

DOI: 10.15825/1995-1191-2019-1-101-112

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОЦЕССА ХОНДРОГЕННОЙ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ РАЗНЫХ ИСТОЧНИКОВ

Ю.Б. Басок¹, А.М. Григорьев¹, Л.А. Курсанова¹, И.В. Вахрушев^{2, 3}, А.В. Цветкова², А.А. Грядунова^{3, 4}, К.Н. Ярыгин², В.И. Севастьянов¹

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

² ФГБНУ «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича», Москва, Российская Федерация

³ Лаборатория биотехнологических исследований «ЗД Биопринтинг Солюшенс», Москва, Российская Федерация

⁴ ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский университет), Москва, Российская Федерация

Введение. В качестве альтернативы аутохондротрансплантации рассматриваются варианты замены хондроцитов на мезенхимальные стромальные клетки (МСК), которые присутствуют во всех органах и тканях человеческого организма и обладают мультилинейным потенциалом дифференцировки. В ряде исследований показано, что способность к хондрогенной дифференцировке МСК из разных тканей различается, однако работы, посвященные данному вопросу, единичны и противоречивы. В соответствии с этическими принципами и технической простотой получения наиболее привлекательными для тканевой инженерии источниками МСК представляются жировая ткань, Вартонов студень пуповины (строма) и пульпа зуба. **Целью** настоящего исследования было сравнение хондрогенного потенциала МСК, выделенных из жировой ткани, Вартонова студня пуповины и пульпы молочного зуба человека, при культивировании в составе микросфер (пеллет). **Материалы и методы.** Фенотип первичных культур МСК исследовали методом проточной микроскопии. Хондрогенную дифференцировку проводили при 3D-культивировании в составе микросфер в присутствии TGFβ1 в течение двух недель при стандартных условиях. В качестве положительного контроля использовали хондробласты человека. Жизнеспособность клеток определяли методом флуоресцентного окрашивания. Морфологическое исследование проводили с использованием гистологических и иммуногистохимических методов окрашивания. **Результаты.** Культуры МСК из всех источников обладали сходным фенотипом CD29+, CD34-, CD44+, CD49b+, CD45-, CD73+, CD90+, HLADR. В составе микросфер визуализировались лишь единичные мертвые клетки в массе живых. Значительная продукция внеклеточного матрикса (ВКМ) отмечалась в микросферах из хондробластов и жировой ткани, тогда как в микросферах из МСК пульпы зуба и стромы пуповины выраженной наработки ВКМ не обнаружили. Среди МСК наибольшую наработку коллагена и гликозаминогликанов (ГАГ) в ВКМ наблюдали в микросферах из МСК жировой ткани, а наименьшую – в микросферах из МСК пульпы зуба. **Заключение.** Гистологический анализ всех микросфер через 14 суток культивирования в хондрогенной среде выявил признаки дифференцировки в хондрогенном направлении, прогрессивное увеличение продуцируемого клетками ВКМ и присутствие в нем общего коллагена и ГАГ. Из всех исследованных МСК наибольшим хондрогенным потенциалом *in vitro* (интенсивность наработки компонентов ВКМ) обладают МСК жировой ткани.

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

Для корреспонденции: Басок Юлия Борисовна. Адрес: 123182, Москва, ул. Щукинская, д. 1. Тел. (499) 193-86-62. E-mail: bjb2005@mail.ru

For correspondence: Basok Yulia Borisovna. Address: 1, Shchukinskaya str., Moscow, 123182, Russian Federation. Tel. (499) 193-86-62. E-mail: bjb2005@mail.ru

THE COMPARATIVE STUDY OF CHONDROGENIC DIFFERENTIATION OF MESENCHYMAL STROMAL CELLS ALLOCATED FROM DIFFERENT SOURCES

Yu.B. Basok¹, A.M. Grigoriev¹, L.A. Kirsanova¹, I.V. Vakhrushev^{2, 3}, A.V. Tsvetkova², A.A. Gryadunova^{3, 4}, K.N. Yarygin², V.I. Sevastianov¹

¹ V.I. Shumakov National Medical Research Center of Transplantology and Artificial Organs of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Moscow, Russian Federation

² V.N. Orekhovich Institute of Biomedical Chemistry, Moscow, Russian Federation

³ Private Institution Laboratory for Biotechnological Research «3D Bioprinting Solutions», Moscow, Russian Federation

⁴ I.M. Sechenov First Moscow State Medical University of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation (Sechenovsky University), Moscow, Russian Federation

Introduction. As an alternative to autochondral transplantation, variants of chondrocyte replacement with mesenchymal stromal cells (MSCs) were considered, since these cells are present in all organs and tissues of human body and possess multilinear potential for differentiation. A number of studies demonstrate that the ability for chondrogenic differentiation of MSCs from different tissues varies, however, those studies are few and controversial. In accordance with the ethical principles and the technical ease of obtaining, adipose tissue, Wharton's jelly (stroma) and dental pulp are the most attractive sources of MSCs for tissue engineering. **Aim:** to compare the chondrogenic potential of MSCs allocated from adipose tissue, Wharton's jelly of the umbilical cord, and human deciduous teeth pulp cultured in the composition of microspheres (pellets). **Materials and methods.** The phenotype of primary cultures of MSCs was studied via flow microscopy. Chondrogenic differentiation was performed with 3D-culture in microspheres in the presence of TGFβ1 for two weeks under standard conditions. Human chondroblasts were used as a positive control. Cell viability was determined by fluorescent staining. Morphological study was performed using histological and immunohistochemical staining methods. **Results.** Cultures of MSCs from all sources had similar phenotypes CD29+, CD34–, CD44+, CD49b+, CD45–, CD73+, CD90+, HLADR. In the mass of living cells in microspheres only singular dead cells were visualized. A significant production of extracellular matrix (ECM) was observed in the chondroblast and adipose tissue microspheres, whereas in the microspheres of dental pulp and umbilical cord stroma derived MSCs, no significant ECM was detected. Among the MSCs, the highest production of collagen and glycosaminoglycans (GAG) in the ECM was observed in the microspheres of adipose tissue-derived MSCs, and the lowest production – in the microspheres of dental pulp-derived MSCs. **Conclusion.** A histological analysis of all microspheres after 14 days of culturing in the chondrogenic medium revealed the signs of differentiation in the chondrogenic direction, a progressive increase of the ECM produced by cells, and the presence of total collagen and GAG in it. Of all the MSCs studied, the greatest chondrogenic potential *in vitro* (the intensity of development of ECM components) is possessed by the adipose tissue-derived MSCs.

Key words: mesenchymal stromal cells, chondrogenic differentiation, cartilage tissue, tissue engineering.

ВВЕДЕНИЕ

Тканевая инженерия – это перспективная область биотехнологии, направленная на восстановление, замену и коррекцию функциональных свойств поврежденных биологических тканей за счет использования комбинации клеток, биологически активных молекул и синтетических или природных биорезорбируемых матриц [1]. Различные органы и ткани представляют собой объекты исследования в биоинженерии, среди которых большой прогресс наблюдается в создании тканевых эквивалентов хряща, где технологии перешли в область клинического применения, высокая востребованность которого обусловлена низкой способностью хрящевой ткани к восстановлению [2].

В последнее время для лечения дефектов хрящевой ткани суставов разработан ряд биомедицинских клеточных продуктов, представляющих собой либо суспензию, как правило, аутологичных хондроцитов, либо клеточно-инженерные/тканеинженерные конструкции (КИК/ТИК), состоящие из аутологичных хондроцитов на биodeградируемом носителе разнообразной природы [3, 4]. Отметим, что метод аутохондротрансплантации имеет ряд недостатков, основные из которых – травматичность биопсии здорового участка хряща и сложность наращивания изолированных хондроцитов взрослых людей в необходимых количествах [5]. В связи с этим в качестве альтернативы данному методу были рассмотрены варианты замены хондроцитов на мезенхимальные

стромальные клетки (МСК), которые присутствуют во всех органах и тканях человеческого организма и обладают мультилинейным потенциалом дифференцировки. В ряде исследований показано, что способность к хондрогенной дифференцировке МСК из разных тканей различается, однако работ, посвященных данному вопросу, мало, и результаты, описанные разными коллективами, расходятся [6]. Одним из перспективных источников МСК благодаря простоте технологии выделения, достаточному выходу клеток и минимальной травматичности для пациента является жировая ткань. Заметим, что МСК Вартонова студня пуповины и пульпы молочного зуба также являются привлекательными для тканевой инженерии, так как их получение не включает инвазивных процедур забора материала и не связано с этическими ограничениями, учитывая что пуповина и удаленные зубы рассматриваются как биологические отходы.

Культивирование клеток в составе трехмерных микросфер (пеллет) с высокой плотностью клеток является стандартным методом исследования хондрогенеза [7]. Подобные культуры использовали для изучения взаимодействия хондроцитов и МСК при сокультивировании, влияния факторов роста на дифференцировку МСК и концентрации O_2 на редифференцировку человеческих хондроцитов [8–10]. Отметим, что микросферы также успешно используются в клинике при лечении дефектов суставного хряща [10].

Целью настоящего исследования было сравнение хондрогенного потенциала МСК, выделенных из жировой ткани, Вартонова студня пуповины и пульпы молочного зуба человека, при культивировании в составе микросфер.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

1. Объекты исследования

1.1. Получение первичных культур МСК

Для выделения МСК пульпы зуба использовали молочные зубы детей, полученные в результате естественного выпадения. Материал отмывали в растворе Хенкса с добавлением культурального антибиотика-антимикотика (Gibco, США). После вскрытия коронки пульпу извлекали, измельчали, а затем инкубировали 1 ч в 0,1% растворе коллагеназы I типа (Gibco, США) при 37 °С.

МСК Вартонова студня пуповины получали из пуповины человека после нормальных родов на 39–40-й неделе гестации. Материал отмывали в растворе Хенкса с добавлением культурального антибиотика-антимикотика (Gibco, США). Ткань измельчали ножницами до получения однородной массы, состоящей из фрагментов объемом $\sim 1 \text{ мм}^3$, после чего инкубировали 1 ч в 0,1% растворе коллагеназы I типа (Gibco, США) при 37 °С.

Источником МСК ЖТ была подкожная жировая клетчатка здорового донора. Образец подкожной жировой ткани подвергали двукратной промывке холодным (+4...+6 °С) раствором, а затем инкубировали в 0,1% растворе коллагеназы I типа (Gibco, США) при 37 °С в течение 20 мин.

В качестве положительного контроля были использованы хондробласты из фрагментов хряща реберных дуг человека, полученные в процессе хирургических вмешательств при информационном согласии пациента. Материал отмывали в растворе Хенкса с добавлением культурального антибиотика-антимикотика (Gibco, США). Ткань измельчали ножницами до получения однородной массы, состоящей из фрагментов объемом $\sim 1 \text{ мм}^3$, после чего инкубировали в 0,1% растворе коллагеназы I типа (Gibco, США) при 37 °С в течение 12 ч.

Все клетки осаждали центрифугированием, ресуспендировали в ростовой среде (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 (все перечисленные реактивы – Gibco, США) и культивировали до формирования монослоя, меняя среду 2 раза в неделю. Перевод клеток в суспензию осуществляли путем инкубации в 0,25% растворе трипсина в смеси с раствором Версена (1:1) при 37 °С в течение 5 мин. В эксперименте использовали клетки 3-го пассажа.

1.2. Хондрогенная дифференцировка

Клетки в состоянии конфлюэнтного слоя смывали с пластика последовательной обработкой раствором Версена и диссоциирующим агентом TrypLe (Gibco, США). Диссоциирующий агент нейтрализовали добавлением полной ростовой среды в соотношении 3:1. Клеточную суспензию центрифугировали 15 мин при 260 g. Надосадочную жидкость сливали, а клеточный сгусток ресуспендировали в заданном количестве хондрогенной дифференцировочной среды (DMEM HG добавкой GlutaMAX™ (Gibco, США), содержащей 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- β 1 (PeproTech, США) и 1% культурального антибиотика-антимикотика (Gibco, США) для получения суспензии с рабочей концентрацией 1×10^6 клеток/мл. В каждую лунку конической формы 96-луночного культурального планшета (Corning, США) помещали 200 мкл суспензии клеток, после чего планшет центрифугировали при 500 g в течение 5 мин. Далее планшет помещали в CO_2 -инкубатор при стандартных условиях (5% CO_2 , 37 °С). Замену культуральной среды в лунках производили ежедневно.

2. Методы исследования

2.1. Проточная цитофлуориметрия

Фенотип клеток полученных первичных культур МСК исследовали методом проточной цитофлуориметрии. Для этого были использованы моноклональные антитела против поверхностных антигенов, конъюгированные с флуоресцеин изотиоцианатом (FITC), аллофикоцианином (APC) или фикоэритрином (PE) (Beckton Dickinson, США). Клетки переводили в суспензию и инкубировали в фосфатно-солевом буфере с добавлением 1% фетальной сыворотки крупного рогатого скота, содержащем моноклональные антитела в разведении 1:100, в течение 1 ч. По окончании клетки отмывали буфером в трех циклах осаждения с последующим ресуспендированием, а затем помещали в фиксирующий раствор CytoFix (Beckton Dickinson, США). Исследование выполняли на проточном цитофлуориметре-сортере FACS Aria III (Beckton Dickinson, США). Полученные данные обрабатывали с помощью программы FlowJo.

2.2. Флуоресцентная микроскопия

Для оценки жизнеспособности клеток на 10-й день культивирования в хондрогенной дифференцировочной среде микросферы окрашивали комплексом флуоресцентных красителей LIVE/DEAD® (Invitrogen, США). Данный комплекс включает в себя два компонента: calcein AM дает зеленую флуоресценцию живых клеток, регистрируемую при длине волны 515 нм, ethidium homodimer-1, проникая через поврежденную мембрану клеток и связываясь с ДНК, дает красную флуоресценцию при 635 нм. Микросферы окрашивали и инкубировали в течение 30 мин в темноте при 37 °С. Далее микросферы помещали на предметное стекло в капле рабочего раствора красителей и изучали с помощью инвертированного микроскопа Nikon Ti.

2.3. Гистологические и иммуногистохимические методы исследования образцов

Микросферы фиксировали в 10-процентном забуференном 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.

Срезы окрашивали гематоксилином Майера, промывали в проточной воде, ополаскивали дистилли-

рованной водой и окрашивали 1% раствором эозина. Ополаскивали дистиллированной водой, обезвоживали в этаноле с восходящими концентрациями (70, 80, 96%), просветляли в карбол-ксилоле, ксилоле и заключали в бальзам.

Для приготовления раствора альцианового синего (Sigma, США) 1 г красителя растворяли в 100 мл 3% уксусной кислоты. Раствор фильтровали и наносили на депарафинированные и регидратированные срезы, после чего промывали в дистиллированной воде и докрашивали гематоксилином. Стекла со срезами выдерживали в проточной воде, обезвоживали в спиртах восходящих концентраций, ксилоле и заключали в бальзам.

Депарафинированные, регидратированные срезы окрашивали железным гематоксилином Вейгерта, промывали водой 15 мин и окрашивали кислым фуксином, после чего срезы быстро ополаскивали дистиллированной водой и помещали в 1% раствор фосфорновольфрамовой кислоты на 10 мин. Раствор кислоты сливали, не ополаскивая срезы в воде, и помещали стекла в раствор анилинового синего. Затем срезы ополаскивали водопроводной водой и дифференцировали в 1% растворе уксусной кислоты в течение 10 мин. Проводили обезвоживание в спиртах восходящих концентраций, просветляли в ксилоле и заключали в бальзам.

Для визуализации в микросферах коллагена II типа использовали Novocastra™ Concentrated Peroxidase Detection System (RE7130-K, Leica Microsystems), следуя протоколу, рекомендованному производителем. Препараты подвергали процедуре ретривизации – нагретые срезы инкубировали при 37 °С с теплым раствором трипсина в течение 30 мин.

После промывки срезов деионизированной водой в течение 10 мин проводили нейтрализацию эндогенной пероксидазы, используя Novocastra™ Peroxidase Block (RE7101, Leica Microsystems). Затем применяли Novocastra™ Protein Block (RE7102, Leica Microsystems) для сокращения неспецифического связывания первичных и вторичных антител. Впоследствии срезы инкубировали 1 ч с оптимально разведенными первичными антителами к коллагену II типа (NCL-COLL-IIp, Novocastra™, Leica Microsystems) и 30 мин с Novocastra™ Concentrated Bionylated Secondary Antibodies (RE7108, Leica Microsystems) – связанные с биотином вторичные антитела. Затем срезы инкубировали 30 мин с Novocastra™ Concentrated Streptavidin-HRP (RE7109, Leica Microsystems) – стрептавидин-пероксидазное соединение, которое связывается с биотином, присутствующим на антителах. В дальнейшем срезы инкубировали со свежим окрашивающим субстратом DAB (substrate/chromogen, 3,3'-diaminobenzidine), который готовили из Novocastra™ DAB Chromogen (RE7105, Leica Microsystems) и Novocastra™ Substrate

Buffer (RE7106, Leica Microsystems). После инкубации с Novocastra™ Peroxidase Block, Novocastra™ Protein Block, первичными антителами, вторичными антителами и Novocastra™ Concentrated Streptavidin-HRP срезы каждый раз дважды промывали в течение 5 мин раствором трис-буфера 0,5 М рН = 7,6 (Sigma, США). Затем срезы промывали дистиллированной водой, докрашивали Novocastra™ Hematoxylin (RE7107, Leica Microsystems), проводили по спиртам с восходящими концентрациями (70, 80, 90, 96,

100% этанола), инкубировали с ксилолом и заливали в канадский бальзам.

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

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

1. Характеристика первичных культур

На рис. 1 представлены микрофотографии выделенных первичных культур МСК различного про-

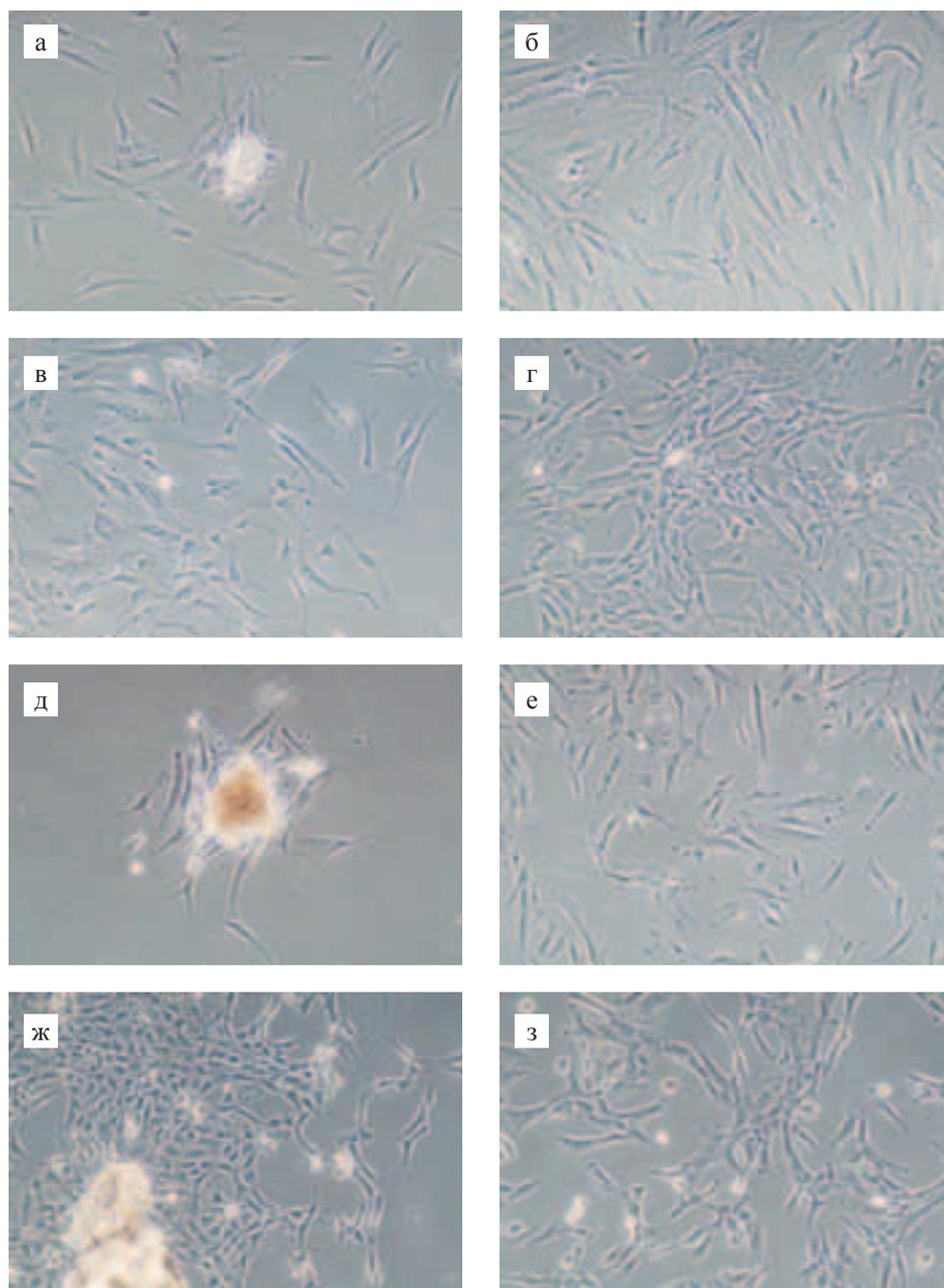


Рис. 1. Полученные первичные культуры МСК жировой ткани (а, б); МСК стромы пуповины (в, г); МСК пульпы молочного зуба (д, е) и хондробластов человека (ж, з); а, в, д, ж – нулевой пассаж; б, г, е, з – второй пассаж. Фазово-контрастная микроскопия. $\times 100$

Fig. 1. The obtained primary cultures of adipose tissue MSC (a, б); umbilical cord stroma MSC (в, г); deciduous teeth pulp MSC (д, е) and human chondroblasts (ж, з); а, в, д, ж – zero passage; б, г, е, з – second passage. Phase-contrast microscopy. $\times 100$

исхождения, а также хондробластов человека на различных сроках культивирования. На начальном этапе во флаконах наблюдались единичные отдельно лежащие клетки, прикрепившиеся к поверхности культурального пластика. Впоследствии они давали начало колониям, которые затем сливались и образовывали монослой. Полученные культуры МСК представляли собой морфологически гомогенную популяцию одноядерных клеток преимущественно веретеновидной формы. Хондробласты обладали характерной фибробластоподобной морфологией и отличались множеством плотных межклеточных контактов. Во всех культурах наблюдалось значительное количество делящихся клеток.

2. Профиль экспрессии поверхностных маркеров

Полученные культуры МСК жировой ткани, пульпы молочного зуба и стромы пуповины были исследованы на предмет экспрессии поверхностных маркеров стволовых и прогениторных клеток CD29, CD34, CD44, CD45, CD49b, CD73, CD90 и HLA-DR

методом проточной цитофлуориметрии. Экспрессия маркеров гемопоэтических стволовых клеток CD34, CD45 и HLA-DR в изучаемых культурах не наблюдалась. В то же время был отмечен высокий уровень экспрессии CD44 (рецептор гиалуроновой кислоты), CD73 (5'-нуклеотидаза), CD90 (антиген дифференцировки тимоцитов 1), а также CD49b и CD29 ($\alpha 2$ и $\beta 1$ субъединицы интегрин VLA-2 соответственно). Большинство из этих макромолекул включены в список маркеров, рекомендуемых Международным обществом клеточной терапии для характеристики культур МСК [12]. Таким образом, было показано, что культуры МСК из всех источников обладали сходным фенотипом CD29+ CD34- CD44+ CD49b+ CD45- CD73+ CD90+ HLADR-, что свидетельствовало о высоком содержании мультипотентных клеток мезенхимального происхождения.

3. Жизнеспособность клеток

Жизнеспособность клеток в составе микросфер исследовали на десятый день культивирования, используя комплекс флуоресцентных красителей LIVE/DEAD® (Invitrogen, США) (рис. 2).

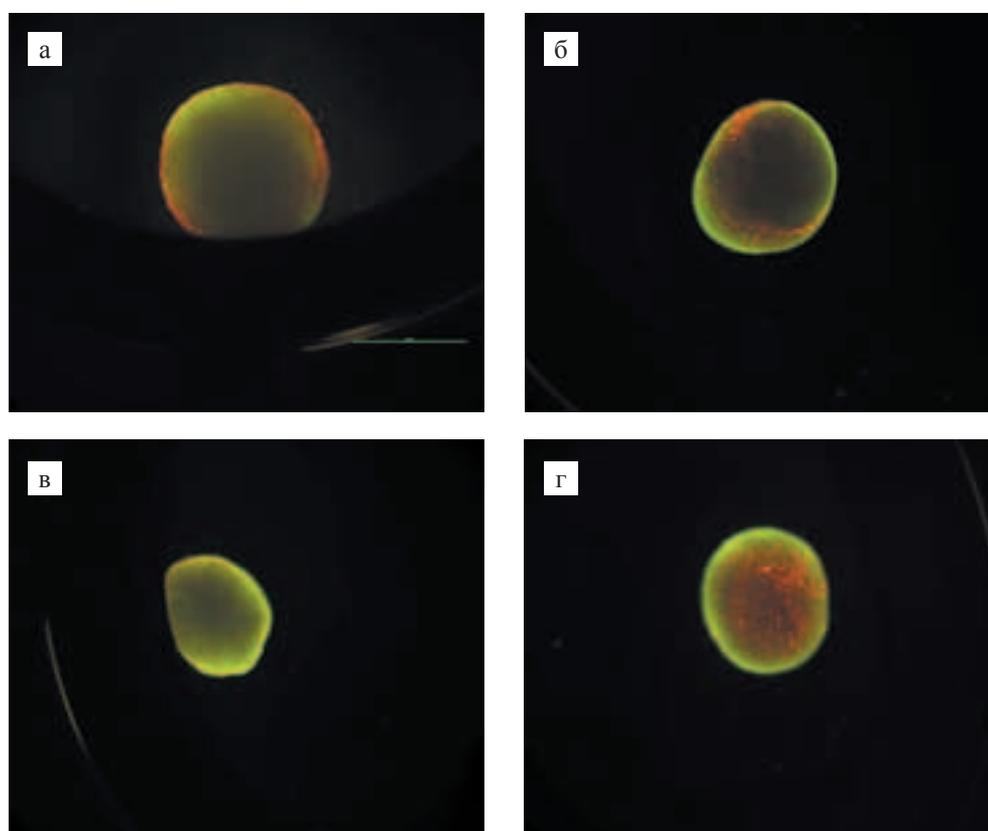


Рис. 2. Микрофотография поверхности микросфер, образованных МСК жировой ткани (а), МСК Вартонова студня пуповины (б), МСК пульпы зуба (в) и хондробластами (г) человека, при культивировании в хондрогенной дифференцировочной среде в течение 10 дней. Окрашивание флуоресцентными красителями Live/Dead (Invitrogen, США). $\times 40$. Размер масштабной линейки 1000 мкм

Fig. 2. Microphotograph of the microspheres surface formed by MSC of adipose tissue (a), MSC of the Wharton's jelly (б), MSC of the tooth pulp (в) and human chondroblasts (г) cultured in a chondrogenic differentiating medium for 10 days. Staining with fluorescent dyes Live/Dead (Invitrogen, USA). $\times 40$. A bar indicates dimension scale 1000 μm

Доля мертвых клеток, локализованных преимущественно в центральной части, была небольшой – на фотографиях они видны в виде единичных красных точек на зеленом фоне.

4. Гистологическое исследование

Гистологическое исследование позволило выявить различия в морфологии микросфер, полученных из разных типов клеток (рис. 3).

При окрашивании гематоксилином и эозином микросфер, образованных хондробластами, отчетливо выделяли 2 зоны: плотная периферическая и рыхлая центральная. На периферии микросфер, полученных из хондробластов, выявили слой, образованный фибробластоподобными клетками. В середине микросфер наблюдали полиморфизм клеточной популяции. В основном преобладали клетки с лакунообразным строением – молодые хондрциты. Однако в центральной части такой картины

нет – фибробластоподобные клетки сформировали рыхлую сеть с низким содержанием внеклеточного матрикса (ВКМ).

В структуре микросфер, образованных МСК ЖТч, также можно было выделить несколько зон. Поверхностная зона довольно плотная и сформирована гетерогенной клеточной популяцией. Здесь обнаруживали типичные фибробласты, фибробластоподобные клетки, а также клетки меньших размеров с округлыми ядрами. Далее располагалась зона, менее богатая клетками и с выраженной наработкой ВКМ. Затем следует сетчатая зона, образованная рыхло лежащими фибробластоподобными клетками. Центральная часть микросфер была более плотной, образованной полиморфной клеточной популяцией.

В микросферах из МСК Вартонова студня пуповины зональность отсутствовала, что выделяло их среди других образцов. В довольно однородном клеточном составе преобладали фибробластоподобные

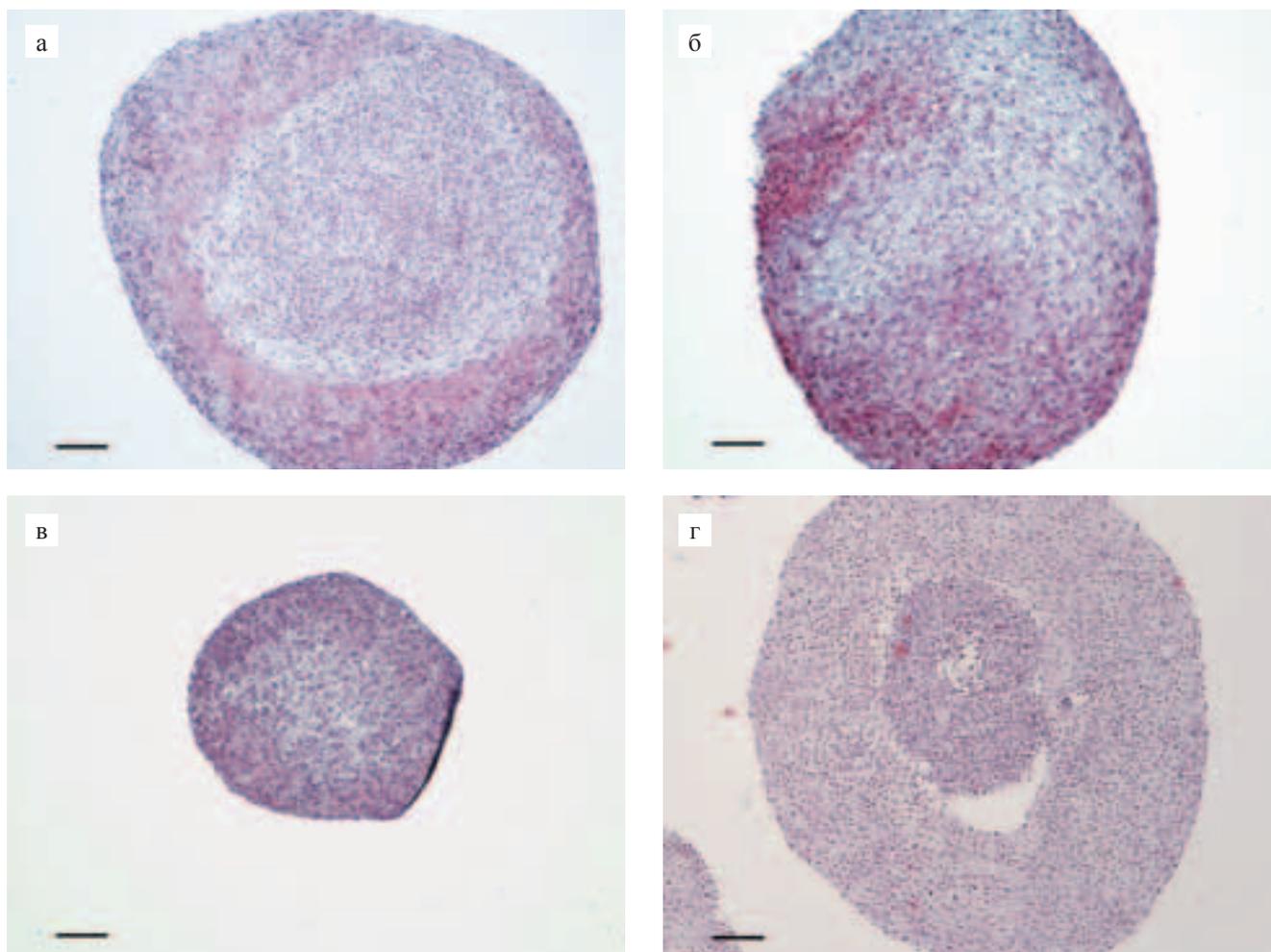


Рис. 3. Морфология микросфер, образованных МСК жировой ткани (а), МСК Вартонова студня пуповины (б), МСК пульпы зуба (в) и хондробластами (г) человека, при культивировании в хондрогенной дифференцировочной среде в течение 14 дней. Окрашивание гематоксилином и эозином. $\times 100$. Размер масштабной линейки 100 мкм

Fig. 3. The morphology of microspheres formed by MSC of adipose tissue (a), MSC of the Wharton's jelly (б), MSC of the tooth pulp (в) and human chondroblasts (г) cultured in chondrogenic differentiation medium for 14 days. Hematoxylin and eosin staining. $\times 100$. A bar indicates 100 μm

клетки, тяжи которых формировали основную массу структуры микросфер. Кроме того, выявляются небольшие участки, представленные полиморфной клеточной популяцией.

Интересно, что размер пеллет, образованных МСК пульпы зуба, был значительно меньше остальных образцов. Микросферы имели довольно плотную структуру без четкого обособления зон, однако центральная часть выглядит более рыхлой, чем периферическая. В центральной зоне обнаруживается гетерогенная клеточная популяция. В периферической зоне – гетерогенная клеточная популяция с некоторым преобладанием фибробластоподобных клеток.

Отметим, что периферия всех микросфер была окружена тонким слоем типичных фибробластов.

Радиальную неоднородность можно связать с неэффективной диффузией метаболитов внутрь пеллет, обуславливающую дефицит питательных веществ и

дифференциальных факторов. Пространственно равномерное распределение специфичного ВКМ можно обеспечить путем уменьшения размера пеллет [13]. Babur et al. показали, что агрегация 166 хондроцитов человека приводит к равномерной редифференцировке [9]. В качестве альтернативного способа обеспечения однородности структуры клеточного пласта можно рассматривать культивирование клеток на матриксе (скаффолде, каркасе), позволяющем реплицировать нативную архитектуру ткани в условиях *in vitro* [1]. Кроме того, однородной наработке ВКМ способствует культивирование КИК в перфузионных биореакторах за счет улучшения снабжения клеток питательными веществами и газами, а также более эффективного выведения продуктов метаболизма [14]. Заметим, что несмотря на отсутствие структурной гомогенности, выращенные *in vitro* микросферы из 2×10^5 аутологических хондроцитов успешно

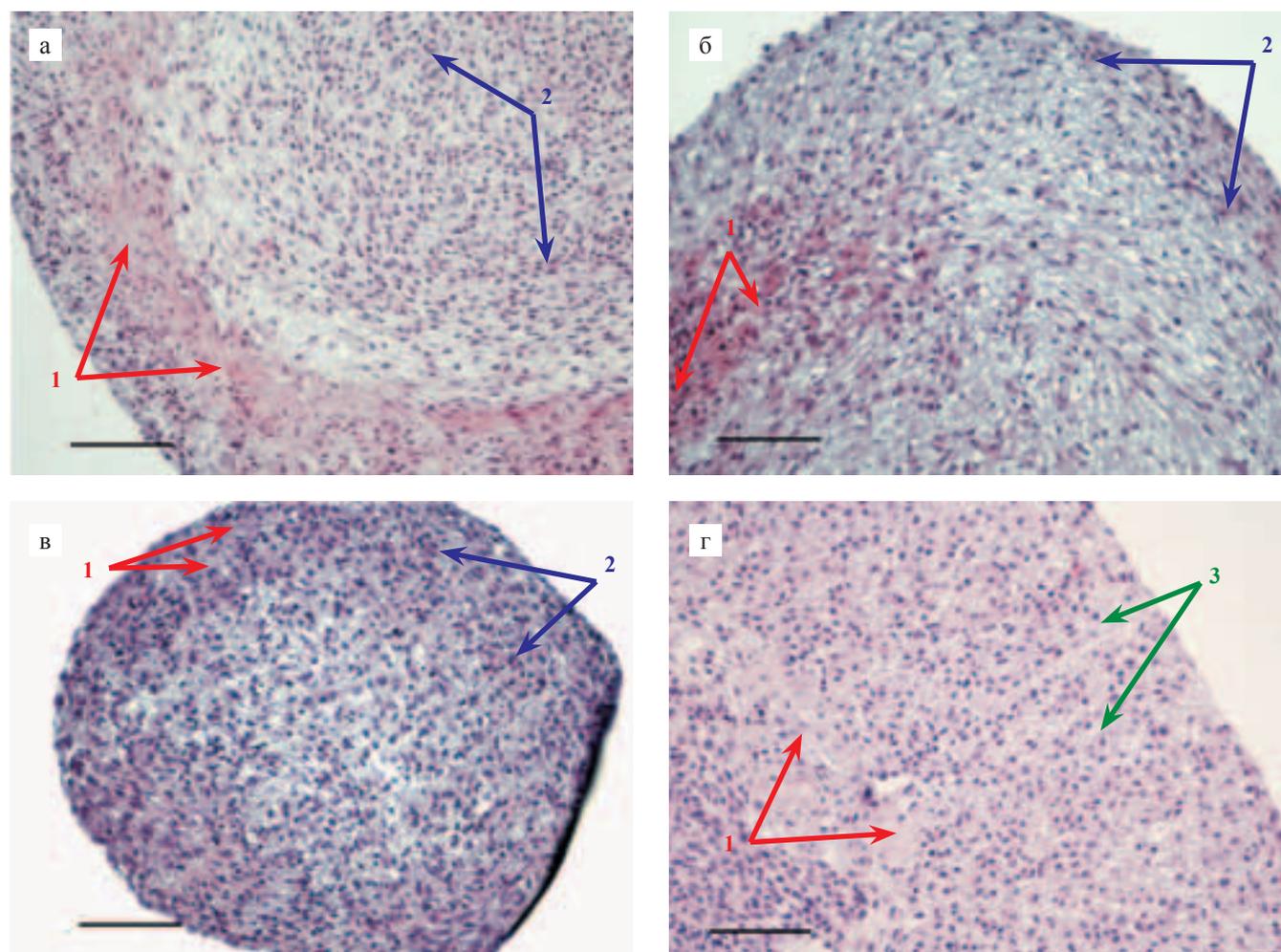


Рис. 4. Морфология микросфер, образованных МСК жировой ткани (а), МСК Вартонова студия пуповины (б), МСК пульпы зуба (в) и хондробластами (г) человека, при культивировании в хондрогенной дифференцировочной среде в течение 14 дней: 1 – ВКМ; 2 – клетки; 3 – хондроциты (клетки с лакунообразным строением). Окрасивание гематоксином и эозином. $\times 200$. Размер масштабной линейки 100 мкм

Fig. 4. The morphology of microspheres formed by MSC of adipose tissue (a), MSC of the Wharton's jelly (б), MSC of the tooth pulp (в) and human chondroblasts (г) cultured in chondrogenic differentiation medium for 14 days: 1 – ECM; 2 – cells; 3 – chondrocytes (cells with lacuna-like structure). Hematoxylin and eosin staining. $\times 200$. A bar indicates 100 μm

применялись при лечении повреждений коленного сустава в клинике [15]. Shimizu et al. наблюдали восстановление коленного сустава у крыс при введении в остеохондральный дефект микросфер из 8×10^5 недифференцированных адипоцитов [16]. Тем не менее можно предположить, что достижение однородности распределения ВКМ позволит повысить качество тканевого эквивалента для имплантации пациенту.

Как видно на рис. 4, к 14-м суткам культивирования в хондрогенной дифференцировочной среде во всех микросферах наблюдали наработку ВКМ, особенно выраженную в случае хондробластов.

При этом в микросферах, образованных хондробластами, наблюдали участки, в которых доля наработанного ВКМ выше доли клеток, и клетки с лакунообразным строением – молодые хондрциты.

Значительная наработка ВКМ наблюдалась также в микросферах из МСК жировой ткани. В микросферах, образованных МСК пульпы зуба и Вартонова студня пуповины, выраженной наработки ВКМ не обнаружили.

При окраске по Массону на коллаген в микросферах, образованных МСК жировой ткани, ВКМ дал положительную окраску (рис. 5).

Коллагеновые волокна также отчетливо выявлялись на периферии микросфер, образованных хондробластами и МСК пуповины. В случае МСК пульпы зуба окрашивание было умеренно выражено.

Положительное окрашивание всех образцов альциановым синим свидетельствует о наработке ГАГ клетками, вступившими в дифференцировку в хондрогенном направлении (рис. 6).

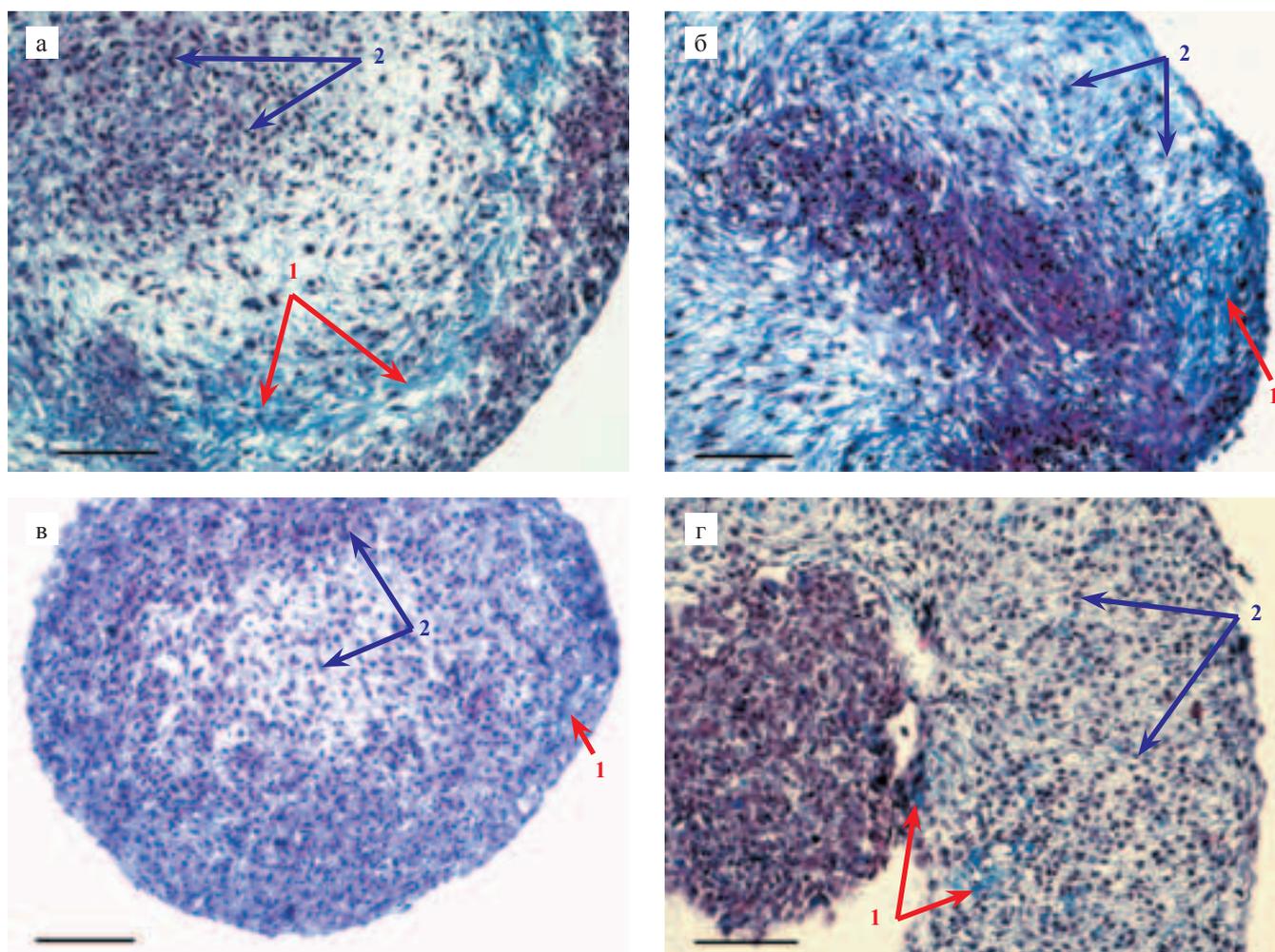


Рис. 5. Гистологическая картина микросфер при культивировании в хондрогенной дифференцировочной среде в течение 14 дней. Коллагеновые волокна в ВКМ: а – микросферы, образованные МСК жировой ткани; б – микросферы, образованные МСК Вартонова студня пуповины; в – микросферы, образованные МСК пульпы зуба; г – микросферы, образованные хондробластами человека; 1 – ВКМ; 2 – клетки. Окрашивание по методу Массона. $\times 200$. Размер масштабной линейки 100 мкм

Fig. 5. The histological pattern of microspheres cultured in chondrogenic differentiation medium for 14 days. Collagen fibers in ECM: а – microspheres formed by MSC of adipose tissue; б – microspheres formed by MSC of the Wharton's jelly; в – microspheres formed by MSC of the tooth pulp; г – microspheres formed by chondroblasts; 1 – ECM; 2 – cells. Masson's staining. $\times 200$. A bar indicates 100 μm

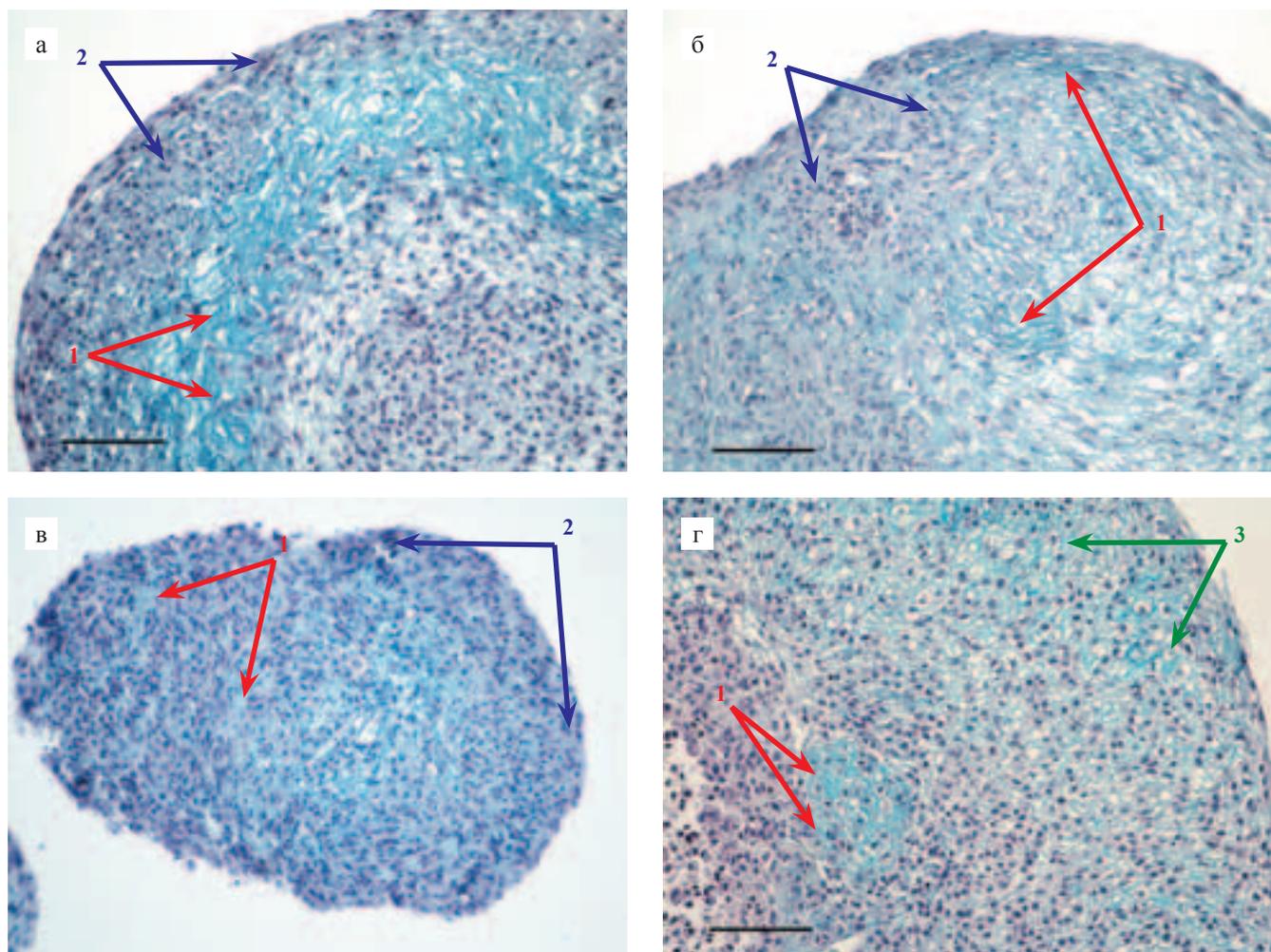


Рис. 6. Гистологическая картина микросфер при культивировании в хондрогенной дифференцировочной среде в течение 14 дней: а – микросферы, образованные МСК жировой ткани; б – микросферы, образованные МСК Вартонова студня пуповины; в – микросферы, образованные МСК пульпы зуба; г – микросферы, образованные хондробластами человека; 1 – ВКМ; 2 – клетки; 3 – хондроциты (клетки с лакунообразным строением). Позитивное окрашивание ВКМ альциановым синим. ×200. Размер масштабной линейки 100 мкм

Fig. 6. The histological pattern of microspheres cultured in chondrogenic differentiation medium for 14 days: а – microspheres formed by MSC of adipose tissue; б – microspheres formed by MSC of the Wharton’s jelly; в – microspheres formed by MSC of the tooth pulp; г – microspheres formed by chondroblasts; 1 – ECM; 2 – cells; 3 – chondrocytes (cells with lacuna-like structure). Positive staining of ECM with alcian blue. ×200. A bar indicates 100 μm

Наибольшая интенсивность окраски визуализировалась в микросферах, образованных хондробластами. Заметим, что среди МСК наиболее интенсивное окрашивание наблюдали в ВКМ микросфер из МСК жировой ткани, а наименее выраженное – в микросферах на основе пульпы зуба. Вероятно, разница хондрогенного потенциала МСК связана с различием исходной организменной ниши клеток. Интересно, что в клинике чаще всего применяют МСК костного мозга (КМ), что связано со сложной и инвазивной процедурой забора клеток и ограниченными возможностями для обеспечения необходимого при лечении количества клеток [17]. Более того, дифференцировочный потенциал МСК КМ снижается с возрастом донора [17]. В связи с этим интерес исследователей привлекли перспективные альтернативные источ-

ники МСК: жировая ткань, пульпа молочного зуба, строма пуповина. Недавно было показано, что МСК пуповины лошади обладают высокой способностью к формированию хряща при культивировании на коллагенсодержащем матриксе, чем МСК КМ [18]. Shafiee et al. наблюдали большую наработку ГАГ, коллагенов I и II типов в ВКМ микросфер из МСК жировой ткани человека по сравнению с микросферами из МСК КМ [5]. Fernandes et al. отмечали высокий хондрогенный потенциал МСК пульпы зуба, заселенных в коллагенсодержащий матриксе, при имплантации в поврежденный коленный сустав минипигов, а Westin et al. – при культивировании МСК пульпы зуба на пористых хитозан-ксантановых матриксах в условиях *in vitro* [19, 20].

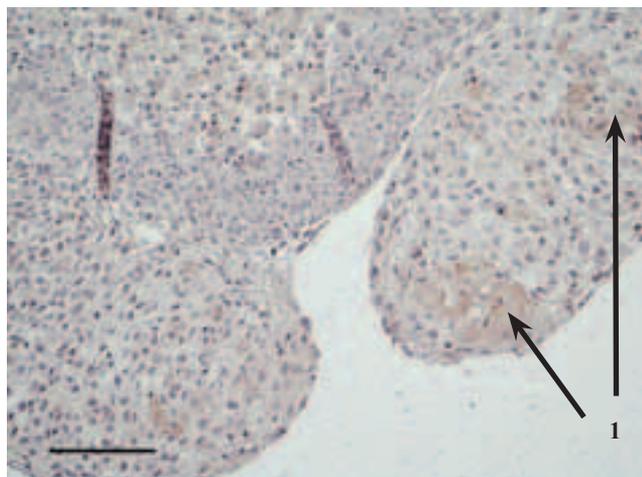


Рис. 7. Позитивное окрашивание коллагена II типа в ВКМ микросфер, образованных хондробластами. 1 – участки ВКМ, содержащие коллаген II типа. $\times 200$. Размер масштабной линейки 100 мкм

Fig. 7. Positive staining of type II collagen in ECM of microspheres formed by chondroblasts. 1 – areas of ECM containing collagen type II. $\times 200$. A bar indicates 100 μm

Исследования, предполагающего сравнение потенциала к хондрогенной дифференцировке МСК из трех источников, ранее не проводили. Имеющиеся литературные данные не дают возможность установить оптимальный источник МСК для создания КИК хряща как в качестве самостоятельного продукта для регенерации поврежденной ткани, так и для формирования ТИК хряща. Существующие конструкции КИК и ТИК хряща различаются природой матрикса, количеством внесенных клеток и условиями культивирования.

5. Иммуногистохимическое исследование

При иммуногистохимическом исследовании лишь в положительном контроле – микросферах из хондробластов к 14-м суткам были видны участки, окрашенные в рыже-коричневый цвет, указывающий на наработку в микросферах коллагена II типа, характерного для ВКМ гиалинового хряща (рис. 7).

Для микросфер из МСК образования коллагена II типа в аналогичных условиях эксперимента выявлено не было.

Вероятно, дифференцировка МСК в хондрогенном направлении, сопровождающаяся наработкой коллагена II типа, идет медленнее редифференцировки хондробластов и проявляется на более поздних сроках культивирования. Отметим, что образование коллагена II типа хондробластами происходит позднее синтеза протеогликанов, накопление которых в ВКМ проявилось во всех исследованных сферах из МСК [21].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, гистологический анализ исследованных микросфер через 14 дней культивирования в

хондрогенной среде выявил признаки дифференцировки в хондрогенном направлении, прогрессивное увеличение продуцируемого клетками ВКМ и присутствие в нем общего коллагена и ГАГ. По хондрогенному потенциалу (интенсивность наработки компонентов ВКМ) *in vitro* среди исследованных типов микросфер МСК к микросферам из хондробластов, используемых в качестве положительного контроля, наиболее близки микросферы МСК жировой ткани.

Работа выполнена частично при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 16-29-07322).

The study was partly supported by the Russian Foundation for Basic Research, grant No. 16-29-07322.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

The authors declare no conflict of interest.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Caddeo S, Boffito M, Sartori S. Tissue Engineering Approaches in the Design of Healthy and Pathological *in vitro* Tissue Models. *Front Bioeng Biotechnol.* 2017; 5: 40. doi: 10.3389/fbioe.2017.00040.
2. Kristjánsson B, Honsawek S. Mesenchymal stem cells for cartilage regeneration in osteoarthritis. *World J Orthop.* 2017; 8 (9): 674–680. doi: 10.5312/wjo.v8.i9.674.
3. 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.
4. Surguchenko VA, Ponomareva AS, Kirsanova LA, Skaleckij NN, Sevastianov VI. The cell-engineered construct of cartilage on the basis of biopolymer hydrogel matrix and human adipose tissue-derived mesenchymal stromal

- cells (*in vitro* study). *J Biomed Mater Res. Part A*. 2015; 103A (2): 463–470. doi: 10.1002/jbm.a.35197.
5. Shafiee A, Kabiri M, Langroudi L, Soleimani M, Ai J. Evaluation and comparison of the *in vitro* characteristics and chondrogenic capacity of four adult stem/progenitor cells for cartilage cell-based repair. *J Biomed Mater Res A*. 2016; 104 (3): 600–610. doi: 10.1002/jbm.a.35603.
 6. Kohli N, Wright KT, Sammons RL, Jeys L, Snow M, Johnson WE. An *in vitro* Comparison of the Incorporation, Growth, and Chondrogenic Potential of Human Bone Marrow versus Adipose Tissue Mesenchymal Stem Cells in Clinically Relevant Cell Scaffolds Used for Cartilage Repair. *Cartilage*. 2015; 6 (4): 252–263. doi: 10.1177/1947603515589650.
 7. Ullah M, Hamouda H, Stich S, Sittinger M, Ringe J. A reliable protocol for the isolation of viable, chondrogenically differentiated human mesenchymal stem cells from high-density pellet cultures. *Biores Open Access*. 2012; 1 (6): 297–305. doi: 10.1089/biores.2012.0279.
 8. Huang L, Yi L, Zhang C, He Y, Zhou L, Liu Y et al. Synergistic Effects of FGF-18 and TGF- β 3 on the Chondrogenesis of Human Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells in the Pellet Culture. *Stem Cells Int*. 2018; 2018: 7139485. doi: 10.1155/2018/7139485.
 9. Babur BK, Ghanavi P, Levett P, Lott WB, Klein T, Cooper-White JJ et al. The interplay between chondrocyte redifferentiation pellet size and oxygen concentration. *PLoS One*. 2013; 8 (3): e58865. doi: 10.1371/journal.pone.0058865.
 10. Huang S, Song X, Li T, Xiao J, Chen Y, Gong X et al. Pellet coculture of osteoarthritic chondrocytes and infrapatellar fat pad-derived mesenchymal stem cells with chitosan/hyaluronic acid nanoparticles promotes chondrogenic differentiation. *Stem Cell Res Ther*. 2017; 8 (1): 264. doi: 10.1186/s13287-017-0719-7.
 11. Fickert S, Gerwien P, Helmert B, Schattenberg T, Weckbach S, Kaszkin-Bettag M, Lehmann L. One-Year Clinical and Radiological Results of a Prospective, Investigator-Initiated Trial Examining a Novel, Purely Autologous 3-Dimensional Autologous Chondrocyte Transplantation Product in the Knee. *Cartilage*. 2012; 3 (1): 27–42. doi: 10.1177/1947603511417616.
 12. 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.
 13. Lewis MC, MacArthur BD, Tare RS, Oreffo RO, Pleasance CP. Extracellular Matrix Deposition in Engineered Micromass Cartilage Pellet Cultures: Measurements and Modelling. *PLoS One*. 2016; 11 (2): e0147302. doi: 10.1371/journal.pone.0147302.
 14. 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.
 15. Körsmeier K, Claßen T, Kamminga M, Rekowski J, Jäger M, Landgraeber S. Arthroscopic three-dimensional autologous chondrocyte transplantation using spheroids for the treatment of full-thickness cartilage defects of the hip joint. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*. 2016; 24 (6): 2032–2037. doi: 10.1007/s00167-014-3293-x.
 16. Shimizu M, Matsumoto T, Kikuta S, Ohtaki M, Kano K, Taniguchi H et al. Transplantation of dedifferentiated fat cell-derived micromass pellets contributed to cartilage repair in the rat osteochondral defect model. *J Orthop Sci*. 2018; 23 (4): 688–696. doi: 10.1016/j.jos.2018.03.001.
 17. Zajdel A, Kalucka M, Kokoszka-Mikolaj E, Wilczok A. Osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells from adipose tissue and Wharton's jelly of the umbilical cord. *Acta Biochim Pol*. 2017; 64 (2): 365–369. doi: 10.18388/abp.2016_1488.
 18. White JL, Walker NJ, Hu JC, Borjesson D, Athanasiou KA. A comparison of bone marrow and cord blood mesenchymal stem cells for cartilage self-assembly. *Tissue Eng Part A*. 2018; 24 (15–16): 1262–1272. doi: 10.1089/ten.TEA.2017.0424.
 19. Westin CB, Trinca RB, Zuliani C, Coimbra IB, Moraes ÂM. Differentiation of dental pulp stem cells into chondrocytes upon culture on porous chitosan-xanthan scaffolds in the presence of kartogenin. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2017; 80: 594–602. doi: 10.1016/j.msec.2017.07.005.
 20. Fernandes TL, Shimomura K, Asperti A, Pinheiro CCG, Caetano HVA, Oliveira CRGCM et al. Development of a Novel Large Animal Model to Evaluate Human Dental Pulp Stem Cells for Articular Cartilage Treatment. *Stem Cell Rev*. 2018; 14 (5): 734–743. doi: 10.1007/s12015-018-9820-2.
 21. Вавилова ТП. Биохимия тканей и жидкостей полостей рта: учебное пособие. М.: ГЭОТАР Медиа, 2008: 208. Vavilova TP. Biohimija tkanej i zhidkostej polostej rta: uchebnoe posobie. M.: GJeOTAR Media, 2008: 208.

Статья поступила в редакцию 31.01.2019 г.
The article was submitted to the journal on 31.01.2019