

На правах рукописи

Грядунова Анна Александровна

**ФАБРИКАЦИЯ ХОНДРОСФЕР И ОЦЕНКА ИХ ФУНКЦИОНАЛЬНО-
МОРФОЛОГИЧЕСКИХ ОСОБЕННОСТЕЙ**

03.03.04 – Клеточная биология, цитология, гистология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва – 2021

Работа прошла апробацию в Институте регенеративной медицины Научно-технологического парка биомедицины федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова

Научный руководитель: Миронов Владимир Александрович, кандидат медицинских наук, ведущий научный сотрудник Отдела современных биоматериалов Института регенеративной медицины Научно-технологического парка биомедицины.

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт морфологии человека»

Защита состоится «30» июля 2021 года в 16.00 на заседании диссертационного совета ФБМФ03.03.004.001, по адресу: 141701, г. Долгопрудный Московской обл., Институтский переулок, д. 9.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте Московского физико-технического института (национальный исследовательский университет) <https://mipt.ru/education/post-graduate/soiskateli-biologicheskie-nauki.php>.

Работа представлена «11» мая 2021 г. в Аттестационную комиссию федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)» для рассмотрения советом по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук в соответствии с п.3.1 ст. 4 Федерального закона «О науке и государственной научно - технической политике»

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Повреждения и заболевания хрящевой ткани являются важнейшей клинической проблемой, решение которой до сих пор не найдено (Christensen, 2016; Еремеев et al., 2020). Хрящевая ткань обладает способностью к регенерации в период эмбрионального развития, тогда как во взрослом возрасте эта способность практически полностью утрачивается. При отсутствии лечения глубокие хрящевые дефекты приводят к значительному снижению качества жизни, и, в худшем случае, могут сопровождаться постоянными болями, утратой функций и снижением физической работоспособности (Widuchowski et al., 2008; Huey et al., 2012). Одним из передовых направлений в лечении таких дефектов является использование подходов тканевой инженерии (Langer, Vacanti, 1993).

В тканевой инженерии хрящевой ткани существует два основных направления. Первое направление заключается в применении синтетических и натуральных скаффолдов – биodeградируемых материалов, обеспечивающих временную поддержку помещенных на них хондроцитов, с последующим формированием хрящевой ткани (Chan, Leong, 2008). Второе направление основано на применении тканевых сфероидов – плотно упакованных агрегатов живых клеток, используемых в качестве «строительных блоков» для замещения части хряща, подвергшейся нежелательным изменениям (Yasui, 2016). ТС, сформированные из хондроцитов, получили название хондросферы (Schubert et al., 2009; Meyer et al., 2012). Хондросферы сохраняют функциональные характеристики, типичные для хрящевой ткани, в частности синтез специфических компонентов внеклеточного матрикса, и способны к интеграции в нативный хрящ (Baptista et al., 2013).

Степень разработанности темы исследования

За последнее десятилетие использование хондросфер получило широкое распространение в тканевой инженерии хрящевой ткани (Fickert et al., 2012; Silva et al., 2016). Растущий интерес к использованию данного подхода в значительной мере обусловлен успешными результатами внедрения в клиническую практику технологии имплантации трехмерных аутологичных хондроцитов (3D-ACI, three-dimensional autologous chondrocyte implantation), при которой проводится биопсия суставного хряща для получения первичных хондроцитов, их последующее культивирование и размножение *in vitro* и формирование хондросфер для дальнейшей имплантации в хондральный дефект (Morris et al., 2007; Siebold et al., 2018). Результаты данной технологии показывают существенное улучшение качества жизни и здоровья пациентов с травматическими или дегенеративными повреждениями суставного хряща.

Несмотря на обнадеживающий потенциал трансляции хондросфер в клиническую практику, их основные функциональные свойства до сих пор

были слабо изучены. Ни биомеханические свойства хондросфер, ни структурные детерминанты этих свойств не были систематически охарактеризованы в предыдущих исследованиях. Кроме того, не было уделено должного внимания таким основополагающим процессам как слияние и распластывание хондросфер, имеющим первостепенное значение при замещении дефектов хряща и интеграции их с нативной хрящевой тканью.

Таким образом, изучение основных функциональных свойств хондросфер и структурных детерминант этих свойств является актуальным и перспективным направлением в современной регенеративной медицине.

Цель работы – систематическая характеристика хондросфер и изучение их функциональных свойств.

Задачи исследования:

1. Подобрать оптимальный метод получения хондросфер в соответствии с критериями масштабируемости, стандартизованности и возможности автоматизации метода.
2. Определить оптимальную концентрацию клеток в хондросферах.
3. Изучить накопление специфического внеклеточного матрикса при краткосрочном и продолжительном культивировании хондросфер.
4. Исследовать жизнеспособность клеток в хондросферах при краткосрочном и продолжительном культивировании с использованием качественных и количественных методов анализа.
5. Сравнить кинетику слияния и распластывания хондросфер на различных сроках культивирования.
6. Провести оценку биомеханических свойств хондросфер на различных сроках культивирования.
7. Для определения структурных детерминант функциональных свойств хондросфер оценить вклад систем цитоскелета в морфологию клеток в их составе, кинетику слияния и распластывания, биомеханические свойства.

Научная новизна

Концептуально обоснованы критерии, используемые для подбора оптимального метода получения хондросфер, экспериментально подобран оптимальный метод получения хондросфер с учетом стандартизованности, масштабируемости и возможности автоматизации.

Экспериментально установлены оптимальные параметры хондросфер, включая диаметр и концентрацию клеток в сфероиде, оценена жизнеспособность клеток в хондросферах и накопление тканеспецифичного внеклеточного при их краткосрочном и продолжительном культивировании.

Впервые экспериментально оценена кинетика слияния и распластывания хондросфер, а также проведена оценка их биомеханических свойств на различных сроках культивирования.

Впервые оценен вклад всех трех систем цитоскелета в морфологию поверхности, биомеханические свойства хондросфер, кинетику их слияния и распластывания.

Теоретическая и практическая значимость исследования

Культивирование в трехмерных условиях способствует сохранению хондрогенного фенотипа хондроцитов и позволяет получать *in vitro* жизнеспособные клеточные агрегаты, которые могут быть использованы в качестве уникальной модели для проведения фундаментальных исследований. Использование хондросфер может найти широкое применение в области регенеративной медицины для восстановления хрящевой ткани, в том числе и при обширных повреждениях.

Результаты исследования функциональных свойств хондросфер имеют теоретическое и практическое значение, могут быть использованы в фундаментальных исследованиях и лечь в основу разработки инновационных технологий замещения хондральных дефектов в тканевой инженерии хрящевой ткани.

Анализ влияния каждой системы цитоскелета на функциональные свойства хондросфер позволяет управлять настройкой взаимодействий отдельных компонентов цитоскелета и создает условия для дальнейшего изучения роли цитоскелета в биологии хряща.

Методология и методы исследования

При исследовании применяли комплексный анализ отечественной и зарубежной научной литературы в области изучения особенностей строения суставного хряща, современных клинических подходов к лечению его повреждений, а также перспектив использования хондросфер в замещении хрящевых дефектов, методов их получения, анализа и оценки функциональных свойств. Выполнение экспериментальной части работы осуществляли с использованием системного подхода. В работе были использованы следующие методы: изолирование и культивирование первичных хондроцитов, получение хондросфер при помощи низкоадгезивной технологии, качественная и количественная оценка жизнеспособности клеток в хондросферах, морфометрические методы, световая, флуоресцентная, конфокальная, сканирующая электронная и трансмиссионная электронная микроскопия, гистохимическое и иммуногистохимическое исследование, измерение биомеханических свойств, статистический анализ.

Личный вклад автора

Автором был проведен анализ литературы, осуществлено планирование и проведение экспериментов, систематизация и статистический анализ полученных результатов, выполнена подготовка публикаций.

Положения, выносимые на защиту

1. Первичные хондроциты, выделенные из мышечков коленного сустава барана, в условиях трехмерного культивирования формируют плотно упакованные шарообразные клеточные агрегаты – хондросферы.

2. Оптимальным методом получения хондросфер для использования в тканевой инженерии хрящевой ткани является применение планшетов с низкоадгезивным покрытием Corning Spheroid Microplates, которые позволяют получать сфероиды стандартного контролируемого размера и формы в достаточных количествах и обладают потенциалом к автоматизации.

3. Оптимальной концентрацией хондросфер, с учетом предела пассивной диффузии кислорода и питательных веществ в невазкуляризованных тканях, является концентрация, равная 8000 клеток/сфероид.

4. Накопление специфических компонентов внеклеточного матрикса, интактная морфология хондросфер, сравнительно небольшое количество нежизнеспособных клеток, способность к слиянию и распластыванию, а также усиление биомеханических свойств при продолжительном культивировании указывает на потенциал использования хондросфер для замещения дефектов суставного хряща.

5. Основополагающим фактором, управляющим морфологией, слиянием, распластыванием и поддержанием биомеханических свойств хондросфер, является актиновый цитоскелет хондроцитов в их составе.

Степень достоверности результатов

Достоверность результатов обоснована достаточным количеством экспериментальных групп и объемом данных для каждой из них, воспроизводимостью результатов, использованием современных методов анализа, корректным применением статистических методов, критическим анализом результатов исследования и сопоставлением их с актуальными данными научной литературы.

Апробация результатов исследования

Материалы диссертации доложены на международном конгрессе The 15th World Congress of the International Cartilage Regeneration & Joint Preservation Society (Банкувер, 2019), международном симпозиуме EMBO | EMBL Symposium Mechanical Forces in Development (Гейдельберг, 2019), международной конференции Biofabrication-2019 (Колумбус, 2019), 2-й международной научной конференции «Конституциональная анатомия: теория и приложения» (Москва, 2019), IV Национальном конгрессе по регенеративной медицине (Москва, 2019), III Сеченовском Международном Биомедицинском Саммите 2019 SIBS-2019 (Москва, 2019), международной конференции

Biofabrication-2018 (Бюрцбург, 2018), II Сеченовском Международном Биомедицинском Саммите SIBS-2018 (Москва, 2018), VII Международной молодежной научной школе-конференции «Современные проблемы физики и технологий» Национального исследовательского ядерного университета МИФИ (Москва, 2018), международной конференции The 1st TERMIS-EU Workshop “3D Printing in Musculoskeletal Tissue Engineering” (Варшава, 2018), I Сеченовском Международном Биомедицинском Саммите SIBS-2017 (Москва, 2017), III Национальном конгрессе по регенеративной медицине (Москва, 2017), VII Международном молодежном медицинском конгрессе "Санкт-Петербургские научные чтения-2017" (Санкт-Петербург, 2017), международном саммите «Предиктивно-превентивная и персонализированная медицина – основа новой системы здравоохранения» (Москва, 2016), международном конгрессе молодых ученых в медицине RE: Search (Казань, 2016), международном конгрессе «Медицина чрезвычайных ситуаций. Современные технологии в травматологии и ортопедии» (Москва, 2016).

Публикации

По материалам диссертации опубликовано 16 научных работ, в том числе 2 работы в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК РФ, 4 статьи в рецензируемых журналах, индексируемых международной системой цитирования Scopus, и 10 тезисов докладов на международных конференциях.

Структура и объем диссертации

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, изложения собственных результатов, их обсуждения, заключения, выводов и списка литературы. Работа изложена на 171 странице машинописного текста, содержит 48 рисунков и 3 таблицы. Список литературы включает 250 источников, из них 25 отечественных и 225 зарубежных.

Внедрение результатов работы

Основные результаты исследования внедрены в учебный процесс Института регенеративной медицины ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет).

Диссертация соответствует паспорту научной специальности

03.03.04 клеточная биология, цитология, гистология согласно пунктам 1, 5, 7.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Культивирование клеток. Для получения первичных хондроцитов кусочки суставного гиалинового хряща выделяли из мышечков коленного сустава барана сразу после эвтаназии животного с соблюдением принципов и норм гуманного обращения с животными (Европейская Конвенция ET/S 129 (1986) и директива 86/609 ESC работы с экспериментальными животными). Сразу после взятия кусочки хряща помещали в PBS (Gibco, США) с добавлением 2% антибиотика/антимикотика (Gibco, США), и в таком виде материал доставляли в лабораторию. Далее кусочки хряща измельчали до размеров 1-2 мм² и помещали в 0,1% раствор коллагеназы II (Sigma-Aldrich, США) в среде DMEM (Gibco, США) с добавлением 2 mM L-глутамина (ПанЭко, Россия) и 1% антибиотика/антимикотика и инкубировали в течение 24 часов при температуре 37°C. Полученную суспензию фильтровали через клеточное сито с диаметром пор 100 мкм (Corning, США), после чего клетки высевали в культуральные флаконы и выращивали в полной ростовой среде DMEM, содержащей 10% фетальной бычьей сыворотки (Gibco, США), 1% антибиотика/антимикотика и 2 mM L-глутамина. Клетки инкубировали при температуре 37°C во влажной атмосфере с 5% CO₂ до достижения 85-95% конfluence.

Получение хондросфер. Хондроциты промывали раствором Версена (ПанЭко, Россия), добавляли 0,25% раствор трипсина/0,53 mM ЭДТА (Gibco, США) и суспендировали в полной ростовой среде DMEM. Для формирования хондросфер использовали суспензию нескольких концентраций: 1000, 3375, 8000, 15625 и 27000 клеток/сфероид.

Формирование хондросфер в агарозных формах осуществляли с использованием силиконовых штампов MicroTissues 3D Petri dish (Sigma-Aldrich, США). После нагревания в микроволновой печи 2% раствора агарозы (Helicon, Россия) в PBS 450 мкл горячего раствора помещали в каждый силиконовый штамп. После остывания полученные агарозные формы аккуратно переносили в 12-луночные культуральные планшеты (Sigma-Aldrich, США), заливали полной ростовой средой DMEM и инкубировали в течение 30 минут. Среду удаляли и затем помещали в каждую форму по 190 мкл клеточной суспензии. 12-луночные планшеты снова помещали в инкубатор на 40 минут. После добавления 2,5 мл культуральной среды в каждую лунку планшеты инкубировали при температуре 37°C во влажной атмосфере с 5% CO₂.

Формирование хондросфер в низкоадгезивных планшетах осуществляли с использованием планшетов Corning Spheroid Microplates (Corning, США). В каждую ячейку 96-луночного планшета Corning Spheroid Microplate помещали по 100 мкл готовой суспензии. Планшеты инкубировали при температуре 37°C во влажной атмосфере с 5% CO₂.

Качественная оценка жизнеспособности. Применяли метод Live/Dead с использованием набора Cellstain double staining Kit (Sigma, США). Хондросферы трижды промывали раствором PBS, а затем в каждую ячейку 96-луночного планшета Corning Spheroid Microplate помещали по 100 мкл рабочего раствора. Планшет инкубировали при температуре 37°C в течение 15 минут. Сфероиды снова промывали в PBS. Результаты анализа визуализировали с применением конфокальной сканирующей системы A1R HD25 на базе микроскопа Nikon Ti, а также с использованием флуоресцентного микроскопа Nikon Eclipse Ti-E, оборудованного цифровой фотокамерой (все Nikon, Япония).

Дополнительно использовали набор для обнаружения апоптотических клеток в XC In Situ Cell Death Detection Kit (Roche, Швейцария). Серийные срезы залитых парафином XC депарафинизировали, а затем инкубировали в течение часа с реакционной смесью. После отмывки ядра контрастно окрашивали 4',6-диамидино-2-фенилиндолом (DAPI; Invitrogen, Россия), и метки, включенные в поврежденные участки ДНК, визуализировали с помощью флуоресцентного микроскопа Eclipse Ti-S (Nikon, Япония). Все полученные изображения обрабатывали в программном обеспечении NIS Elements (Nikon, Япония).

Количественная оценка жизнеспособности. Применяли реагент CellTox Green Dye (Promega, США). Каждые сутки в одну ячейку 96-луночного планшета Corning Spheroid Microplate, содержащую краситель и 1 сфероид, добавляли 4 мкл лизирующего буфера для регистрации интенсивности флуоресценции, соответствующей 0% жизнеспособности клеток в хондросфере. Флуоресцентный сигнал с остальных ячеек регистрировали ежедневно на протяжении 9 дней культивирования с помощью планшетного анализатора Victor X3 (PerkinElmer, США). Полученные данные анализировали, используя программное обеспечение GraphPad Prism 8.0.1 (GraphPad Software, Inc., США).

Морфометрический анализ. Для оценки диаметров и округлости использовали фотографии, полученные на инвертированном световом микроскопе Nikon Eclipse Ti-E (Nikon, Япония), оснащенном цифровой фотокамерой. Полученные изображения обрабатывали в программном обеспечении NIS Elements (Nikon, Япония). Подсчет диаметров и округлости проводили с использованием программного обеспечения ImageJ 1.51 (NIH, Bethesda, США) автоматически. Полученные данные анализировали с использованием программного обеспечения GraphPad Prism 8.0.1 (GraphPad Software, Inc., США).

Гистохимическое и иммуногистохимическое исследование. Для получения информации о накоплении специфического внеклеточного матрикса хондросферы помещали в агарозные формы, покрывали расплавленной агарозой, фиксировали в 10% формалине, pH 7.4 (Sigma-Aldrich, США) на 24 часа и погружали в парафин (Биовитрум, Россия). Затем

на микротоме Microm HM 340-E (Thermo Fisher Scientific, США) изготавливали серийные срезы толщиной 5 мкм, которые переносили на стекла Star-Frost (Kisker Biotech GmbH, Германия) и депарафинизировали. Дальнейшие процедуры выполнялись автоматически в системе Autostainer 360 (Thermo Fisher Scientific, США). Промывку проводили в трис-буфере (pH 6,0) с твином-20. Окрашивание проводили с использованием первичных поликлональных кроличьих антител к аггрекану, коллагену I типа и коллагену II типа (все Abbiotec, США) в разведениях 1:100. Ядра контрастировали гематоксилином Майера. После дегидратации срезы заключали в Bio-Mount (Bio Optica Milano S.P.A., Италия). Параллельно проводили окрашивание гематоксилином-эозином (DAKO, США) или азу-эозином (Panreac, США) в автоматическом режиме на аппарате Microm HMS 740 (Thermo Fisher Scientific, США). Анализ полученных препаратов проводили посредством световой микроскопии на инвертированном микроскопе Nikon Eclipse Ti-E (Nikon, Япония), оснащённом цифровой фотокамерой. Полученные изображения обрабатывали в программном обеспечении NIS Elements (Nikon, Япония).

Визуализация систем цитоскелета. Хондроциты в полной ростовой среде DMEM высевали на чашки Ibidi Polymer Coverslip Bottom (Ibidi, Германия) и оставляли в инкубаторе на 24 часа. В качестве пертурбантов цитоскелета использовали цитохалазин Д (Sigma-Aldrich, США), нокодазол (Sigma-Aldrich, США) и витаферин А (Abcam, США), которые растворяли в диметилсульфоксиде и добавляли вместе со свежей средой в концентрациях 10 мкМ, 1 мкМ и 1 мкМ, соответственно. Такое же количество культуральной среды, содержащей 0,1% ДМСО, использовали в контрольной группе. Через 48 часов после помещения хондроцитов на чашки Петри клетки промывали PBS, фиксировали в 4% параформальдегиде на 10 минут при комнатной температуре, а затем пермеабилizировали 10 минут в 0,1% растворе тритона X-100 (VWR Life Science, США). Окрашку актиновых микрофиламентов, микротрубочек и промежуточных филаментов проводили с использованием реагента Alexa Fluor 488 Phalloidin (Eurogen, США), антител к α -тубулину Anti- α -Tubulin-FITC (Sigma-Aldrich, США) и антител к виментину Alexa Fluor 647 Anti-Vimentin (Abcam, США). После удаления окрашивающих растворов образцы трижды промывали PBS по 5 минут. Для визуализации ядер использовали окраску DAPI.

В случае хондросфер использовали однодневные сфероиды с концентрацией 100 клеток/сфероид. После инкубирования с пертурбантами цитоскелета в течение 24 часов образцы переносили в 1,5 мл пробирки Eppendorf (Eppendorf, США), промывали PBS и фиксировали в 4% параформальдегиде. Зафиксированные ХС снова промывали PBS в течение 20 минут и пермеабилizировали в 0,1% растворе тритона X-100. Окрашку проводили на ночь при 4°C. Дальнейшие процедуры осуществляли так же, как описано выше.

Для визуализации систем цитоскелета использовали конфокальную сканирующую систему A1R HD25 на базе микроскопа Nikon Ti, оснащенного масляно-иммерсионным объективом CFI Plan Apo 60×1.4 NA (все Nikon, Япония). Полученные изображения обрабатывали в программном обеспечении NIS Elements (Nikon, Япония).

Анализ кинетики слияния. Для сравнительного количественного анализа кинетики слияния хондросфер использовали сфероиды, полученные в низкоадгезивных планшетах Corning Spheroid Microplates. Хондросферы помещали попарно на дно ячеек планшета Corning Spheroid Microplate так, чтобы они касались друг друга, и культивировали в течение 5-6 дней. Фазово-контрастные изображения сливающихся хондросфер получали с использованием инвертированного светового микроскопа Nikon Eclipse Ti-E (Nikon, Япония), оснащенного цифровой фотокамерой. Полученные изображения обрабатывали в программном обеспечении NIS Elements (Nikon, Япония), а затем анализировали в ImageJ 1.51 (NIH, Bethesda, США). При анализе кинетики слияния измеряли угол слияния, контактную длину и длину дублета. Полученные данные анализировали с использованием программного обеспечения GraphPad Prism 8.0.1 (GraphPad Software, Inc., США). Для получения детальной информации о процессе слияния при использовании пертурбантов цитоскелета пары хондросфер дополнительно анализировали с использованием сканирующей электронной микроскопии. Для полученных изображений применяли псевдоокрашивание с использованием программного обеспечения Adobe Photoshop 21.0.3.91 (Adobe Systems, Inc., США).

Анализ кинетики распластывания. Для сравнительного количественного анализа использовали хондросферы, полученные в низкоадгезивных планшетах Corning Spheroid Microplates. Сфероиды помещали на дно адгезивного 24-луночного культурального планшета (Sigma-Aldrich, США). Фазово-контрастные изображения распластывающихся сфероидов получали с использованием инвертированного светового микроскопа Nikon Eclipse Ti-E (Nikon, Япония), оснащенного цифровой фотокамерой. Полученные изображения обрабатывали в программном обеспечении NIS Elements (Nikon, Япония). Площадь распластывания измеряли в программном обеспечении ImageJ 1.51 (NIH, Bethesda, США). Для получения детальной информации о процессе распластывания при использовании пертурбантов цитоскелета хондросферы дополнительно анализировали с использованием сканирующей электронной микроскопии.

Сканирующая электронная микроскопия. Хондросферы помещали на матрикс, изготовленный из биосовместимого полиуретана EG-85A (Lubrizol, США) и оставляли для прикрепления к нему на 4 часа. Одиночные хондросферы затем фиксировали в растворе 2,5% глутаральдегида в PBS в течение 2 часов при комнатной температуре, а для тестирования распластывания образцы оставляли на матриксе еще на 4 или 24 часа и также фиксировали в глутаральдегиде. Пары сливающихся хондросфер фиксировали

в глутаральдегиде, не помещая на матрикс. Образцы промывали в 1% растворе осмия тетраоксида в PBS в течение 1-2 часов. Далее проводили поэтапное обезвоживание образцов путем проводки через ряд спиртовых растворов восходящей концентрации. После обезвоживания образцы высушивали с использованием прибора для высушивания в критической точке HCP-2 (Hitachi Koki Co. Ltd., Япония). Далее образцы прикрепляли к поверхности столика-держателя с использованием электропроводящего клея и проводили ионное напыление золотом в аппарате IB-3 (EIKO, Япония). Образцы анализировали с использованием растрового электронного микроскопа JSM-6510 LV (JEOL, Япония) при ускоряющем напряжении 10 кВ.

Трансмиссионная электронная микроскопия. Хондросферы фиксировали в 1% растворе глутаральдегида в PBS и обрабатывали 1% раствором осмия тетраоксида в PBS. Далее проводили поэтапное обезвоживание образцов путем проводки через ряд спиртовых растворов восходящей концентрации, которую завершали 2 сменами пропиленоксида по 15 минут. После дегидратации хондросферы помещали в смесь пропиленоксида и эпоксидной смолы для заливки Araldite 502 (Electron Microscopy Sciences, США) в соотношении 1:1 на 1 час. Далее смесь заменяли на 100% эпоксидную смолу и оставляли образцы еще на 12 часов при комнатной температуре. Ультратонкие срезы получали с использованием ультрамикротомы Leica EM UC7 (Leica, Германия). Срезы контрастировали цитратом свинца и уранилацетатом и исследовали под трансмиссионным электронным микроскопом JEOL JEM 1400 (JEOL, Япония).

Оценка биомеханических свойств. Биомеханическое тестирование осуществляли с использованием компрессионной тестирующей установки Microsquisher (CellScale, Канада) и программного обеспечения SquisherJoy (CellScale, Канада). Рабочую камеру заполняли PBS и нагревали до 37°C. ХС, сформированные в низкоадгезивных планшетах Corning Spheroid Microplates, поочередно помещали в камеру, заполненную PBS. Тест на сжатие выполняли в автоматическом режиме. Модули упругости рассчитывали по касательной на начальном участке кривой напряжения-деформации до деформации 20% для каждого сфероида.

Статистическая обработка результатов. Все данные анализировали с использованием программного обеспечения GraphPad Prism 8.0.1 (GraphPad Software, Inc., США) и представляли как среднее значение \pm ошибка среднего. Для проверки статистической значимости полученных результатов использовали следующие тесты: дисперсионный анализ ANOVA с post hoc тестом Тьюки (анализ столбцов) или post hoc тестом Шидака (анализ групп) – для нормально распределенных данных; тест Крускала-Уоллиса с post hoc тестом Данна (анализ столбцов) или смешанную модель (mixed-effects model) с post hoc тестом Шидака (анализ групп) – для данных, не характеризующихся нормальным распределением. Статистически значимыми принимались статистические значения вероятности менее 0.05 ($p < 0.05$).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Подбор оптимального метода получения хондросфер. В качестве технологий сравнения исследовали методики получения сфероидов при помощи агарозных форм и с использованием планшетов с низкоадгезивным покрытием. Анализ показал, что оба метода позволяют получать хондросферы в значительных количествах: 96 сфероидов при использовании 1 планшета Corning Spheroid Microplate, 81 сфероид – в случае применения 1 агарозной формы. При этом масштабируемость обоих методов достигается путем увеличения количества применяемых материалов.

Использование агарозных форм показало сниженную точность дозирования клеточной суспензии, что отразилось на снижении однородности диаметров образованных хондросфер. Более того, при сборе полученных сфероидов из агарозных форм ручной или автоматической пипеткой часть сфероидов неизбежно терялась при переносе.

При использовании планшетов с низкоадгезивным покрытием разброс диаметров образующихся сфероидов не превышал 10% в течение всего времени культивирования, иными словами, данный метод гарантировал минимизацию разброса диаметров сфероидов. Сбор хондросфер из ячеек планшета легко осуществляли как с применением ручной пипетки, так и при помощи автоматического дозатора.

Несмотря на то что значение округлости хондросфер, полученных в агарозных формах, было больше установленного минимума (0.8), использование низкоадгезивных планшетов показало лучшую стандартизацию формы сфероидов: на протяжении всего времени культивирования она превышала 0.9. Более того, получение хондросфер в планшетах Corning Spheroid Microplates позволило наиболее эффективно отслеживать размер и морфологию отдельных сфероидов с течением времени.

Таким образом, применение планшетов Corning Spheroid Microplates с низкоадгезивным покрытием является предпочтительным методом получения хондросфер. По этой причине в последующих экспериментах было принято решение использовать планшеты Corning Spheroid Microplates.

Определение оптимальной концентрации клеток в хондросферах.

Использовали несколько концентраций: 1000, 3375, 8000, 15625 и 27000 клеток/сфероид, согласно рекомендациям производителя Microtissues 3D Petri dish. Аналогичные концентрации использовали и в планшетах Corning Spheroid Microplates. Предыдущие исследования показали, что оптимальным для сфероидов является диаметр, не превышающий 400 мкм, что вытекает из установленного предела пассивной диффузии кислорода и питательных веществ в невакуляризованных тканях, равного 200 мкм (Rowkema et al., 2008; Kinney et al., 2014). При превышении этого значения в центре сфероида неизбежно образуется некротическая зона. Следовательно, при подборе

оптимальной концентрации клеток в первую очередь учитывали значения диаметров хондросфер на протяжении всего времени культивирования. Результаты анализа диаметров показали, что только при использовании концентраций 1000-8000 клеток/сфероид диаметр находится в «безопасном» интервале практически в течение всего времени культивирования (Рис. 1).

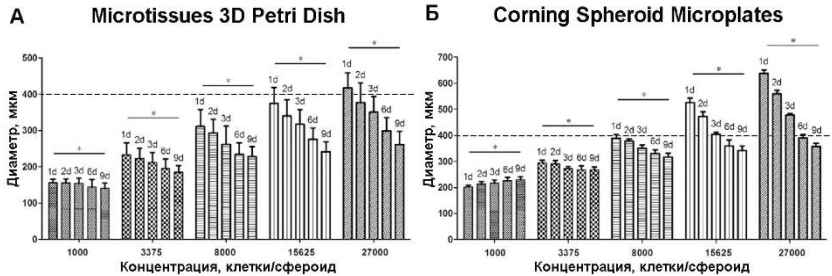


Рис. 1. Результаты анализа диаметров хондросфер, полученных с использованием агарозных форм (А) и в планшетах с низкоадгезивным покрытием (Б). 1d, 2d, 3d, 6d, 9d – культивирование в течение 1, 2, 3, 6 и 9 дней, соответственно. Пунктирная линия показывает максимально допустимый диаметр сфероидов из расчета пределов диффузии кислорода и питательных веществ (400 мкм). Статистические значения вероятности показаны как * ($p \leq 0.05$). Данные представлены как среднее \pm стандартная ошибка среднего. Двухвариантный дисперсионный анализ ANOVA с post hoc тестом Тьюки

Хондросферы с большей концентрацией клеток предположительно обладают увеличенным регенеративным потенциалом, поскольку способны покрывать большую площадь хрящевого дефекта. Максимально возможной концентрацией клеток в ХС, при которой диаметр ХС находится в «безопасном» интервале, не превышающем 400 мкм, является 8000 клеток/сфероид (за исключением первого дня культивирования). Таким образом, концентрация 8000 клеток/сфероид была принята в качестве оптимальной и использовалась во всех последующих экспериментах.

Синтез и накопление внеклеточного матрикса. На начальном этапе проводили анализ полутонких срезов только что сформированных сфероидов, который показал изначальное практически полное отсутствие любых компонентов матрикса и чрезвычайно плотную упаковку клеток. На следующем этапе подтверждали накопление специфического для гиалинового хряща коллагена II типа, составляющего более 90% внеклеточного матрикса здорового суставного хряща, при непродолжительном культивировании ХС. Иммуногистохимические исследования подтвердили наличие коллагена II типа уже на ранних этапах культивирования: через 3 дня и 6 дней. Наибольшее количество коллагена II типа наблюдалось на периферии хондросфер, где он располагался в виде своеобразной плотной «оболочки».

В качестве логичного продолжения исследования наиболее полно оценивали синтез и накопление различных компонентов внеклеточного матрикса, специфичных для гиалинового хряща, в частности, коллагена II типа и агреканана. Кроме этого, важным параметром стал также анализ накопления неспецифического коллагена I типа, указывающего на образование нежелательного волокнистого хряща. Иммуногистохимический анализ подтвердил отсутствие коллагена I типа и постепенное увеличение уровней коллагена II типа и агреканана, маркеров гиалиновой хрящевой ткани (Рис. 2).

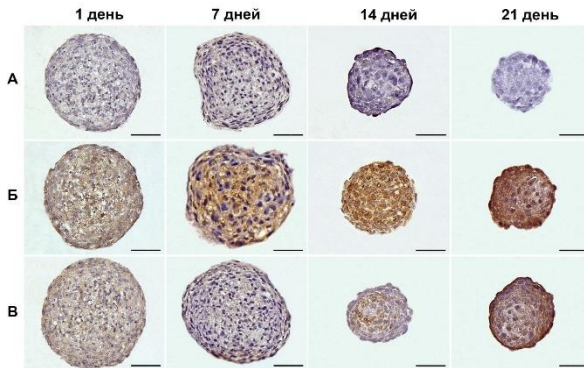


Рис. 2. Накопление специфических компонентов внеклеточного матрикса в хондросферах:

А – коллаген I типа (коричневый); Б – агрекан (коричневый); В – коллаген II типа (коричневый). Иммуногистохимическое окрашивание, увеличение $\times 20$, размерная шкала 100 мкм.

С увеличением продолжительности культивирования хондросферы приобретали строение, наиболее характерное для гиалинового хряща, в котором процентное содержание матрикса значительно превалирует над клеточным компонентом. Увеличение продукции указанных компонентов внеклеточного матрикса свидетельствует о постоянстве процессов тканевой организации при длительном культивировании *in vitro*. Через 14 и 21 день культивирования хондрогенный фенотип клеток в ХС стал наиболее очевидным.

Оценка жизнеспособности клеток. Метод Live/Dead практически не выявил наличия мертвых клеток в течение первых девяти дней культивирования. Подобные результаты наблюдали также и для метода TUNEL: в культуре появилось лишь незначительное количество апоптотических клеток на третий и шестой дни. При количественной оценке жизнеспособности реагентом CellTox Green Dye количество мертвых клеток не превышало 4% в течение первых девяти дней. При культивировании хондросфер до 21 дня количество живых клеток оставалось значительным. Через 14 дней выявляли популяцию мертвых клеток, распределенных в объеме сфероидов, а также на их периферии, без локализации в центре клеточного агрегата. Флуоресцентная микроскопия показала заметное увеличение количества нежизнеспособных клеток, находящихся на периферии хондросфер, на последнем этапе культивирования. Вместе с тем, фазово-

контрастные микрофотографии соответствующих сфероидов выявили интактную морфологию как через 14, так и через 21 день культивирования.

Оценка кинетики слияния и распластывания. Сравнительный анализ проводили, используя сфероиды, предварительно культивированные в течение 1, 7, 14 и 21 дня. Анализ кинетики слияния хондросфер в течение 5 дней показал статистически значимую зависимость скорости слияния от продолжительности культивирования (Рис. 3). Длина дублета двух сливающихся сфероидов уменьшалась обратно пропорционально времени предварительного культивирования и уровню накопления внеклеточного матрикса. Так, быстрее всего сливались 1-дневные хондросферы, а медленнее – более зрелые 21-дневные. Статистически значимые различия кинетики слияния наблюдали на протяжении всего времени слияния. При анализе кинетики распластывания хондросфер, помещенных на адгезивный пластик культуральных планшетов, использовали сфероиды аналогичных сроков культивирования. Наблюдения проводили в течение 32 часов. Статистически значимые различия в величине площади распластывания наблюдали через 24 и 32 часа, при этом зависимость между сроком культивирования и скоростью распластывания отсутствовала (Рис. 3).

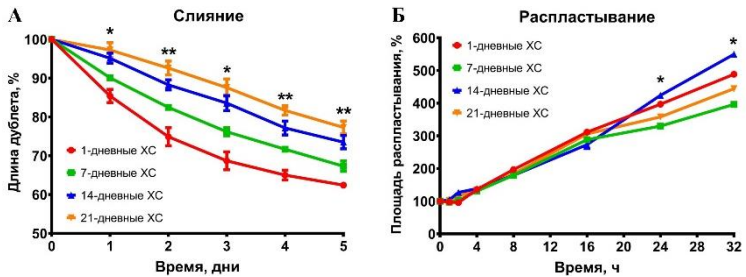


Рис. 3. Результаты анализа кинетики слияния (А) и распластывания (Б) хондросфер. Статистические значения вероятности показаны как * ($p \leq 0.05$), ** ($p \leq 0.01$). Данные представлены как среднее \pm стандартная ошибка среднего. Двухвариантный дисперсионный анализ ANOVA с post hoc тестом Тьюки.

Таким образом, была обнаружена значительная корреляция между сроком культивирования хондросфер, накоплением внеклеточного матрикса и кинетикой их слияния.

Оценка биомеханических свойств. Использовали компрессионную тестирующую установку Microsquisher, позволяющую проводить испытания биомеханических свойств на микромасштабном уровне. Ранее было установлено, что значения модуля упругости суставного хряща различаются в зависимости от его локализации: 13.5 ± 2.3 МПа в лодыжке, 8.3 ± 1.9 МПа в коленном суставе, 8.0 ± 1.9 МПа в бедре (Shepherd, Seedhom, 1999). Таким

образом, обеспечение биомеханических свойств хрящевой ткани является важнейшей задачей при замещении дефектов хряща. Для оценки биомеханических свойств хондросфер рассчитывали модуль упругости, который постепенно увеличивался, достигая максимальных значений после 21 дня культивирования: $17,5 \pm 1,2$ кПа. Примечательно, что в то же время происходило постепенное уменьшение диаметров хондросфер.

Изменение морфологии хондроцитов и хондросфер при использовании пертурбантов цитоскелета. Контрольные хондроциты демонстрировали хорошо организованную сеть актиновых микрофиламентов, включая сеть переднего края и четко различимые стресс-фибриллы. Цитохалазин Д вызывал округление клеток и способствовал смещению ядра, в клетках обнаруживались многочисленные фрагменты коротких актиновых филаментов. Визуализация тубулина в контрольных клетках выявила тонкую сеть микротрубочек в их цитоплазме. Деполимеризация тубулина с помощью нокодазола нарушала структуру сети микротрубочек, поэтому отдельные филаменты тубулина в клетках не различались. Наконец, исследование промежуточных филаментов показало, что в контрольных клетках их сеть распространялась по всей цитоплазме, от ядра до периферических областей, тогда как витамин А вызывал ретракцию виментина от периферии к центру клетки (Рис. 4).

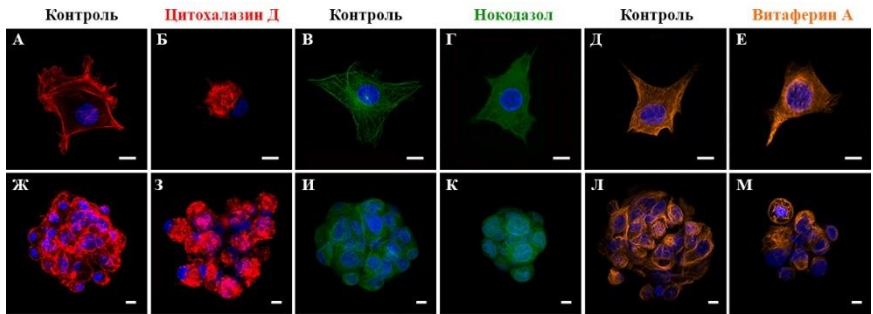


Рис. 4. Организация цитоскелета и морфология хондроцитов (А-Е) и хондросфер (Ж-М) после обработки пертурбантами цитоскелета. Конфокальная микроскопия, увеличение $\times 200$, размерная шкала 10 мкм.

Морфологические изменения в хондросферах были аналогичны тем, которые мы наблюдали в двумерных клеточных культурах. Контрольные сфероиды продемонстрировали плотную упаковку клеток и хорошо организованный цитоскелет, тогда как в группах цитохалазина Д и нокодазола наблюдалась деградация актиновых микрофиламентов и сети микротрубочек, соответственно. В группе хондроцитов, обработанных витамином А, было обнаружено смещение филаментов виментина в околоядерную область. При обработке цитохалазином Д клетки в их составе были отделены друг от друга

и приобретали округлую форму, увеличивалось интерстициальное пространство, что указывало на отсутствие поляризации клеток. Примечательно, что в остальных группах клетки оставались в тесном контакте друг с другом.

Роль цитоскелета хондроцитов в слиянии хондросфер. Сфероиды в контрольной группе активно сливались при непосредственном контакте друг с другом, так что представлялось затруднительным различить границы двух сфероидов уже через 24 часа. Такой же эффект наблюдался и в парах хондросфер, обработанных нокадазолом и витаферином А. Деполимеризация актиновых микрофиламентов под воздействием цитохалазина Д полностью предотвращала слияние соприкасающихся хондросфер. Одним из возможных объяснений ряда описанных наблюдений является взаимодействие филоподий, выступающих в роли инициаторов межклеточных взаимодействий в ходе слияния сфероидов. Для подтверждения данной гипотезы мы детально исследовали роль актиновых микрофиламентов в слиянии хондросфер на самых ранних стадиях.

В контактирующих клеточных мембранах на поверхности сливающихся сфероидов выявляли филоподии, ориентированные навстречу друг другу, уже через 2 часа после начала слияния (Рис. 5). По мере того как слияние прогрессировало, они способствовали замещению просветов и усилению взаимодействия между клетками. Нарушение динамики сборки микротрубочек и транслокация виментина в околядерную область не влияли на процесс слияния (Рис. 5). В то же время взаимная адгезия сфероидов, обработанных цитохалазином Д, на этом этапе была настолько низкой, что было практически невозможно зафиксировать их для дальнейшего анализа ранних этапов слияния.

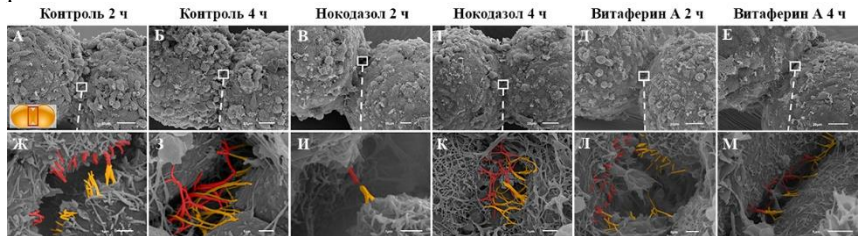


Рис. 5. Визуализация филоподий на ранних этапах слияния хондросфер, обработанных пертурбантами цитоскелета. Сканирующая электронная микроскопия, увеличение $\times 100$, размерная шкала 20 мкм (А-Е), увеличение $\times 2000$, размерная шкала 1 мкм (Ж-М).

Количественный анализ кинетики слияния также показал, что после добавления цитохалазина Д в течение всего времени культивирования у хондросфер наблюдалось значительное нарушение способности к слиянию, в отличие от других экспериментальных групп. Полученные данные ясно

демонстрируют, что в процессе слияния исключительную роль играют актиновые микрофиламенты. В ходе слияния филоподии участвуют в организации и стабилизации зон контакта соприкасающихся хондросфер. Их нарушение приводит к полному ингибированию процесса слияния как на ранних этапах, так и при дальнейшем культивировании *in vitro*.

Роль цитоскелета хондроцитов в распластывании хондросфер.

Клетки в контрольных хондросферах мигрировали с поверхности сфероидов и распластывались на адгезивном субстрате в течение 24 часов культивирования. В то же время площадь распластывания увеличилась почти в 5 раз за 24 часа и более чем в 7 раз за 32 часа в культуре в культуре. Распластывание в присутствии цитохалазина Д оказалось достаточно затруднительным. Нарушение сети актиновых микрофиламентов привело к полной неспособности сфероидов распластываться. Нарушение сети микротрубочек также оказало значительное влияние на способность сфероидов к распластыванию. Обработка нокадазолом не блокировала миграцию клеток полностью, и небольшому количеству хондроцитов удалось переместиться на адгезивный субстрат в течение первых 24 часов культивирования. Хотя площадь распластывания в этом случае увеличилась до 200% за 32 часа, она осталась значительно меньше по сравнению с контрольной группой. После обработки витаферинном А распластывание замедлилось, однако хондроциты сохранили способность мигрировать на адгезивный субстрат. Таким образом, нарушение работы любой системы цитоскелета приводило к частичному или даже полному подавлению способности сфероидов распластываться.

Роль систем цитоскелета в обеспечении биомеханических свойств хондросфер. Модули упругости 3-дневных хондросфер оценивали через 24 и 72 часа культивирования. Контрольные сфероиды продемонстрировали умеренное увеличение модулей упругости с 2,1 до 2,2 кПа. Обработка цитохалазином Д привела к резкому снижению модулей упругости примерно на 0,8 и 0,6 кПа через 24 и 72 часа культивирования. При тестировании модулей упругости в группе витаферина А не было выявлено статистически значимых различий с контрольной группой.

Наиболее интересные результаты продемонстрировали хондросферы, культивированные в присутствии нокадазола. Мы зарегистрировали значительное усиление биомеханических свойств после деполимеризации микротрубочек: модули упругости увеличились в 1,5 и 1,6 раза после культивирования в течение 24 и 72 часов, соответственно.

После оптического секционирования образцов с использованием конфокальной микроскопии было установлено, что в хондросферах обработанных нокадазолом, активная перестройка актина привела к образованию плотного актинового кольца или оболочки на периферии клеток и сфероидов, соответственно. Таким образом, деполимеризация

микротрубочек под действием нокодазола, вероятно, индуцировала полимеризацию актиновых микрофиламентов и их пространственное перестроение в клетках. Новые микрофиламенты далее служили в качестве своеобразного «щита», тем самым укрепляя сфероид и улучшая его биомеханические свойства.

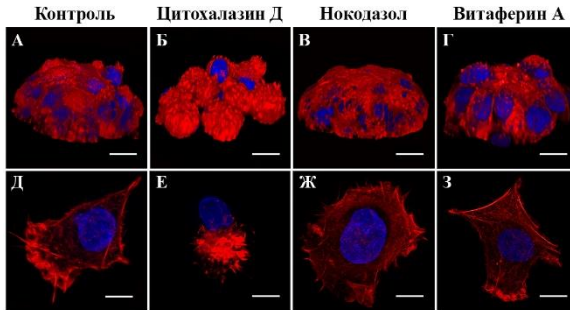


Рис. 6. Организация актиновых микрофиламентов под действием пертурбантов цитоскелета:
А, Б, В Г – хондросферы;
Д, Е, Ж, З – хондроциты.
Конфокальная микроскопия, увеличение $\times 200$, размерная шкала 10 мкм.

Таким образом, отдельные системы цитоскелета функционировали в тесном взаимодействии друг с другом, обеспечивая биомеханические свойства хондросфер.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящем исследовании представлены результаты оптимизации технологии получения хондросфер, изучения их функциональных свойств, а также структурных детерминант этих свойств.

При помещении в неадгезивные условия культивирования хондроциты за счет установления межклеточных контактов и слияния между собой формировали плотно упакованные шарообразные клеточные агрегаты – тканевые сфероиды, или хондросферы. Морфометрический анализ показал, что оптимальным методом получения хондросфер является использование планшетов с низкоадгезивным покрытием Corning Spheroid Microplates, которые позволяют получать сфероиды однородного диаметра и формы в значительных количествах в широком диапазоне концентраций, облегчают сбор сфероидов и демонстрируют потенциал к автоматизации. Подбор оптимальной концентрации клеток, при котором ограничивающими факторами выступали установленный предел пассивной диффузии кислорода и питательных веществ в неваккуляризованных тканях, с одной стороны, и максимально возможная концентрация клеток для покрытия большей площади хрящевого дефекта, с другой стороны, показал, что предпочтительной является концентрация 8000 клеток/сфероид.

Исследование синтеза и накопления компонентов внеклеточного матрикса в хондросферах как в краткосрочном, так и в долгосрочном периоде, позволило выявить сохранение хондрогенного фенотипа хондроцитов в

трехмерных условиях культивирования. Синтез коллагена II типа наблюдали уже на третий день в культуре. При длительном культивировании до 21 дня сфероиды накапливали коллаген II типа и аггрекан, при этом наибольшее их количество находилось на периферии в виде своеобразной плотной оболочки.

На ранних этапах в объеме хондросфер наблюдали незначительное количество нежизнеспособных и апоптотических хондроцитов, при этом количество мертвых клеток не превышало 4% в течение первых девяти дней культивирования. На поздних стадиях культивирования, с 14 по 21 день, ультраструктура клеток заметно нарушалась. Нарастающий паттерн клеточной дегенерации включал в себя дефекты клеточной мембраны и скопления ядерного хроматина. Заметное увеличение количества нежизнеспособных клеток наблюдали в объеме хондросфер, а также на их периферии, без локализации в центре клеточного агрегата.

Хондросферы, находящиеся в непосредственном контакте между собой, были способны сливаться друг с другом с образованием единого конструкта большего размера. Кинетика слияния хондросфер находилась в обратной зависимости от продолжительности предварительного культивирования и уровня накопления компонентов внеклеточного матрикса. При помещении на биосовместимый адгезивный субстрат хондросферы распластывались за счет активной миграции клеток, при этом корреляция между сроком культивирования и скоростью распластывания отсутствовала.

Модуль упругости, характеризующий биомеханические свойства хондросфер, постепенно увеличивался, достигая максимального значения после 21 дня культивирования. Значение модуля упругости находилось в прямой зависимости от продолжительности предварительного культивирования и уровня накопления коллагена II типа и аггрекана.

В качестве логичного продолжения систематической характеристики хондросфер были использованы пертурбанты трех систем цитоскелета, которые позволили оценить вклад актиновых микрофиламентов, микротрубочек и промежуточных филаментов хондроцитов в основные функциональные свойства хондросфер: кинетику слияния, кинетику распластывания, а также биомеханические свойства.

Исследование актинового цитоскелета показало, что именно актиновые микрофиламенты являются ключевыми структурами, управляющим морфологией, слиянием, распластыванием и поддержанием биомеханических свойств хондросфер, при этом на начальном этапе слияния исключительная роль принадлежит филоподиям, которые участвуют в организации и стабилизации зон контакта соприкасающихся сфероидов. Нарушение сети актиновых микрофиламентов приводило к полному ингибированию процесса слияния как на ранних этапах, так и при дальнейшем культивировании *in vitro*.

Интakтная сеть микротрубочек являлась необходимым условием для обеспечения способности хондросфер к распластыванию, и в то же время дезинтеграция микротрубочек не влияла на слияние и морфологию сфероидов.

Нарушение сети микротрубочек вызывало активную полимеризацию и перераспределение актина к периферии сфероидов, что приводило к значительному усилению биомеханических свойств хондросфер. Актиновые микрофиламенты и микротрубочки функционировали в тесном взаимодействии друг с другом, обеспечивая биомеханические свойства сфероидов, что подчеркивает существенный вклад данных систем цитоскелета в упругость хондросфер.

Промежуточные филаменты продемонстрировали незначительную роль в обеспечении функциональных свойств хондросфер. Перестройка сети промежуточных филаментов, обусловленная действием витаферина А, вызвала снижение скорости распластывания хондросфер, при этом хондроциты в их составе сохраняли способность мигрировать на адгезивный субстрат.

ВЫВОДЫ

1. Подобран оптимальный метод получения хондросфер, основанный на неадгезивной технологии. Фабрикация сфероидов с использованием планшетов с низкоадгезивным покрытием Corning Spheroid Microplates позволяет получать хондросферы стандартного контролируемого размера и формы в достаточных количествах и обладает потенциалом к автоматизации.
2. Установлено, что для получения хондросфер, диаметр которых не превышает предел пассивной диффузии кислорода и питательных веществ в невааскуляризованных тканях, оптимальной является концентрация, равная 8000 клеток/сфероид.
3. Хондроциты в составе сфероидов не продуцируют коллаген I типа и приобретают ярко выраженный хондрогенный фенотип. В процессе продолжительного культивирования хондросфер *in vitro* происходит синтез и накопление коллагена II типа и аггрекана, компонентов внеклеточного матрикса, специфичных для гиалинового хряща.
4. Соотношение живых и мертвых клеток в сфероидах при продолжительном культивировании постепенно уменьшается, при этом нежизнеспособные клетки вытесняются в периферическую область сфероида.
5. Обнаружена статистически значимая взаимосвязь между кинетикой слияния и продолжительностью культивирования хондросфер, а также уровнем накопления компонентов внеклеточного матрикса. Скорость слияния обратно пропорциональна времени предварительного культивирования и количеству внеклеточного матрикса в сфероидах, при этом отсутствует корреляция между сроком культивирования и скоростью распластывания.
6. Показано, что модуль упругости, характеризующий биомеханические свойства хондросфер, постепенно увеличивается, достигая максимального значения после 21 дня культивирования.
7. Установлено, что актиновый цитоскелет является основополагающим фактором, управляющим морфологией, слиянием, распластыванием и

поддержанием биомеханических свойств хондросфер. При этом микротрубочки вносят значительный вклад в способность хондросфер к распластыванию и регулируют их биомеханические свойства, но не влияют на слияние и морфологию сфероидов. Продемонстрирована незначительная роль промежуточных филаментов в контексте обеспечения функциональных свойств хондросфер.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Грядунова А. А., Буланова Е. А., Кудан Е. В., Касьянов В. А., Хесуани Ю. Д., Миронов В. А. Морфология поверхности хондросфер после обработки цитохалазином Д // Цитология. – 2021. – Т.63. – № 3. – С. 256-259. doi: 10.31857/S0041377121030044.
2. Gryadunova A.A., Koudan E.V., Rodionov S.A., Pereira F.D.A.S., Meteleva N.Y., Kasyanov V.A., Parfenov V.A., Kovalev A.V., Khesuani Y.D., Mironov V.A., Bulanov E.A. Cytoskeleton systems contribute differently to the functional intrinsic properties of chondrospheres // Acta Biomaterialia. – 2020. – Т. 118. – С. 141-152. doi: 10.1016/j.actbio.2020.10.007.
3. Koudan E.V., Gryadunova A.A., Karalkin P.A., Korneva J.V., Meteleva N.Y., Babichenko I.I., Volkov A.V., Rodionov S.A., Parfenov V.A., Pereira F.D.A.S., Khesuani Y.D., Mironov V.A., Bulanov E.A. Multiparametric Analysis of Tissue Spheroids Fabricated from Different Types of Cells // Biotechnology Journal. – 2020. – Т. 4. – № 1. – С. 53-60. doi: 10.1089/3dp.2016.0044.
4. Omelyanenko N.P., Karalkin P.A., Bulanov E.A., Koudan E.V., Parfenov V.A., Rodionov S.A., Knyazeva A.D., Kasyanov V.A., Babichenko I.I., Chkadua T.Z., Khesuani Y.D., Gryadunova A.A., Mironov V.A. Extracellular Matrix Determines Biomechanical Properties of Chondrospheres during Their Maturation In Vitro // Cartilage. – 2020. – Т. 11. – № 4. – С. 521-531. doi: 10.1177/1947603518798890.
5. Gryadunova A.A., Mironov V.A. Structural Determinants of Biomechanical Properties of Chondrospheres // «EMBO | EMBL Symposia Mechanical Forces in Development». Heidelberg. Germany. – 2019. –С. 81.
6. Грядунова А.А., Родионов С.А., Кудан Е.В., Хесуани Ю.Д., Миронов В.А., Буланова Е.А. Пертурбанты цитоскелета влияют на слияние и распластывание хондросфер // Гены & Клетки. – 2019. – Т. 14 (Приложение). – С. 74.
7. Gryadunova A.A., Bulanov E.A., Koudan E.V., Parfenov V.A., Pereira F.D.A.S., Chernikov V.P., Kasyanov V.A., Khesuani Y.D., Mironov V.A. Effects of Cytochalasin D on Chondrospheres Biomechanical Properties and Tissue Fusion. Сборник научных трудов научной конференции с международным участием «III Сеченовский Международный Биомедицинский Саммит 2019 (SIBS-2019)». Москва, Россия. – 2019. – С. 22-23.

8. Gryadunova A.A., Mironov V.A. Estimation of Biomechanical Properties of Tissue Spheroids: Tensiometry // «EMBO | EMBL Symposia Mechanical Forces in Development». Heidelberg, Germany. – 2019. – С. 82.
9. Грядунова А.А., Буланова Е.А., Кудан Е.В., Перейра Ф.Д.А.С., Хесуани Ю.Д., Миронов В.А. Масштабируемая биофабрикация и морфологическая оценка тканевых сфероидов // Клиническая и экспериментальная морфология. – 2019. – Т. 8. – № 2. – С. 12-20. doi: 10.31088/2226-5988-2019-30-2-12-20
10. Gryadunova A.A., Bulanova E.A., Koudan E.V., Karalkin P.A., Pereira F., Parfenov V.A., Khesuani Y., Mironov V.A. Structural Determinants of Material Properties of Chondrospheres // 1st TERMIS – EU Workshop in collaboration with ISBF «3D Printing in Musculoskeletal Tissue Engineering». Warsaw, Poland. – 2018. – С. 39.
11. Gryadunova A., Koudan E., Parfenov V., Karalkin P., Kurishev A., Vakhrushev I., Bulanova E., Khesuani Y., Mironov V. Biofabrication and Phenotyping of Chondrospheres for Cartilage Repair. Сборник научных трудов научной конференции с международным участием «II Сеченовский Международный Биомедицинский Саммит 2018 (SIBS-2018)». Москва, Россия. – 2018. – С. 44.
12. Koudan E.V., Korneva J.V., Karalkin P.A., Gladkaya I.S., Gryadunova A.A., Mironov V.A., Khesuani Y.D., Bulanova E.A. The Scalable Standardized Biofabrication of Tissue Spheroids from Different Cell Types Using Nonadhesive Technology // 3D Printing and Additive Manufacturing. – 2017. – Т. 15. – № 5. – С. 1900217. doi: 10.1002/biot.201900217.
13. Грядунова А.А. Хондросферы как строительные блоки для биофабрикации хряща. Сборник научных трудов VII Международного молодежного медицинского конгресса «Санкт-Петербургские научные чтения – 2017». Санкт-Петербург, Россия. – 2017. – С. 393-394.
14. Gryadunova A.A., Mironov V.A. Tensiometric Estimation of Material Properties of Chondrospheres // Гены & Клетки. – 2017. – Т. 12. – № 3. – С. 13-14.
15. Parfenov V., Karalkin P., Bulanova E., Koudan E., Pereira F., Gryadunova A., Knyaseva A., Kasyanov V., Chernikov V., Korneva J., Hesuani Yu., Mironov V. Tensiometric estimation of material properties of tissue spheroids // «Biofabrication for Hierarchical in Vitro Tissue Models». Vienna, Austria. – 2017.
16. Грядунова А.А. Новый тканевой инжектор, использующийся для замещения хрящевых дефектов // Кафедра травматологии и ортопедии. Спецвыпуск. Тезисы конгресса «Медицина чрезвычайных ситуаций. Современные технологии в травматологии и ортопедии». Москва, Россия. – 2016. – С. 133-134.