реагентов DNeasy Blood&Tissue Kit (QIAGEN, ФРГ) согласно инструкции, предложенной производителем. Для определения ДНК использовали набор Quant-iT Picogreen (Thermo Fisher Scientific, США) в соответствии с инструкцией производителя и планшетный ридер Spark 10M (Tecan Trading, Швейцария) при длине волны 520 нм.

### **Определение содержания IL-6 в кондиционированной среде**

В качестве маркера секреторной активности МСК в кондиционированной среде мы определяли содержание цитокина интерлейкина-6 (IL-6) методом твердофазного иммуноферментного анализа («Вектор-Бест», Россия). Метод основан на трехстадийном анализе с применением моно- и поликлональных антител к IL-6. Порядок проведения анализа рекомендован производителем в инструкции к набору. Для количественного определения концентрации IL-6 применяли планшетный ридер при длине волны 450 нм.

### **Гистологическое исследование**

Образцы фиксировали в 10% растворе формалина, промывали в проточной воде и обезжировали в спиртах восходящей концентрации, выдерживали в смеси этанола с хлороформом, затем в хлороформе и заливали в парафин. Срезы депарафинировали, регидратировали и окрашивали гематоксилином и эозином, альциановым синим и по методу Массона. Анализ и фотосъемку препаратов проводили с использованием инвертированного микроскопа Nikon Eclipse Ti (Nikon, Япония).

### **РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ**

Иммунофенотипический профиль экспрессии маркеров в клетках МСК ПМЗ, МСК ЖТч и МСК Вартонова студня был исследован нами в предыдущей работе и соответствовал критериям мультипотентности МСК, предъявляемым Международным обществом клеточной терапии (ISCT) [29]. Все первичные культуры характеризовались высокой экспрессией CD29, CD44, CD49b, CD73 и CD90, при этом экспрессии CD34, CD45 или HLA-DR не наблюдалось [27].

Окрашивание КИК флуоресцентным красителем LIVE/DEAD позволило определить значительную массу жизнеспособных хондроцитов на поверхности матрикса из децеллюляризованного хряща (рис. 1).

При культивировании хондроцитов в дифференцировочной среде в составе КИК хряща на 21-е сутки



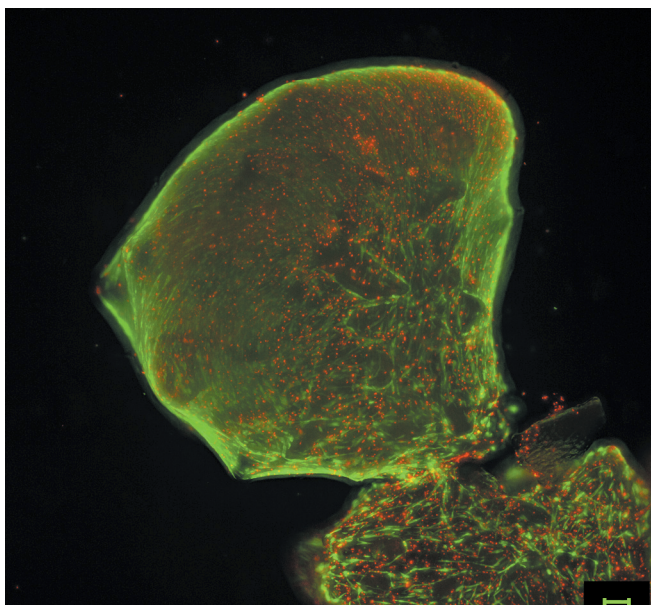


Рис. 1. Исследование жизнеспособности хондроцитов человека в КИК хряща на 21-е сутки культивирования. Окрашивание LIVE/DEAD. Размер масштабной линейки 100 мкм

Fig. 1. Examination of human chondrocyte viability in cartilage CEC at day 21 of culturing. LIVE/DEAD staining. Scale bar: 100  $\mu$ m

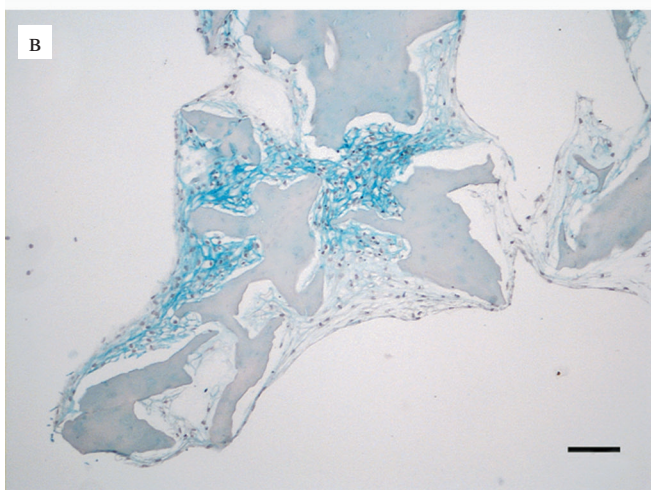
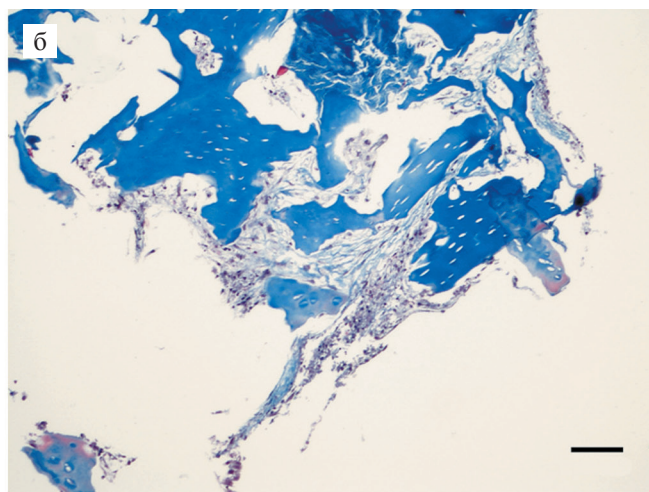
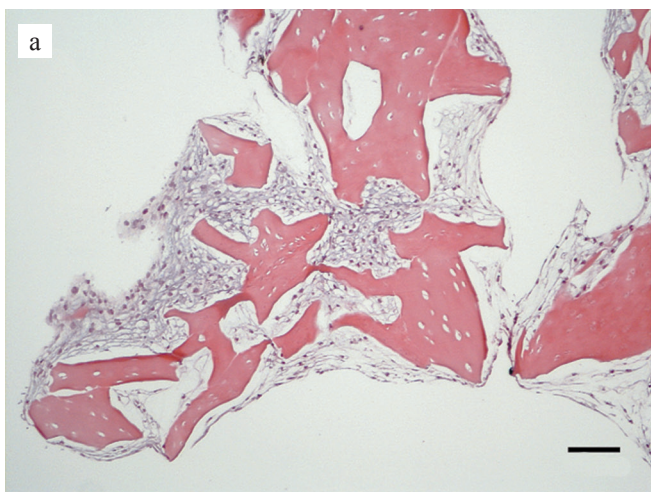


Рис. 2. Рост хондроцитов человека на тканеспецифическом матрице из децеллюляризованного хряща свиньи в хондрогенной культуральной среде на 21-е сутки культивирования: а – окрашивание гематоксилином и эозином; б – окрашивание по методу Массона; в – окрашивание альциановым синим. Размер масштабной линейки 100 мкм

Fig. 2. Growth of human chondrocytes on tissue-specific matrix from decellularized pig cartilage in a chondrogenic culture medium on day 21 of cultivation: а – H&E stain; б – Masson's trichrome stain; в – Alcian blue stain. Scale bar: 100  $\mu$ m

культивирования мы наблюдали образование крупных скоплений микрочастиц хряща, объединенных клетками – конгломератов (рис. 2). На поверхности всех микрочастиц хряща визуализировались клетки, при этом вся клеточная популяция характеризовалась полиморфностью. Так, на периферии можно было обнаружить фибробластоподобные клетки, тогда как в центральной зоне распространялись клетки округлой формы. Кроме того, клеточный рост сопровождался значительной наработкой ВКМ.

На 21-е сутки культивирования в образцах КИК при окрашивании по методу Массона можно было увидеть положительную реакцию на коллаген (рис. 2, б), при этом коллагеновые волокна распределялись равномерно по всему объему ВКМ. При окрашивании альциановым синим (рис. 2, в) ВКМ также имел положительную реакцию. Заметим, что часть клеток имела лакунообразную морфологию, типичную для хондроцитов.

Благодаря своим регенеративным свойствам секретом МСК рассматривается как перспективное средство лечения заболеваний суставного хряща [30]. При этом состав и действие кондиционированной среды от МСК будет различаться в зависимости от источника клеток, методов и условий их культивиро-



вания. В связи с этим мы сравнили влияние кондиционированной среды, полученной от МСК из различных источников, на рост культуры хондроцитов человека *in vitro*.

Изображения, полученные с применением системы прижизненной визуализации клеток, демонстрируют увеличение количества хондроцитов на культуральном пластике со временем. Спустя сутки культивирования количество клеток во всех образцах значимо не различалось. Как на 7-е, так и на 14-е сутки наблюдения в контрольном образце (ПРС, разбавленная 1 : 1 с кондиционированной средой от хондроцитов) можно было наблюдать снижение пролиферации в сравнении с образцами опытных групп.

Конфлюентность монослоя хондроцитов на 7-е сутки при культивировании в присутствии кондиционированной среды от МСК ПМЗ и МСК ЖТч превышала в 1,2 раза значение контрольного образца, а в присутствии кондиционированной среды от МСК Вартонова студня пуповины – в 1,4 раза. На 14-е сутки конфлюентность монослоя в опытных образцах превышала контроль в 1,2 раза (рис. 4).

В таблице представлены данные по влиянию паракринного действия МСК различного происхож-

дения на количественное содержание ДНК в КИК, состоящих из хондроцитов и тканеспецифического матрикса из децеллюляризованного хряща свиньи, при их непрямом сокультивировании в ячейках Transwell. На 7-е сутки меньше всего ДНК оказалось в образцах с кондиционированной средой от МСК ЖТч, при этом на 14-е сутки во всех образцах наблюдался рост клеток, и соответственно, повышение количества ДНК. При этом количество ДНК в образце с кондиционированной средой от МСК ЖТч значимо превышало контроль ( $p < 0,05$ ).

На 14-е сутки культивирования различия между образцами были незначительными, что может говорить об относительно одинаковом воздействии кондиционированной среды от различных МСК на пролиферацию хондроцитов в рамках данного эксперимента.

Многие исследовательские работы выявили фундаментальную роль секрета МСК как активного вещества, способного модулировать клеточные ответы и сигнальные пути, тем самым способствуя восстановлению тканей [31]. Одним из компонентов секрета МСК является IL-6 – многофункциональный цитокин, который является важным фактором

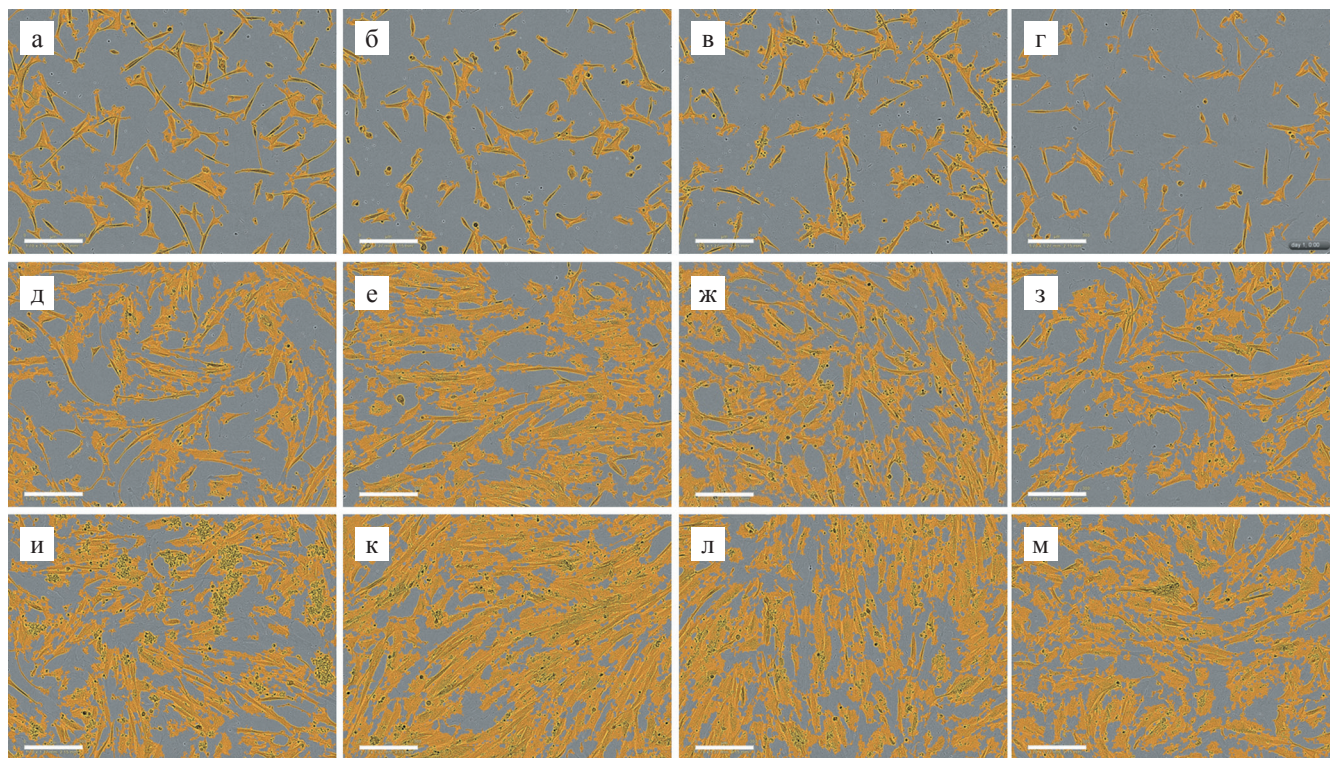


Рис. 3. Влияние кондиционированной среды на пролиферацию хондроцитов человека в 2D-культуре: а–г – 24 часа; д–з – 7 суток; и–м – 14 суток; а, д, и – кондиционированная среда от МСК ПМЗ; б, е, к – кондиционированная среда от МСК ЖТч; в, ж, л – кондиционированная среда от МСК Вартонова студня пуповины; г, з, м – кондиционированная среда от хондроцитов (контроль). Размер масштабной линейки 300 мкм

Fig. 3. Effect of conditioned medium on human chondrocyte proliferation in a 2D culture: а–г – 24 hours; д–з – day 7; и–м – day 14; а, д, и – conditioned medium of dental pulp MSCs; б, е, к – conditioned medium of AT-MSCs; в, ж, л – conditioned medium of umbilical cord-derived Wharton’s jelly MSCs; г, з, м – conditioned medium of chondrocytes (control). Scale bar: 300 μm

в различных физиологических процессах, включая иммунную регуляцию, гемопоэз и воспаление, а также модулирует пролиферацию, дифференцировку и апоптоз клеток [32].

Для выявления разницы в секреции цитокинов у МСК ПМЗ, МСК ЖТч и МСК Вартонова студня было проведено сравнение концентрации ИЛ-6 в кондиционированной среде на 1-е, 3-и и 6-е сутки культивирования. Так, на 3-и и 6-е сутки культивирования концентрация ИЛ-6 во всех образцах была почти в два раза больше (3-и сутки: МСК ПМЗ –  $3,89 \pm 0,31$  нг/мл, МСК ЖТч –  $26,99 \pm 1,22$  нг/мл, МСК Вартонова студня  $>70$  нг/мл; 6-е сутки:  $3,72 \pm 0,44$ ,  $22,08 \pm 3,71$  и  $>70$  нг/мл соответственно), чем на первые сутки культивирования ( $1,85 \pm 0,07$ ,  $16,94 \pm 0,68$  и  $>70$  нг/мл соответственно). Это подтверждает активную клеточную пролиферацию и секрецию активных факторов со временем.

Вероятно, разница во влиянии кондиционированной среды от МСК, выделенных из разных источников, на пролиферацию хондроцитов человека, а также разница в секреции ИЛ-6 опосредована исходным микроокружением (нишей) МСК. Стоит отметить, что МСК содержатся во многих тканях организма, но для лечения ОА широко изучаются лишь МСК из костного мозга и жировой ткани [12]. При этом количество МСК в костном мозге невелико, оно также снижается с возрастом донора, а процедура забора клеток достаточно травматична. В связи с этим начали появляться исследования по изучению альтернативных источников получения МСК, в том числе пульпы зуба и Вартонова студня пуповины. Было показано положительное влияние МСК, выделенных из Вартонова студня пуповины, на регенерацию поврежденного гиалинового хряща у свиней [33]. Nowzari et al. показали регенераторный

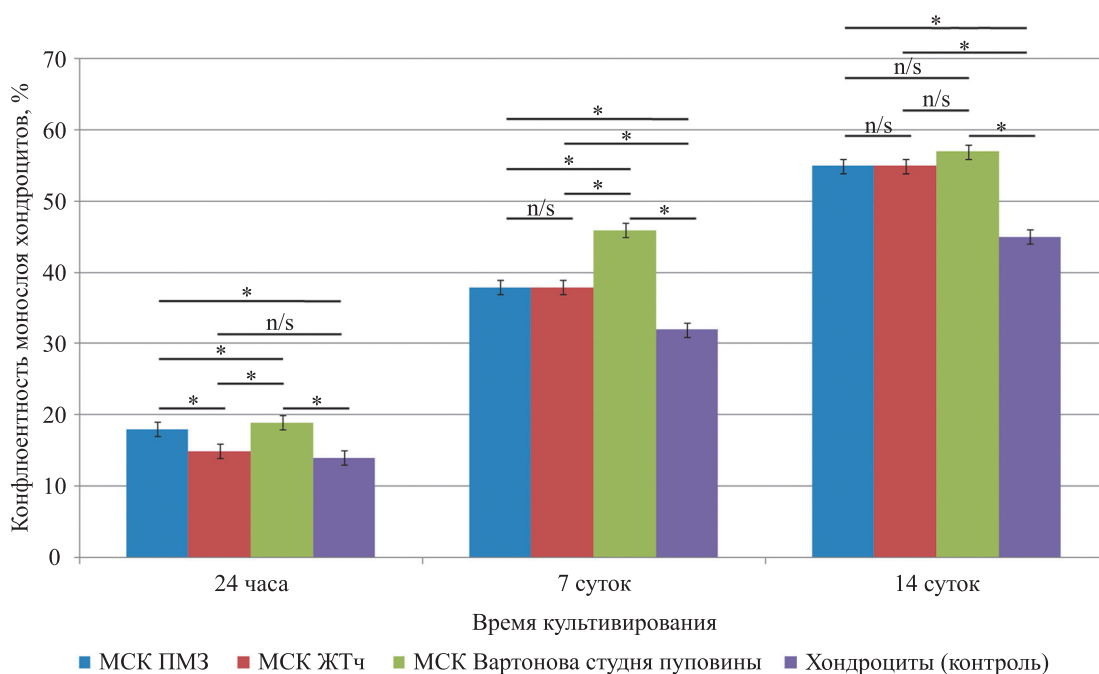


Рис. 4. Конфлюентность монослоя хондроцитов в присутствии кондиционированных сред от МСК из различных источников (n/s – нет статистически значимых различий; \* – есть различия при  $p < 0,05$ )

Fig. 4. Chondrocyte monolayer confluency in the presence of conditioned media from MSCs obtained from different sources (n/s – no statistically significant differences; \* – there are differences at  $p < 0.05$ )

Таблица

**Пролиферация хондроцитов на децеллюляризованном хряще свиньи на 7-е и 14-е сутки непрямого сокультивирования в Transwell с мезенхимальными стромальными клетками из различных источников**

**Proliferation of chondrocytes on decellularized porcine cartilage on days 7 and 14 of indirect co-culture in Transwell with mesenchymal stromal cells from various sources**

Время культивирования	ДНК, мкг/КИК			
	МСК ПМЗ	МСК ЖТч	МСК Вартонова студня пуповины	Хондроциты (контроль)
7 суток	$0,57 \pm 0,25$	$0,36 \pm 0,14$	$0,80 \pm 0,11$	$0,51 \pm 0,25$
14 суток	$1,20 \pm 0,09$	$1,34 \pm 0,15$	$1,24 \pm 0,27$	$0,90 \pm 0,26$



потенциал МСК пульпы зуба человека и их секрета на модели ОА, индуцированном коллагеназой, у крыс [34].

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, проведенные исследования по изучению влияния кондиционированной среды от МСК ЖТч, МСК ПМЗ и МСК Вартонова студня пуповины на пролиферацию хондроцитов человека в 2D-культуре указывают на возможный регенераторный потенциал МСК по восстановлению хрящевой ткани. В рамках данной работы мы не выявили достоверных различий в действии секрета МСК из различных источников на хондроциты при непрямом сокультивировании, однако в дальнейшем целесообразно проведение дополнительных исследований *in vivo*.

*Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда №s21-15-00251, <https://rscf.ru/project/21-15-00251/>.*

*Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.*

*The authors declare no conflict of interest.*

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. *Karateev AE, Lila AM. Osteoarthritis: современная клиническая концепция и некоторые перспективные терапевтические подходы. Научно-практическая ревматология. 2018; 56 (1): 70–81. Karateev AE, Lila AM. Osteoarthritis: current clinical concept and some promising therapeutic approaches. Rheumatology Science and Practice. 2018; 56 (1): 70–81. [In Russ, English abstract]. doi: 10.14412/1995-4484-2018-70-81.*
2. *Hunter DJ, Bierma-Zeinstra S. Osteoarthritis. The Lancet. 2019; 393 (10182): 1745–1759. doi: 10.1016/s0140-6736(19)30417-9. PMID: 31034380.*
3. *Giorgino R, Albano D, Fusco S, Peretti GM, Mangiavini L, Messina C. Knee osteoarthritis: epidemiology, pathogenesis, and mesenchymal stem cells: what else is new? An Update. Int J Mol Sci. 2023; 24 (7): 6405. doi: 10.3390/ijms24076405. PMID: 37047377.*
4. *Hsueh MF, Önerfjord P, Kraus VB. Biomarkers and proteomic analysis of osteoarthritis. Matrix Biol. 2014; 39: 56–66. doi: 10.1016/j.matbio.2014.08.012. PMID: 25179675.*
5. *Chow YY, Chin KY. The role of inflammation in the pathogenesis of osteoarthritis. Mediators Inflamm. 2020; 2020: 8293921. doi: 10.1155/2020/8293921. PMID: 32189997.*
6. *Aaron RK, Racine J, Dyke JP. Contribution of circulatory disturbances in subchondral bone to the pathophysiology of osteoarthritis. Curr Rheumatol Rep. 2017; 19 (8): 49. doi: 10.1007/s11926-017-0660-x. PMID: 28718064.*
7. *Sanchez C, Bay-Jensen AC, Pap T, Dvir-Ginzberg M, Quasnicka H, Barrett-Jolley R et al. Chondrocyte secretome: a source of novel insights and exploratory bio-*
8. *markers of osteoarthritis. Osteoarthritis Cartilage. 2017; 25 (8): 1199–1209. doi: 10.1016/j.joca.2017.02.797. PMID: 28232143.*
8. *Севастьянов ВИ, Духина ГА, Григорьев АМ, Перова НВ, Кирсанова ЛА, Скалецкий НН и др. Функциональная эффективность биомедицинского клеточного продукта для регенерации суставного хряща (экспериментальная модель остеоартроза). Вестник трансплантологии и искусственных органов. 2015; 17 (1): 86–96. Sevastianov VI, Dukhina GA, Grigoriev AM, Perova NV, Kirsanova LA, Skaletskiy NN et al. The functional effectiveness of a cell-engineered construct for the regeneration of articular cartilage. Russian Journal of Transplantology and Artificial Organs. 2015; 17 (1): 86–96. [In Russ, English abstract]. doi: 10.15825/1995-1191-2015-1-86-96.*
9. *Shariatzadeh M, Song J, Wilson S. The efficacy of different sources of mesenchymal stem cells for the treatment of knee osteoarthritis. Cell Tissue Res. 2019; 378 (3): 399–410. doi: 10.1007/s00441-019-03069-9. PMID: 31309317.*
10. *Roos EM, Arden NK. Strategies for the prevention of knee osteoarthritis. Nature Reviews Rheumatology. 2015; 12 (2): 92–101. doi: 10.1038/nrrheum.2015.135. PMID: 26439406.*
11. *Урясьев ОМ, Заигрова НК. Остеоартрит: патогенез, диагностика, лечение. Земский врач. 2016; 1–2 (29–30): 27–35. Urjas'ev OM, Zaigrova NK. Osteoarthritis: pathogenesis, diagnostika, lechenie. Zemskij vrach. 2016; 1–2 (29–30): 27–35.*
12. *Loo SJQ, Wong NK. Advantages and challenges of stem cell therapy for osteoarthritis (review). Biomed Rep. 2021; 15 (2): 67. doi: 10.3892/br.2021.1443. PMID: 34155451.*
13. *Murphy JM, Fink DJ, Hunziker EB, Barry FP. Stem cell therapy in a caprine model of osteoarthritis. Arthritis Rheum. 2003; 48 (12): 3464–3474. doi: 10.1002/art.11365. PMID: 14673997.*
14. *Garay-Mendoza D, Villarreal-Martínez L, Garza-Beddolla A, Pérez-Garza DM, Acosta-Olivo C, Vilchez-Cavazos F et al. The effect of intra-articular injection of autologous bone marrow stem cells on pain and knee function in patients with osteoarthritis. Int J Rheum Dis. 2018; 21 (1): 140–147. doi: 10.1111/1756-185X.13139. PMID: 28752679.*
15. *Desancé M, Contentin R, Bertoni L, Gomez-Leduc T, Branly T, Jacquet S et al. chondrogenic differentiation of defined equine mesenchymal stem cells derived from umbilical cord blood for use in cartilage repair therapy. Int J Mol Sci. 2018; 19 (2): 537. doi: 10.3390/ijms19020537. PMID: 29439436.*
16. *Галушко ЕА, Большакова ТЮ, Виноградова ИБ, Иванова ОН, Лесняк ОМ, Меньшикова ЛВ и др. Структура ревматических заболеваний среди взрослого населения России по данным эпидемиологического исследования (предварительные результаты). Научно-практическая ревматология. 2009; 47 (1): 11–17. Galushko EA, Bolshakova TYu, Vinogradova IB, Ivanova ON, Lesnyak OM, Menshikova LV et al. Structure of rheumatic diseases among adult population of Russia ac-*

- ording to data of an epidemiological study (preliminary results). *Rheumatology Science and Practice*. 2009; 47 (1): 11–17. [In Russ]. doi: 10.14412/1995-4484-2009-136.
17. De Bari C, Roelofs AJ. Stem cell-based therapeutic strategies for cartilage defects and osteoarthritis. *Curr Opin Pharmacol*. 2018; 40: 74–80. doi: 10.1016/j.coph.2018.03.009. PMID: 29625333.
  18. Басок ЮБ, Григорьев АМ, Курсанова ЛА, Кириллова АД, Суббот АМ, Цветкова АВ и др. Сравнительное исследование хондрогенеза мезенхимальных стромальных клеток жировой ткани человека при культивировании на коллагенсодержащих носителях в условиях *in vitro*. *Вестник трансплантологии и искусственных органов*. 2021; 23 (3): 90–100. Vasok YuB, Grigoryev AM, Kirsanova LA, Kirillova AD, Subbot AM, Tsvetkova AV et al. Comparative study of chondrogenesis of human adipose-derived mesenchymal stem cells when cultured in collagen-containing media under *in vitro* conditions. *Russian Journal of Transplantation and Artificial Organs*. 2021; 23 (3): 90–100. doi: 10.15825/1995-1191-2021-3-90-100.
  19. Gronthos S, Mankani M, Brahimi J, Robey PG, Shi S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) *in vitro* and *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2000; 97 (25): 13625–13630. doi: 10.1073/pnas.240309797. PMID: 11087820.
  20. Zhou C, Yang B, Tian Y, Jiao H, Zheng W, Wang J et al. Immunomodulatory effect of human umbilical cord Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells on lymphocytes. *Cell Immunol*. 2011; 272 (1): 33–38. doi: 10.1016/j.cellimm.2011.09.010. PMID: 22004796.
  21. Marmotti A, Mattia S, Castoldi F, Barbero A, Mangiavini L, Bonasia DE et al. Allogeneic umbilical cord-derived mesenchymal stem cells as a potential source for cartilage and bone regeneration: an *in vitro* study. *Stem Cells Int*. 2017; 2017: 1732094. doi: 10.1155/2017/1732094. PMID: 29358953.
  22. Vizoso FJ, Eiro N, Cid S, Schneider J, Perez-Fernandez R. Mesenchymal stem cell secretome: toward cell-free therapeutic strategies in regenerative medicine. *Int J Mol Sci*. 2017; 18 (9): 1852. doi: 10.3390/ijms18091852. PMID: 28841158.
  23. Parekkadan B, Milwid JM. Mesenchymal stem cells as therapeutics. *Annu Rev Biomed Eng*. 2010; 12: 87–117. doi: 10.1146/annurev-bioeng-070909-105309. PMID: 20415588.
  24. Maguire G. Stem cell therapy without the cells. *Commun Integr Biol*. 2013; 6 (6): e26631. doi: 10.4161/cib.26631. PMID: 24567776.
  25. Mancuso P, Raman S, Glynn A, Barry F, Murphy JM. Mesenchymal stem cell therapy for osteoarthritis: the critical role of the cell secretome. *Front Bioeng Biotechnol*. 2019; 7: 9. doi: 10.3389/fbioe.2019.00009. PMID: 30761298.
  26. Gunawardena TNA, Rahman MT, Abdullah BJJ, Kasim NHA. Conditioned media derived from mesenchymal stem cell cultures: The next generation for regenerative medicine. *J Tissue Eng Regen Med*. 2019; 13 (4): 569–586. doi: 10.1002/term.2806. PMID: 30644175.
  27. Tsvetkova AV, Vakhrushev IV, Basok YuB, Grigor'ev AM, Kirsanova LA, Lupatov AYU 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.
  28. Sevastianov VI, Basok YuB, Grigoriev AM, Nemets EA, Kirillova AD, Kirsanova LA et al. Decellularization of cartilage microparticles: Effects of temperature, supercritical carbon dioxide and ultrasound on biochemical, mechanical, and biological properties. *J Biomed Mater Res A*. 2023; 111 (4): 543–555. doi: 10.1002/jbm.a.37474. PMID: 36478378.
  29. 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.
  30. Rosochowicz MA, Lach MS, Richter M, Suchorska WM, Trzeciak T. Conditioned medium – is it an undervalued lab waste with the potential for osteoarthritis management? *Stem Cell Rev Rep*. 2023; 19 (5): 1185–1213. doi: 10.1007/s12015-023-10517-1. PMID: 36790694.
  31. Gangadaran P, Oh EJ, Rajendran RL, Oh JM, Kim HM, Kwak S et al. Three-dimensional culture conditioned bone marrow MSC secretome accelerates wound healing in a burn injury mouse model. *Biochem Biophys Res Commun*. 2023; 673: 87–95. doi: 10.1016/j.bbrc.2023.05.088. PMID: 37364390.
  32. Fan Y, Ye J, Shen F, Zhu Y, Yeghiazarians Y, Zhu W et al. Interleukin-6 stimulates circulating blood-derived endothelial progenitor cell angiogenesis *in vitro*. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2008; 28 (1): 90–98. doi: 10.1038/sj.jcbfm.9600509. PMID: 17519976.
  33. Wu KC, Chang YH, Liu HW, Ding DC. Transplanting human umbilical cord mesenchymal stem cells and hyaluronate hydrogel repairs cartilage of osteoarthritis in the minipig model. *Tzu Chi Med J*. 2019; 31 (1): 11–19. doi: 10.4103/tcmj.tcmj\_87\_18. PMID: 30692826.
  34. Nowzari F, Zare M, Tanideh N, Meimandi-Parizi A, Kavousi S, Saneian SM et al. Comparing the healing properties of intra-articular injection of human dental pulp stem cells and cell-free-secretome on induced knee osteoarthritis in male rats. *Tissue Cell*. 2023; 82: 102055. doi: 10.1016/j.tice.2023.102055. PMID: 36948080.

Статья поступила в редакцию 18.09.2023 г.  
The article was submitted to the journal on 18.09.2023