

УДК 57.085.23, 57.089.67

**СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ФОРМИРОВАНИЯ ХОНДРОСФЕР ИЗ РАЗНЫХ ИСТОЧНИКОВ ДЛЯ РАЗРАБОТКИ ТЕСТ-СИСТЕМЫ IN VITRO СКРИНИНГА ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ**

Закопайко Б.А., Александрова С.А.

*Санкт-Петербургский государственный университет  
Институт цитологии РАН***COMPARATIVE ANALYSIS OF CHONDROSPHERES FROM DIFFERENT SOURCES FOR THE DEVELOPMENT OF AN IN VITRO TEST SYSTEM FOR DRUG SCREENING**

Zakopayko B.A., Aleksandrova S.A.

*St. Petersburg University  
Institute of Cytology RAS***Аннотация**

С целью создания тест-системы in vitro для оценки биобезопасности и эффективности фармакологических веществ, предназначенных для восстановления поврежденной хрящевой ткани, был проведен сравнительный анализ ряда диплоидных клеточных культур стромальной природы человека и кролика на способность к формированию сфероидов и хондрогенной дифференцировке. Определены клеточные культуры, проявившие наилучшие характеристики.

**Ключевые слова:** клеточный сфероид, хондрогенная дифференцировка, тест-системы, клеточные технологии.

**Abstract**

In order to create an in vitro test system for assessing the biosafety and effectiveness of pharmacological substances for the restoration of damaged cartilage tissue, a comparative analysis of a number of diploid human and rabbit stromal cell cultures was carried out for the ability to form spheroids and chondrogenic differentiation. The cell cultures that exhibited the best characteristics were identified.

**Keywords:** cell spheroid, chondrogenic differentiation, test systems, cell technologies.

**Ссылка для цитирования:** Закопайко Б.А., Александрова С.А. Сравнительный анализ формирования хондросфер из разных источников для разработки тест-системы in vitro скрининга лекарственных средств // Бюллетень инновационных технологий. – 2024. – Т. 8. – № 1(29). – С. 64-69. – EDN DHJGBE.

**Введение**

Повреждения и заболевания хрящевой ткани приводят к значительному снижению качества жизни [1]. Процесс разрушения суставного хряща считается практически необратимым, так как во взрослом возрасте способность в регенерации значительно утрачивается. Тем не менее, в мире разрабатываются новые лекарственные средства, которые могут повлиять на восстановление хрящевой ткани. Для продвижения ускорения этого процесса активно используются клеточные технологии путем создания тест-систем in vitro. Такие тест-системы позволяют в короткие сроки, в отличие от

исследований на животных, провести первичный скрининг фармакологических веществ-кандидатов и показать реакцию определенного типа клеток на воздействие вещества.

Источниками клеток хондрогенной природы могут быть клетки, непосредственно полученные из фрагментов хрящевой ткани (хондробласты, хондроциты), или мезенхимные стволовые клетки (МСК), дифференцированные в хондрогенном направлении специфическими индукторами in vitro. В обоих случаях необходимым условием для стимуляции и поддержания дифференци-

ровки в хондроциты является культивирование клеток в 3D условиях, в виде так называемых сфероидов (хондросфер).

Культивирование в 3D условиях в отличие от монослойного, отличается рядом качественных преимуществ, таких как - обеспечение условий, приближенных к *in vivo*, улучшение жизнеспособности и пролиферации клеток, сохранение фенотипических свойств клеточной линии и более длительное сохранение мультипотентных свойств МСК [2]. 3D структура обеспечивается за счет внеклеточного матрикса, который существенно влияет на внутриклеточную передачу сигналов, диффузию растворенных веществ, связывание ростовых факторов и т.д. Кроме того, он служит скаффолдом для расположения клеток в пространстве, а содержащиеся в его составе различные каркасные белки и ростовые факторы направляют дифференцировку клеток [3]. Трехмерное культивирование широко применяется в целом ряде разделов клеточной биологии, таких как фундаментальные исследования формирования клеточных сфероидов, межклеточных и матрикс-клетка взаимодействий; прикладные исследования в области регенеративных технологий, скрининга лекарственных средств; исследования опухолевых клеток и др. [3].

В настоящее время под конкретную задачу возможно выбрать подходящий метод формирования клеточных сфероидов из целого спектра технологий [4]. Для хондрогенной дифференцировки МСК чаще всего применяют методы - висячая капля (Hanging Drop), пеллетное культивирование

(Pellet culture) и жидкостное наложение (Liquid Overlay) [2, 4]. Каждый из методов имеет свои преимущества и недостатки. Так, при использовании метода пеллетного культивирования возможно получать сфероиды заданного размера, однако этот метод имеет проблемы, связанные с невозможностью визуализации клеток в течение реального времени за счет культивирования их в центрифужных пробирках [4-7]. Метод жидкостного наложения, основанный на использовании неадгезивной посуды, напротив, позволяет при помощи конфокальной микроскопии контролировать процесс сборки клеточных сфероидов, однако спонтанное образование сфероидов в толще питательной среды часто приводит к получению сфероидов разного количества и размеров [4, 7].

В настоящее время разработаны методы оценки способности отдельных клеточных культур к хондрогенной дифференцировке *in vitro* [8-11], а также влияния различных веществ на хондрогенную дифференцировку МСК перед их тестированием на животных [12, 13]. Тем не менее, существует необходимость в совершенствовании методов формирования хондросфер, которые можно будет применять для разработки клеточных тест-систем.

Целью настоящей работы являлось проведение сравнительного анализа динамики формирования хондросфер в 3D условиях *in vitro* у ряда диплоидных клеточных культур МСК и хондроцитов человека и кролика.

Таблица 1.

Клеточные линии/культуры, используемые в исследовании

Условное обозначение	Описание
<i>Клеточные культуры человека:</i>	
<i>- МСК</i>	
№1 чМСК	Мультипотентные мезенхимные стромальные клетки костного мозга взрослого человека
№ 12 FetMSC	Мультипотентные мезенхимные стромальные клетки костного мозга 5-6 недельного эмбриона (клеточная линия)
<i>- хондроциты</i>	
№5 чХЦ	Хондроциты взрослого человека 1
№11 чХЦ	Хондроциты взрослого человека 2
<i>Клеточные культуры кролика:</i>	
<i>- МСК</i>	
№ 6 кМСК	Мультипотентные мезенхимные стромальные клетки костного мозга новорожденного кролика, пассаж 8
№9 кМСК	Мультипотентные мезенхимные стромальные клетки костного мозга новорожденного кролика, пассаж 4
№10 кМСК	Мультипотентные мезенхимные стромальные клетки костного мозга новорожденного кролика, пассаж 1
<i>- хондроциты</i>	
№2 кХЦ	Хондроциты новорожденного кролика 1
№3 кХЦ	Хондроциты новорожденного кролика 2

### Материалы и методы

В исследовании был использован набор диплоидных клеточных линий/культур, полученных авторами самостоятельно или в ЦКП «Коллекция культур клеток позвоночных» ИИЦ РАН (табл.1).

Клетки культивировали на стандартных флаконах для адгезионных культур с добавлением полной питательной среды DMEM/F12 и 10% эмбриональной сыворотки (Gibco) в CO<sub>2</sub>-инкубаторе при температуре 37 °C и поддержании CO<sub>2</sub> на уровне 5%. Для формирования хондросфер клетки открепляли от поверхности флаконов. Клеточную суспензию центрифугировали (5 мин при 1000 об/мин) и отбирали супернатант и доводили до концентрации 10 млн/мл. Отбирали 10 мкл (до 100 тыс. клеток) и аккуратно раскапывали в центр лунок 96-луночного неадгезивного планшета (Nunc clone sphere). Планшет помещали в CO<sub>2</sub>-инкубатор и оставляли на 1,5-2 ч. Далее к сформированным каплям аккуратно добавляли индукционную среду по 200 мкл таким образом, чтобы предотвратить разрушение структуры протосфероидов. Для хондрогенной дифференцировки использовали коммерческий набор StemPro® Chondrogenesis Differentiation Kit (Gibco). В качестве контроля - полную питательную среду.

Культивирование сфероидов проводили в течение трех-четырех недель. В процессе формирования и динамики изменения структуры хондросфер проводили визуальный каждый образец с использованием инвертированного микроскопа Nikon Eclipse TS100 с фотофиксацией раз в 7 сут. После фотофиксации проводили смену среды. Полученные изображения обрабатывали в программе Image J 1.48, с помощью которой вычисляли основные морфометрические параметры сфероидов – площадь и степень округлости. В программе "Excel" строили графики зависимости параметров от длительности культивирования. Основные этапы методики представлены на рисунке 1.

### Результаты и обсуждение

Согласно приведенному выше методу, провели трех-мерное культивирование МСК

и хондроцитов человека и кролика. Была изучена динамика формирования хондросфер в течение четырех недель. Благодаря ограниченному объему капель (10 мкл) и высокой концентрации клеток возникновение клеточных контактов и начало формирования хондросфер происходило в течение первых двух часов с начала культивирования. Далее, в течение первой недели культивирования происходило формирование полноценных округлых сфероидов. В течение всего срока культивирования наблюдалось видимое уменьшение площади сфероидов. Такое же уменьшение площади для МСК и хондроцитов человека наблюдали исследовали в похожем исследовании [8].

Сфероиды в дифференцировочной среде формировались более плотными и с большей степенью округлости, чем в контрольной (Рис. 2, 3). Было отмечено, что в течение всего срока культивирования сфероиды в контрольной среде либо подвергались разрушению внешних клеточных слоев с выделением внутреннего ядра сфероидов, либо более интенсивно снижали показатель видимой площади сфероидов в сравнении с начальным показателем площади. При этом площадь сфероидов в хондрогенной среде снижалась менее интенсивно в сравнении с начальным показателем площади сфероидов. Это может свидетельствовать о более интенсивном формировании сфероидов в первые дни культивирования в дифференцировочной среде и поддержанию сформированной формы за счет наработки внеклеточного матрикса клетками.

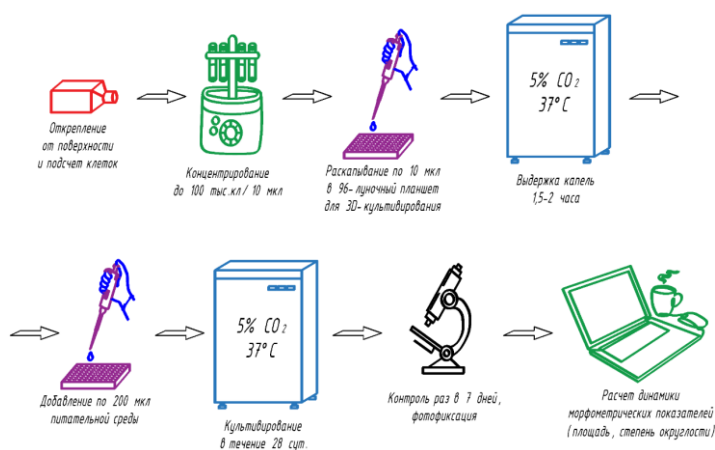
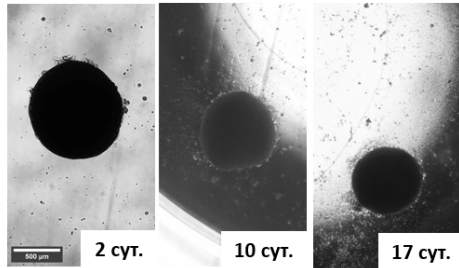


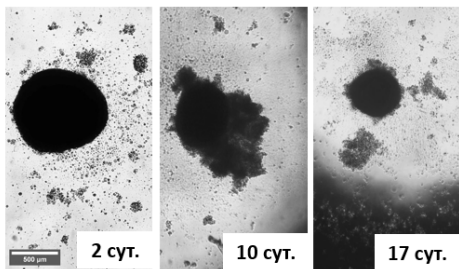
Рис. 1. Схема метода формирования хондросфер в низкоадгезивных планшетах.

### МСК костного мозга человека (FetMSC)

Среда для хондрогенной дифференцировки



Ростовая среда (контроль)



Изменение площади. FetMSC



Изменение степени округлости. №12

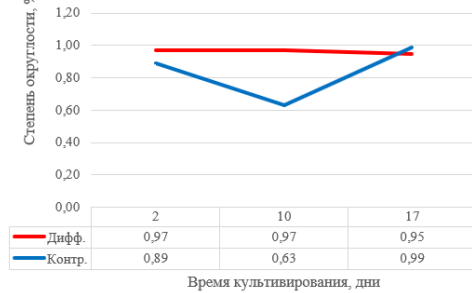
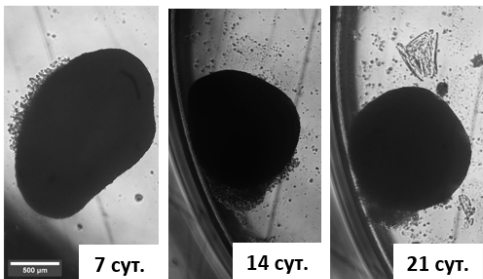


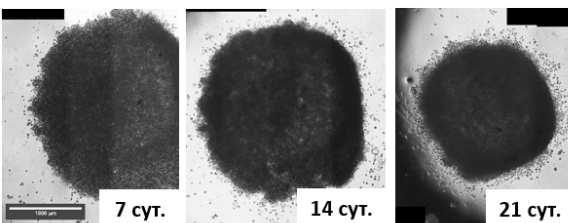
Рис. 2. Динамика изменения площади и степени округлости у типичных сфероидов в хондрогенной и контрольной средах. Клеточная линия МСК человека FetMSC

### Хондроциты человека (№5)

Среда для хондрогенной дифференцировки



Ростовая среда (контроль)



Изменение площади. №5



Изменение степени округлости. №5



Рис. 3. Динамика изменения площади и степени округлости у типичных сфероидов в хондрогенной и контрольной средах. Клеточная культура хондроцитов человека (№5)

Сравнивая степень снижения площади у различных культур МСК и хондроцитов, стоит отметить, что хондроциты меньше были склонны к уменьшению площади, чем

МСК. Оказалось, что аналогичные культуры кролика и человека значимо не отличались по динамике изменению площади между собой (Табл., 2, 3).

Т а б л и ц а 2.

Средние значения площади хондросфер из клеточных линий/культур человека в процессе культивирования, мкм<sup>2</sup>

Срок	№1 чМСК		FetMSC чМСК		№5 чХЦ		№11 чХЦ	
	Опыт	Контроль	Опыт	Контроль	Опыт	Контроль	Опыт	Контроль
2 ч	1543604,3	1284248,3	798139,5	681191,2	2181710,8	4660253,5	нд	нд
7 сут	1907353,1	956163,5	550990,3	637480,4	1681299,6	4483971,6	333587,8	1014589,1
14 сут	1791239,2	554877,0	417981,2	279911,2	1365836,9	3185248,7	711831,75	484249,57
21 сут	1718695,6	475126,4	нд	нд	1385910,5	1478983,6	517117,2	487733,6

Примечание: нд – нет данных.

Т а б л и ц а 3.

Средние значения площади хондросфер из клеточных культур кролика в процессе культивирования, мкм<sup>2</sup>

Срок	№6 кМСК		№9 кМСК		№10 кМСК		№2 кХЦ		№3 кХЦ	
	Опыт	Контроль	Опыт	Контроль	Опыт	Контроль	Опыт	Контроль	Опыт	Контроль
2 ч	1150980,0	1589259,4	823387,5	1298165,3	789372,7	1003942,8	1744830,3	2754252,3	1545635,8	2960232,0
7 сут	735190,4	870824,7	427275,2	1091195,4	424894,0	533252,0	927824,0	740370,1	910530,1	2902606,5
14 сут	533620,2	545060,1	309366,2	833027,9	328006,4	409033,6	778564,6	504720,3	752822,0	2346077,0
21 сут	414131,6	457453,5	185906,0	390318,2	202756,5	284084,4	нд	нд	нд	нд

Степень округлости у линий МСК как человека, так и кролика сохранялась до конца культивирования примерно на одном уровне. Однако на этапе разрушения внешних клеточных слоев у сфероидов (в контроле), степень округлости могла резко уменьшаться в сравнении с первыми этапами формирования сфероидов (Табл. 4, 5).

После окрашивания альциановым синим полученные хондросферы имели синезеленую окраску разной степени интенсивности, что свидетельствует об активном синтезе гликозаминогликана и может говорить о способности всех клеточных линий/культур, используемых в исследовании к хондрогенной дифференцировке.

### Выводы

Подобран оптимальный метод формирования хондросфер с использованием коммерческой хондрогенной среды StemPro® Chondrogenesis Differentiation Kit (Gibco) и культуральных планшетов с неадгезивной поверхностью Nunc clone sphere. Особенностью данного метода является получение высококонцентрированной клеточной суспензии и культивирование в планшете с неадгезивной поверхностью. Метод относительно трудоемкий за счет наличия нескольких длительных этапов формирования сфероида, но при этом имеет преимущество - можно получать сфероиды заданного размера за счет изменения концентрации клеточной суспензии.

Т а б л и ц а 4.

Средние значения степени округлости хондросфер из клеточных линий/культур человека в процессе культивирования

Точка измерения	№1 чМСК		FetMSC чМСК		№5 чХЦ		№11 чХЦ	
	Опыт	Контр.	Опыт	Контр.	Опыт	Контр.	Опыт	Контр.
2 ч	0,77	0,53	0,95	0,9	0,84	0,87	нд	нд
7 сут	0,59	0,67	0,97	0,73	0,78	0,83	0,88	0,55
14й день	0,59	0,91	0,94	0,92	0,92	0,78	0,61	0,92
21й день	0,59	0,93	нд	нд	0,92	0,86	0,65	0,91

Т а б л и ц а 5.

Средние значения степени округлости хондросфер из клеточных /культур кролика в процессе культивирования

Точка измерения	№6 кМСК		№9 кМСК		№10 кМСК		№2 кХЦ		№3 кХЦ	
	Опыт	Контр.	Опыт	Контр.	Опыт	Контр.	Опыт	Контр.	Опыт	Контр.
2 ч	0,87	0,90	0,85	0,79	0,9	0,81	0,70	0,89	0,69	0,74
7 сут	0,83	0,95	0,82	0,60	0,87	0,91	0,93	0,87	0,96	0,63
14й день	0,78	0,91	0,78	0,83	0,82	0,93	0,92	0,88	0,89	0,81
21й день	0,86	0,86	0,95	0,75	0,90	0,81	нд	нд	нд	нд



Проведен сравнительный анализ процесса сфероидообразования клеточных культур МСК и хондроцитов человека и кролика. При помощи морфометрических показателей была определена способность клеточных культур к образованию сфероидов.

Все клеточные линии показали принципиальную способность к формированию хондросфер. Однако эта способность была лучше выражена в клеточных культурах - № 12 FetMSC, №5 чХЦ, № 6 кМСК, № 9 кМСК и №2 кХЦ, которые могут рассматриваться в дальнейшем как кандидаты для создания

тест-системы *in vitro* для оценки биобезопасности и эффективности фармакологических веществ, предназначенных для восстановления поврежденной хрящевой ткани.

*Работа выполнена при финансовой поддержке Минобрнауки России в рамках государственного задания FMFU-2024-0008 «Регенераторный потенциал мультипотентных мезенхимных стромальных клеток: паракринная секреция и направленная дифференцировка».*

### Список литературы

1. Афонин Д.Н., Афонин П.Н., Бегун П.И., Пархарьков Г.Н. Особенности развития компрессии спинного мозга, неврологического статуса и качества жизни больных полиорганным туберкулезом // Клиническая медицина. – 2001. – Т. 79, № 3. – С. 50-52. – EDN YKXBYO.
2. Ryu N., Lee S., Park H. Spheroid culture system methods and applications for mesenchymal stem cells // Cells. – 2019. – V. 8, N 12. – P. 1620. – DOI 10.3390/cells8121620.
3. Griffith L., Swartz M. Capturing complex 3D tissue physiology *in vitro* // Nat. Rev. Mol. Cell. Biol. – 2006. – V. 7, N 3. – P. 211-24. – DOI 10.1038/nrm1858.
4. Achilli T.M., Meyer J., Morgan J.R. Advances in the formation, use and understanding of multi-cellular spheroids // Expert. Opin. Biol. Ther. – 2012. – N 12. – P. 1347–1360. – DOI 10.1517/14712598.2012.707181.
5. Zhang L., Su P., Xu C., Yang J. et al. Chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells: A comparison between micromass and pellet culture systems // Biotechnol. Lett. – 2010. – N 32. – P. 1339–1346. – DOI 10.1007/s10529-010-0293-x.
6. Bosnakovski D., Mizuno M., Kim G. et al. Chondrogenic differentiation of bovine bone marrow mesenchymal stem cells in pellet cultural system // Exp. Hematol. – 2004. – N 32. – P. 502–509. – DOI 10.1016/j.exphem.2004.02.009.
7. Na-Hyun L., Oyunchimeg B., Zhou Z., Hye Sung K. Biomaterials-assisted spheroid engineering for regenerative therapy // BMB Rep. – 2021. – V. 54, N 7. – P. 356–367. – DOI 10.5483/BMB-Rep.2021.54.7.059.
8. Koudan E., Gryadunova A., Karalkin P. et al. Multiparametric analysis of tissue spheroids fabricated from different types of cells // Biotechnol. J. – 2020. – N 15. – P. 190-217. – DOI 10.1002/biot.201900217.
9. Ruedel A., Hofmeister S., Bosserhoff A. Development of a model system to analyze chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells // Int. J. Clin. Exp. Pathol. – 2013. – V. 6, N 12. – P. 3042–3048.
10. Martin F., Lehmann M., Sack U., Anderer U. In vitro development of personalized cartilage microtissues uncovers an individualized differentiation capacity of human chondrocytes // Exp. Biol. Med. (Maywood). – 2017. – V. 242, N 18. – P. 1746–1756. – DOI 10.1177/1535370217728498.
11. Tsvetkova A. V., Vakhrushev I. V., Basok Yu. B. et al. Chondrogenic potential of MSC from different sources in spheroid culture // Cell. Technologies in Biology and Medicine. – 2021. – V. 170, N 4. – P. 528-536. DOI 10.1007/s10517-021-05101-x.
12. Tang W., Zhang H., Liu D., Jiao F. Icaritin accelerates cartilage defect repair by promoting chondrogenic differentiation of BMSCs under conditions of oxygen-glucose deprivation // J. Cell. Mol. Med. – 2022. – V. 26, N. 1. – P. 202–215. – DOI 10.1111/jcmm.17073.
13. Yano F., Hojo H., Ohba S. et al. A novel disease-modifying osteoarthritis drug candidate targeting Runx1 // Ann. Rheum. Dis. – 2013. – N. 72. – P. 748–753. – DOI 10.1136/annrheumdis-2012-201745.

Поступила в редакцию 20.01.2024

### Сведения об авторах:

**Закопайко Богдан Андреевич** – студент магистратуры биологического факультета Санкт-Петербургского государственного университета, e-mail: bogdanzakopayko@gmail.com.

**Александрова Светлана Алексеевна** – научный сотрудник Лаборатории клеточных технологий Центра клеточных технологий ФГБУН «Институт цитологии» РАН, кандидат биологических наук, e-mail: alekssvet2205@gmail.com.

