

DOI: <https://doi.org/10.17816/gc641935>

Фенотипическое сходство сфероидов нативных хондроцитов и сфероидов хондроцитов, дифференцированных из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека с помощью рекомбинантных факторов TGF- β 1 и BMP2

Е.С. Ручко, П.А. Голубинская, А.С. Пикина, А.А. Барина, А.В. Еремеев

Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины имени академика Ю.М. Лопухина Федерального медико-биологического агентства, Москва, Россия

АННОТАЦИЯ

Обоснование. Хронические заболевания суставов представляют значительную медико-социальную проблему из-за своей распространённости, частой инвалидизации пациентов и сопутствующих экономических потерь. Возможные терапевтические подходы включают клеточные технологии с использованием хондроцитов пациента, которые получают операционно и перед трансплантацией наращивают в культуре *in vitro*. В последнее время всё чаще применяют 3D-технику культивирования хондроцитов — в виде сфероидов, что позволяет лучше сохранить функциональное состояние хондроцитов и обеспечивает условия для более качественного созревания хрящевой ткани. Тем не менее количество и качество собственных хондроцитов пациента может быть недостаточным, чтобы произвести достаточное количество клеточного материала для полной компенсации обширных дефектов суставного хряща. Альтернативным источником клеток могут стать хондроциты, полученные путём дифференцировки индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК).

Цель исследования — иммунофенотипическое сравнение сфероидов нативных хондроцитов и сфероидов хондроцитов, дифференцированных из ИПСК человека.

Материалы и методы. В статье приведены подробные протоколы получения сфероидов нативных хондроцитов и сфероидов хондроцитов, дифференцированных из ИПСК с использованием мини-биореакторов и рекомбинантных факторов TGF- β 1 и BMP2. При помощи иммуноцитохимического окрашивания и количественной полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией мы сравнили сфероиды нативных хондроцитов и сфероиды хондроцитов, дифференцированных из ИПСК, по экспрессии основных хондроцитарных генов: агреккана (*ACAN*), коллагенов I и II типов (*COL1A2* и *COL2A1*) и ключевого транскрипционного фактора *SOX9*.

Результаты. Уровни экспрессии хондроцитарных генов в сфероидах хондроцитов, дифференцированных из ИПСК, практически не отличались от нативных хондроцитов, за исключением достоверно повышенной экспрессии коллагена I типа (*COL1A2*).

Заключение. Применение сфероидов хондроцитов, дифференцированных из ИПСК, может стать перспективным подходом для терапии хронических заболеваний суставов.

Ключевые слова: хондроциты; клеточные сфероиды; индуцированные плюрипотентные стволовые клетки; тканевая инженерия; суставной хрящ; хондрогенез.

Как цитировать:

Ручко Е.С., Голубинская П.А., Пикина А.С., Барина А.А., Еремеев А.В. Фенотипическое сходство сфероидов нативных хондроцитов и сфероидов хондроцитов, дифференцированных из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека с помощью рекомбинантных факторов TGF- β 1 и BMP2 // Гены и клетки. 2025. Т. 20, № 1. С. 41–53. DOI: <https://doi.org/10.17816/gc641935>

DOI: <https://doi.org/10.17816/gc641935>

Phenotypic similarity of spheroids of native chondrocytes and spheroids of chondrocytes differentiated from human induced pluripotent stem cells using recombinant factors TGF- β 1 and BMP2

Evgenii S. Ruchko, Polina A. Golubinskaya, Arina S. Pikina, Anna A. Barinova, Artem V. Ereemeev

Lopukhin Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine of Federal Medical Biological Agency, Moscow, Russia

ABSTRACT

BACKGROUND: Chronic joint diseases represent a significant medical and social problem due to their high prevalence, frequent patient disability, and associated economic losses. Potential therapeutic approaches include cell-based technologies utilizing autologous chondrocytes, which are surgically harvested and expanded *in vitro* before transplantation. Recently, the 3D chondrocyte culturing technique in the form of spheroids has been increasingly used, as it better preserves the functional state of chondrocytes and creates favorable conditions for high-quality cartilage maturation. However, the quantity and quality of autologous chondrocytes may be insufficient to generate an adequate amount of cellular material to fully repair large articular cartilage defects. An alternative cell source could be chondrocytes derived from induced pluripotent stem cells.

AIM: To perform an immunophenotypic comparison of spheroids composed of native chondrocytes and spheroids of chondrocytes differentiated from human induced pluripotent stem cells.

MATERIALS AND METHODS: This study presents detailed protocols for generating spheroids of native chondrocytes and spheroids of induced pluripotent stem cells–derived chondrocytes using mini-bioreactors and recombinant TGF- β 1 and BMP2 factors. Using immunocytochemical staining and quantitative reverse transcription polymerase chain reaction, we compared native chondrocyte spheroids and spheroids of chondrocytes differentiated from induced pluripotent stem cells in terms of the expression of key chondrogenic genes: aggrecan (*ACAN*), collagen types I (*COL1A2*) and II (*COL2A1*), and the key transcription factor *SOX9*.

RESULTS: The expression levels of chondrogenic genes in induced pluripotent stem cells–derived chondrocyte spheroids closely resembled those in native chondrocyte spheroids, except for a significantly increased expression of type I collagen (*COL1A2*).

CONCLUSION: The use of induced pluripotent stem cells–derived chondrocyte spheroids represents a promising approach for the treatment of chronic joint diseases.

Keywords: chondrocytes; cellular spheroids; induced pluripotent stem cells; tissue engineering; articular cartilage; chondrogenesis.

To cite this article:

Ruchko ES, Golubinskaya PA, Pikina AS, Barinova AA, Ereemeev AV. Phenotypic similarity of spheroids of native chondrocytes and spheroids of chondrocytes differentiated from human induced pluripotent stem cells using recombinant factors TGF- β 1 and BMP2. *Genes & cells*. 2025;20(1):41–53. DOI: <https://doi.org/10.17816/gc641935>

Received: 16.11.2024

Accepted: 26.12.2024

Published online: 04.03.2025

ВВЕДЕНИЕ

Гиалиновый хрящ суставов ежедневно подвергается значительным нагрузкам и может быть повреждён в результате травм, воспалительного процесса и дегенеративных процессов, связанных со старением. Гиалиновый хрящ является аваскулярной соединительной тканью с низким собственным регенеративным потенциалом, и для восстановления его дефектов в настоящее время всё чаще используют технологии регенеративной медицины [1]. Ряд таких технологий основан на клеточной терапии, примером которой может служить одобренная Управлением по контролю качества пищевых продуктов и лекарственных средств США (Food and Drug Administration, FDA) в 2016 году процедура матрикс-индуцированной аутологичной имплантации хондроцитов (matrix associated autologous chondrocyte implantation, MACI). В данной процедуре у пациента забирают фрагмент здоровой суставной ткани, из которой выделяют хондроциты, и после размножения *in vitro* их трансплантируют в область суставного дефекта на подложке [2]. Несмотря на продемонстрированную клиническую эффективность MACI, данной технологии присущ ряд недостатков, включая инвазивность процедуры забора материала, ограниченный объём хрящевой ткани, получаемой при биопсии, низкий пролиферативный потенциал клеток и постепенную потерю фенотипа хондроцитов при пассировании в условиях двумерной (2D) культуры клеток. Подобные проблемы 2D-культур хондроцитов частично решаются путём культивирования их в трёхмерных (3D) условиях. Так, культуры хондросфер, которые представляют собой 3D-клеточные агрегаты, полученные из хондроцитов различного происхождения, характеризуются меньшей степенью дедифференцировки и более высоким содержанием маркёров гиалинового хряща [3].

Технологии 3D-культивирования клеток, в том числе хондроцитов, развиваются уже длительное время и имеют значительный потенциал к применению как в фундаментальных биологических исследованиях, так и в регенеративной медицине [4, 5]. Сфероиды, полученные из аутологичных хондроцитов, могут быть использованы в терапевтических целях при дегенерации хрящевой ткани [6]. Показано, что в сфероидных культурах значительно повышен пролиферативный потенциал клеток при сохранении их фенотипа, функциональной активности и экспрессии ключевых генов [7, 8]. В случае хондроцитов метод 3D-культивирования имитирует процесс мезенхимальной конденсации на ранней стадии развития хряща [9, 10]. Существует множество методов получения сфероидов, основные из которых: метод висячей капли [11], центрифугирование суспензии клеток определённой плотности [12], самоагрегация в сфероиды в суспензионных культурах [13], формирование в U-образных микролуночных планшетах [14] и методы с применением различных биоматериалов [15]. Сформированные 3D-клеточные

агрегаты можно эффективно культивировать *in vitro* в динамических условиях, например в орбитальном шейкере [16].

В ряде случаев, например при длительном применении некоторых нестероидных противовоспалительных препаратов, глюкокортикоидов, а также при использовании химио- или радиотерапии, регенеративный потенциал хрящевой ткани может быть практически полностью утрачен [17]. Утрата регенеративного потенциала ведёт к невозможности получения аутологичного клеточного материала и, соответственно, применения ряда методов коррекции патологий хрящевой ткани с помощью клеточных технологий.

В качестве одного из клеточных источников для восстановления хрящевой ткани стоит отметить мезенхимальные стромальные клетки (МСК) как за их способность к дифференцировке в хондроциты, так и за иммуномодулирующие свойства, низкую иммуногенность и секретом, богатый различными биоактивными молекулами — цитокинами, хемокинами, гликопротеинами, факторами роста и т.п. Применение МСК достаточно безопасно, поскольку не было зарегистрировано серьёзных побочных явлений. При этом МСК, введённые путём внутрисуставной инъекции или артроскопической имплантации, могут значительно облегчить боль и улучшить функцию сустава [18]. Однако высокая гетерогенность МСК даже среди популяции клеток, полученных из одного типа ткани, риск оссификации и кратковременность хоминга в повреждённой ткани подчёркивают необходимость дальнейшего тщательного исследования потенциала этих клеток и разработки улучшенных методов терапии на их основе [19].

Сфероиды, которые получают из хондроцитов, дифференцированных из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК), представляют собой иную перспективную альтернативу хондроцитам из тканей доноров [20]. Основные преимущества использования ИПСК связаны с их неограниченной способностью к самообновлению, потенциалом к дифференцировке в широкий ряд клеточных типов, а также с тем, что для их получения не требуется применения сложных и болезненных хирургических процедур. Хондроциты, дифференцированные из ИПСК, не всегда можно охарактеризовать как полностью зрелые. Часто наблюдаются различия в их способности производить специфические для хряща компоненты внеклеточного матрикса (ВКМ), такие как коллаген II типа и агрекан, даже при повторении одного протокола дифференцировки. В нашей работе мы выбрали протокол дифференцировки ИПСК [21], который имитирует естественный процесс развития хрящевой ткани, включая индукцию мезодермы при помощи малых молекул, хондрогенную дифференцировку при помощи рекомбинантных факторов TGF- β 1 (трансформирующий фактор роста β 1, transforming growth factor β 1) и BMP2 (костный морфогенетический белок 2, bone morphogenetic protein 2) с последующим созреванием в условиях *in vitro* 3D-культивирования.

Цель исследования заключалась в фенотипическом сравнении сфероидов нативных хондроцитов и сфероидов хондроцитов, дифференцированных из ИПСК человека.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Культивирование плюрипотентных стволовых клеток

Из фибробластов здорового донора (мужчина, 60 лет) были получены ИПСК линии IPSRG4S (UEF-3B). Репрограммирование проводили путём трансдукции фибробластов вирусом Сендай, который содержал гены факторов

плюрипотентности *KLF4*, *MYC*, *SOX2* и *POU5F1* [22]. ИПСК культивировали в 6-луночных планшетах, предварительно покрытых Матригелем (Corning, США) (рис. 1, *a*). Среда для культивирования ИПСК состояла из комбинации сред TeSR-1 (STEMCELL Technology, Канада) и «ГибриС-8» («ПанЭко», Россия) в соотношении 1:3, с добавлением 100 Ед./мл раствора пенициллина/стрептомицина («ПанЭко», Россия). Пассирование клеток производили при достижении конфлюэнтной плотности клеточного монослоя 80%. Клетки сеяли в концентрации 50–75 тыс. на 1 см². Для этого за 2–3 ч до посева ИПСК переводили на среду, содержащую 10 мкМ ингибитора Rho киназы Y27632 (Miltenyi Biotec, Германия). Клетки промывали раствором

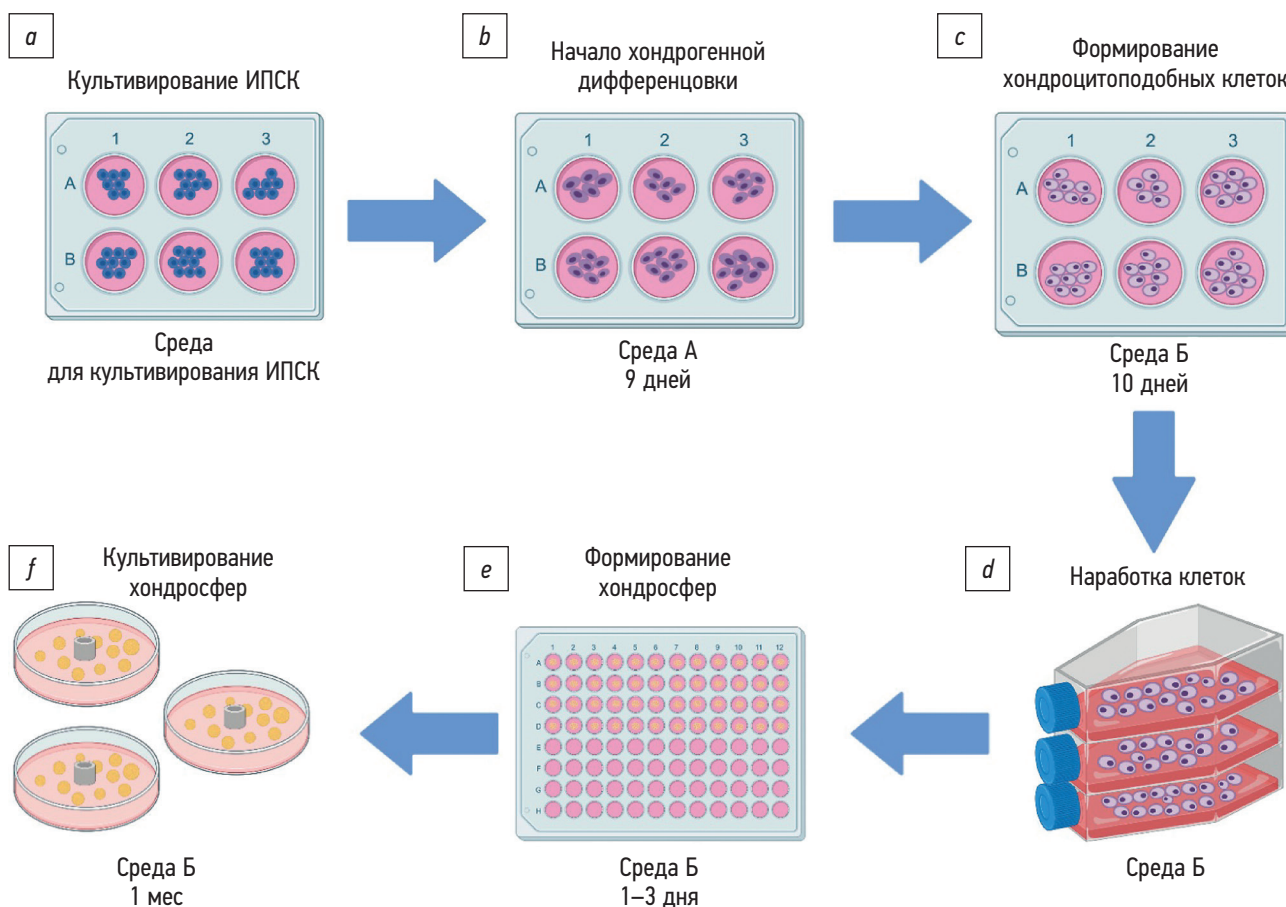


Рис. 1. Схема протокола получения сфероидов хондроцитов, дифференцированных из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК) линии IPSRG4S: *a* — культивирование ИПСК в среде для плюрипотентных стволовых клеток до достижения клетками 80% конфлюэнтной плотности; *b* — культивирование ИПСК на среде А в течение 2 дней для индукции дифференцировки в хондроцитарном направлении, затем — в среде А без Chir 99021 и ингибитора Rho киназы Y27632 в течение следующих 6 дней с заменой среды каждые 2 дня; *c* — культивирование ИПСК в среде Б для индукции хондрогенеза на следующие 10 дней культивирования; *d* — этап наработки достаточного количества клеток для начала стадии получения сфероидов (*e*) и агрегация клеток в сфероиды в условиях низкой адгезии под действием силы тяжести; *f* — культивирование полученных сфероидов в мини-биореакторах в среде Б.

Fig. 1. Scheme of the protocol for the production of spheroids of chondrocytes differentiated from induced pluripotent stem cells (iPSC) line IPSRG4S: *a* — initially, iPSCs are cultured on commercial media for pluripotent stem cells until cells reach 80% confluency; *b* — at the next stage for induction of differentiation in the chondrocytic direction iPSCs are cultured on medium A for 2 days, then the medium is changed and cultured in medium without Chir 99021 and Rho kinase inhibitor Y27632 for the next 6 days, changing the medium every 2 days; *c* — then cells are transferred to medium B to facilitate chondrogenesis for the next 10 days of cultivation; *d* — sufficient number of cells is generated to start the spheroids production stage (*e*) and the cells are aggregated into spheroids in low-adhesive conditions under gravity; *f* — obtained spheroids are cultured in mini-bioreactors in medium B.

Хэнкса («ПанЭко», Россия) и инкубировали при 37 °С с 0,05% раствором трипсина. Для инактивации трипсина добавляли двойной объём среды DMEM (Dulbecco modified Eagle's medium) («ПанЭко», Россия), содержащий 10% фетальной бычьей сыворотки (fetal bovine serum, FBS) (HyMedia, Индия). Суспензию клеток центрифугировали в течение 5 мин при 200 g. Отбирали супернатант и ресуспендировали клетки в среде для культивирования ИПСК. Для повышения выживаемости ИПСК в среду добавляли ингибитор Rho киназы Y27632 (Miltenyi Biotec, Германия) в конечной концентрации 10 мкМ. Через 12 ч среду меняли на аналогичную по составу без добавления ингибитора Rho киназы.

Хондрогенная дифференцировка индуцированных плюрипотентных стволовых клеток

Для инициации мезодермальной дифференцировки ИПСК культивировали в течение первых двух дней в среде А (информация о компонентах, входящих в состав среды А, представлена в табл. 1). После формирования мезодермы для индукции хондрогенной дифференцировки на 3-й день производили замену среды на свежую среду А, не содержащую Chir 99021 и ингибитор Rho киназы Y27632. Все остальные компоненты, участвующие в стимулировании перехода мезодермальных клеток в хондрогенные предшественники, оставляли неизменными. Замену среды производили каждые два дня в течение 3–9 дней (рис. 1, b).

На 10-й день наблюдали формирование клеточной культуры хондроцитоподобных клеток, для стимулирования созревания и поддержания хондроцитарного фенотипа начинали культивирование клеток в среде Б, подробный состав которой описан также в табл. 1. Замену среды производили каждые 2 дня в течение 10 дней (рис. 1, c). К 12-му дню культивирования клеток в среде Б переходили к этапу наработки необходимого для формирования сфероидов числа клеток. Для этого клетки снимали с 6-луночного планшета с помощью 0,05% раствора трипсина и переносили в пробирку объёмом 15 мл, предварительно заполненную средой DMEM и 10% FBS, центрифугировали 5 мин при 200 g. Удаляли супернатант, ресуспендировали клетки в 1 мл среды Б и переносили в культуральный флакон площадью 75 см², предварительно покрытый 0,1% раствором желатина (рис. 1, d). Как только монослой клеток достигал конфлюентной плотности 80% (около 1,5–2,0 млн хондроцитов или хондроцитов, дифференцированных из ИПСК, для культурального флакона площадью 75 см²), переходили к формированию сфероидов, предварительно сняв клетки с помощью 0,05% раствора трипсина и ресуспендировав их в среде Б.

Формирование сфероидов

За 1 день до начала этапа получения сфероидов готовили 96-луночный планшет, в каждую лунку которого

Таблица 1. Составы сред, которые использовали для дифференцировки индуцированных плюрипотентных стволовых клеток в хондроциты

Table 1. Composition of media used for the differentiation of induced pluripotent stem cells into chondrocytes

Компоненты для среды А	Концентрация
Advanced DMEM/F12	90%
L-аланил-L-глутамин	2 мМ
Раствор пенициллина/стрептомицина	100 Ед./мл
Эмбриональная бычья сыворотка	10%
Инсулин-трансферрин-селенит	Инсулин — 10 мкг/мл Трансферрин — 5,5 мкг/мл Селенит — 5 нг/мл
β-меркаптоэтанол	90 мМ
Аскорбиновая кислота	50 мкг/мл
CHIR99021	10 мкМ
Ингибитор Rho киназы Y27632	10 мкМ
Ретиноевая кислота	10 нМ
B-27	2%
Компоненты для среды Б	Концентрация
Advanced DMEM/F12	90%
L-аланил-L-глутамин	2 мМ
Раствор пенициллина/стрептомицина	100 Ед./мл
Эмбриональная бычья сыворотка	10%
Инсулин-трансферрин-селенит	Инсулин — 10 мкг/мл Трансферрин — 5,5 мкг/мл Селенит — 5 нг/мл
Аскорбиновая кислота	50 мкг/мл
BMP2	10 нг/мл
TGF-β1	10 нг/мл

вносили по 75 мкл 1,5% агарозы («ПанЭко», Россия), приготовленной на дистиллированной воде. Агарозу плавил в микроволновой печи при мощности 700 Вт и доводили до кипения в течение примерно 60–90 с. Добавляли 75 мкл расплавленной агарозы в каждую лунку и оставляли планшет при комнатной температуре до застывания агарозы на 15 мин. Затем добавляли 150 мкл среды DMEM в каждую лунку с агарозой и помещали планшет в CO₂-инкубатор минимум на 12 ч.

После полимеризации агарозы нативные хондроциты или хондроциты, дифференцированные из ИПСК, снимали с помощью 0,25% раствора трипсина и переносили в пробирку объёмом 15 мл, предварительно заполненную

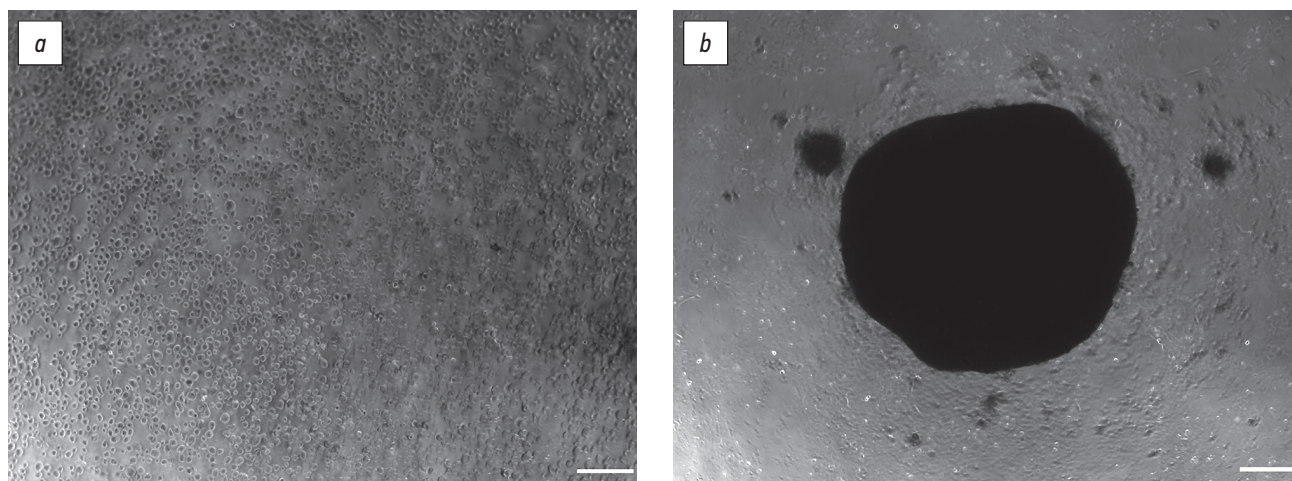


Рис. 2. Процесс формирования сфероидов хондроцитов, дифференцированных из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток линии IPSRG4S, в лунках 96-луночного планшета: *a* — начало формирования сфероидов; *b* — сформированный сфероид на 2-й день культивирования. Бар — 200 мкм.

Fig. 2. Process of spheroid formation chondrocytes differentiated from induced pluripotent stem cells line IPSRG4S in the wells of a 96-well plate: *a* — the beginning of spheroid formation; *b* — the formed spheroid on day 2 of cultivation. The scale bar size is 200 μm .

средой DMEM с 10% FBS, центрифугировали 5 мин при 200 g. Удаляли супернатант, ресуспендировали клетки в 1 мл среды Б и переносили в 96-луночные планшеты, покрытые 1,5% агарозы. Для формирования одного сфероидов требуется 100 тыс. клеток. Культивировали клетки в 96-луночном планшете, покрытом 1,5% агарозой, в течение 1–3 дней в среде Б, добавляя по 150 мкл полной среды на лунку (рис. 2, *a*), пока не начинали наблюдать формирование сфероидов (рис. 2, *b*). Переносили сфероиды из лунок в пробирку с помощью обрезанного наконечника объёмом 1 мл или пипетки Пастера объёмом 3 мл. Затем отбирали надосадочную жидкость, дав сфероидам осесть в течение 2–3 мин. Сфероиды погружали в свежеразмороженный неразбавленный Матригель (Corning, США) при температуре 4 °С. Через 30 мин отбирали осадок сфероидов, полученный либо путём пассивной седиментации в пробирке объёмом 15 мл, либо путём центрифугирования в течение 1 мин при 100 g. Сфероиды переносили в мини-биореакторы и добавляли 6 мл среды Б. Метод получения мини-биореакторов описан в нашей предыдущей статье [23]. Затем биореакторы помещали на орбитальный шейкер в CO₂-инкубатор. Температура поддерживалась на уровне 37 °С, концентрация CO₂ 5%, влажность 100%, скорость перемешивания 70–75 об./мин (рис. 1, *f*). Замену среды производили еженедельно, при испарении или по мере необходимости, учитывая цвет кислотно-основного индикатора, без использования центрифугирования, путём пассивной седиментации.

Выделение и культивирование нативных хондроцитов

Хондроциты выделяли из ненагруженных участков хряща пациентов, перенёсших тотальное эндопротезирование коленного сустава. Всего клеточные культуры хондроцитов были выделены от 17 пациентов. Для дальнейшего

анализа случайным образом были отобраны 3 клеточные культуры. Все образцы собирали в стерильных условиях и хранили в стерильных пробирках, наполненных средой DMEM с добавлением 200 Ед./мл раствора пенициллина/стрептомицина («ПанЭко», Россия). До использования хрящевую ткань хранили в холодильнике при температуре 2–8 °С. Затем начинали ферментативную обработку не позднее чем через 2 дня после сбора хрящевой ткани. Промывали кусочки хряща в растворе Хэнкса («ПанЭко», Россия). С помощью стерильных скальпеля и пинцета разрезали хрящ на небольшие фрагменты диаметром около 1–2 мм. Полученные фрагменты ткани переносили в 15 мл пробирки и добавляли 2–5 мл 0,01% раствора коллагеназы II типа (Worthington Biochemical, США), растворённой в среде DMEM. Ферментативную обработку проводили в течение 8–12 ч при 37 °С, при постоянном перемешивании на шейкере 150–200 об./мин. Отмывали фрагменты хряща от раствора фермента путём добавления эквивалентного объёма чистой среды DMEM в пробирку, содержащую фрагменты хряща, и центрифугировали при 300 g в течение 10 мин. Супернатант отбирали. Осадок, включая кусочки хряща, ресуспендировали в среде для культивирования хондроцитов. Данная среда состояла из базовой среды Advanced DMEM/F12 (Thermo Fisher Scientific, США) с добавлением 10% FBS, 2 мМ раствора L-аланил-L-глутамин (Thermo Fisher Scientific, США), 100 Ед./мл раствора пенициллина/стрептомицина («ПанЭко», Россия). Затем высевали клетки в культуральные флаконы с адгезивной поверхностью, предварительно покрытые 0,1% раствором желатина («ПанЭко», Россия). Для пассирования культуральные флаконы с хондроцитами промывали раствором Хэнкса («ПанЭко», Россия), затем добавляли 0,25% раствор трипсина, смешанный с раствором Версена (1:1) («ПанЭко», Россия) и инкубировали при 37 °С в течение 5 мин. Для инактивации трипсина добавляли двойной объём среды DMEM

с 10% FBS. Затем хондроциты ресуспендировали в среде для культивирования хондроцитов и рассеивали в плотности клеток 20–30 тыс. на 1 см².

Полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией

Для оценки уровня экспрессии хондроцитарных генов использовали метод полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР). Для этого 1 млн клеток (около 10–15 сфероидов) лизировали в RLT-буфере (QIAGEN, Германия) и выделяли РНК с помощью набора RNeasy Plus Mini Kit (QIAGEN, Германия) в соответствии с протоколом производителя. Концентрацию РНК в образце измеряли с помощью планшетного ридера Infinite 200 Pro (Tecan, Швейцария) в планшете для определения микроколичеств нуклеиновых кислот. Для синтеза комплементарной ДНК (кДНК) использовали набор MMLV RT kit («Евроген», Россия). Синтез кДНК выполняли в соответствии с протоколом производителя. Для проведения ОТ-ПЦР готовили реакционную смесь, состоящую из 5 мкл 5× qPCRmix-HS SYBR («Евроген», Россия), 0,8 мкл 10 мМ прямого и обратного праймеров (табл. 2), 18,2 мкл воды и 1 мкл матрицы кДНК. ОТ-ПЦР выполняли с помощью амплификатора CFX96 (Bio-Rad, США). В качестве референсного гена использовали ген *YWHAZ*, кодирующий белок активации тирозин-3-монооксигеназы/триптофан-5-монооксигеназы, полипептид гамма. В один биологический повтор входило 3 технических повтора. Результаты анализировали в программе Microsoft Excel (Microsoft, США) по методу $\Delta\Delta Ct$ [24].

Статистическая обработка результатов полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией

Статистическую обработку проводили с помощью программы GraphPad Prism 10 (GraphPad Software, Inc., США). Для проверки нормальности распределения признака применяли тест Шапиро–Уилка. В качестве метода сравнения использовали однофакторный дисперсионный анализ ANOVA с тестом множественных сравнений Тьюки. Различия между группами считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Оценка экспрессии хондроцитарных генов с помощью иммуноцитохимического анализа

Монослойные культуры фиксировали в 10% забуференном формалине («Синтакон», Россия) в течение 15 мин, затем трижды промывали 0,01 М фосфатно-солевого буферного раствора (phosphate-buffer saline, PBS) и инкубировали в течение 20 мин в 0,1% растворе Triton-X100 (Sigma-Aldrich, США). После пермеабиллизации образцы инкубировали в течение 30 мин в блокирующем буфере на основе 0,01 М PBS («ПанЭко», Россия) с 3% сыворотки козы и 0,1% Tween 20 (Sigma-Aldrich, США). Затем образцы окрашивали первичными антителами

Таблица 2. Праймеры, которые применяли для оценки уровня экспрессии хондроцитарных генов

Table 2. Primers for the measurement of the expression level of chondrocyte genes

Ген	Праймеры, использованные в исследовании 5'-3'	Размер продукта, п.н.
<i>ACAN</i>	F: AGGAGTCCTGACCTGGTTT R: CCTGACAGATCTGCCTCTCC	167
<i>COL1A2</i>	F: AGGGTGAGACAGGCGAACA R: CCGTTGAGTCCATCTTTGC	184
<i>COL2A1</i>	F: TGGACGCCATGAAGGTTTCT R: CCATTGATGGTTCTCCAAACC	142
<i>SOX9</i>	F: GAAGTCGGTGAAGAACGGGC R: CACGTCGCGGAAGTCGATAG	283
<i>YWHAZ</i>	F: ACTTTTGGTACATTGTGGCTTCAA R: CCGCCAGGACAAACCAGTAT	94

производства Invitrogen (США) против агрекана (mouse, 1:500), коллагена I типа (rabbit, 1:800), SOX9 (rabbit, 1:400), а также коллагена II типа (rabbit, 1:200; Abcam, Великобритания). Инкубирование с раствором первичных антител на основе блокирующего раствора проводили в течение 1,5 ч при комнатной температуре. Затем культуры трижды промывали 0,01 М PBS. Для окрашивания вторичными антителами использовали Alexa Fluor 555 (goat, anti-rabbit, 1:500) и Alexa Fluor 546 (goat, anti-human, 1:500) производства Invitrogen (США). Окрашивание проводили в течение 1 ч в темноте. Затем культуры трижды промывали 0,01 М PBS. Для окрашивания ядер использовали 100 нг/мл DAPI (Sigma-Aldrich, США). Окрашивание выполняли в течение 15 мин, затем культуры трижды промывали 0,01 М PBS (Sigma-Aldrich, США). Анализ окрашенных препаратов производили с помощью флуоресцентного микроскопа Olympus IX53F (Olympus, Япония). При анализе изображений использовали программное обеспечение для морфометрии CellSens Standard (Olympus, Япония). Культуры сфероидов фиксировали в 10% забуференном формалине («Синтакон», Россия) в течение 30 мин, затем трижды промывали 0,01 М PBS. Сфероиды заливали жидкостью для заморозки ткани (Leica Microsystems, Германия), инкубировали в течение 1 ч при 4 °С, замораживали в парах жидкого азота и готовили срезы толщиной 7 мкм с помощью криомикротомы Cryotome™ FSE (Thermo Fisher Scientific, США). Затем проводили иммуноцитохимическое исследование аналогично протоколу для монослойных культур, начиная с этапа пермеабиллизации.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В данной работе мы проводили фенотипическое сравнение сфероидов нативных хондроцитов и сфероидов хондроцитов, полученных направленной дифференцировкой из ИПСК. В начале протокола для индукции

дифференцировки ИПСК в клетки мезодермальной природы и дальнейшего формирования предшественников хондроцитов ИПСК культивировали в среде А, в состав которой входили CHIR99021, ретиноевая и аскорбиновая кислоты. На следующем этапе для усиления эффективности хондрогенной дифференцировки прогениторных клеток в хондроциты в среду Б были добавлены рекомбинантные факторы роста BMP2 и TGF- β 1. Для создания условий, поддерживающих длительное культивирование и морфогенез, полученные хондроциты из ИПСК агрегировали в сфероиды и культивировали в условиях 3D-культуры клеток с использованием мини-биореакторов в среде с рекомбинантными факторами BMP2 и TGF- β 1 (рис. 3). Анализ с использованием иммуноцитохимического окрашивания продемонстрировал, что дифференцировка ИПСК в хондроцитарном направлении, проводимая в среде, дополненной 10 нг/мл BMP2 и 10 нг/мл TGF- β 1, обеспечивает получение клеток с хондроцитарным фенотипом, которые по уровню экспрессии

ключевых для хондроцитов генов (*ACAN*, *COL2A1* и *SOX9*) близки к нативным хондроцитам, выделенным из хрящевой ткани пациентов. Уже спустя 19 дней от начала исполнения протокола в 2D-культурах хондроцитов, дифференцированных из ИПСК, отмечаются высокие уровни экспрессии данных маркёров, близкие к нативным хондроцитам (см. рис. 2).

Сфероиды на протяжении двух месяцев культивирования демонстрировали стабильный рост, достигнув диаметра 3–4 мм, что свидетельствовало о благоприятных условиях для клеточного взаимодействия, пролиферации и синтеза ВКМ как в образцах хондроцитов, дифференцированных из ИПСК (рис. 4, е), так и в образцах нативных хондроцитов (рис. 4, ж). Через 2 мес культивирования было обнаружено, что 99% хондроцитов, дифференцированных из ИПСК, демонстрируют высокую экспрессию основных хондрогенных генов: *ACAN*, *COL2A1* и *SOX9*, и это подтвердилось с помощью иммуноцитохимического исследования (см. рис. 4) и ОТ-ПЦР (рис. 5). Расчёты уровней экспрессии

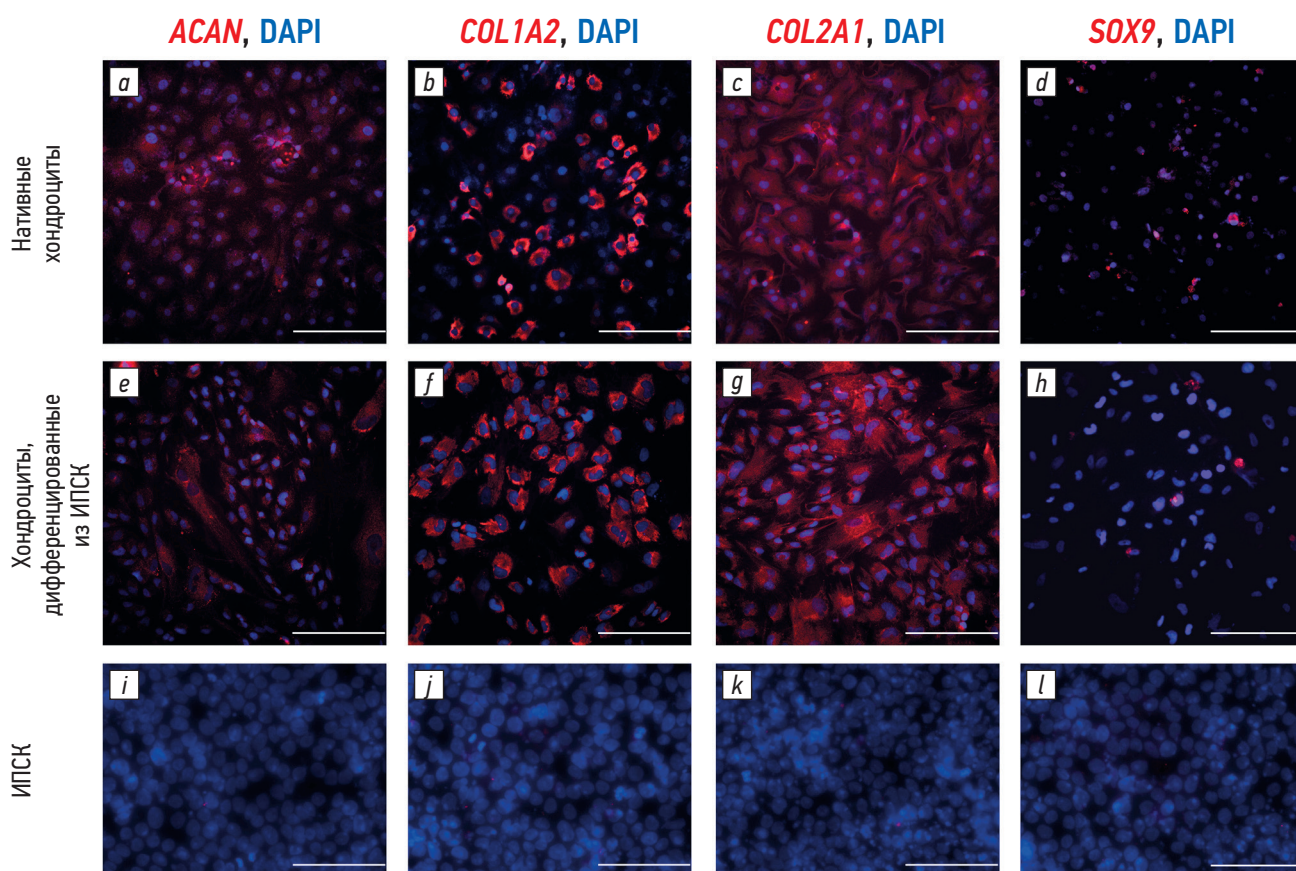


Рис. 3. Иммуноцитохимический анализ хондроцитов, полученных из разных источников. Хондроциты, дифференцированные из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК), на 19-й день от начала дифференцировки, демонстрируют схожие уровни экспрессии основных маркёрных генов хондроцитов: *e* — *ACAN*; *f* — *COL1A2*; *g* — *COL2A1*; *h* — *SOX9* — по сравнению с культурой нативных хондроцитов на 2-м пассаже: *a* — *ACAN*; *b* — *COL1A2*; *c* — *COL2A1*; *d* — *SOX9*. Клеточная культура ИПСК была взята в качестве отрицательного контроля: *i* — *ACAN*; *j* — *COL1A1*; *k* — *COL2A1*; *l* — *SOX9*. Бар — 200 мкм.

Fig. 3. Immunocytochemical analysis of chondrocytes obtained from different sources. Induced pluripotent stem cells (iPSC) chondrocyte derivatives obtained by day 19 from the start of differentiation show similar levels of expression of major chondrocyte marker genes: *e* — *ACAN*; *f* — *COL1A2*; *g* — *COL2A1*; *h* — *SOX9* compared to native chondrocyte culture at passage 2: *a* — *ACAN*; *b* — *COL1A2*; *c* — *COL2A1*; *d* — *SOX9*. The culture of iPSCs was taken as a negative control: *i* — *ACAN*; *j* — *COL1A1*; *k* — *COL2A1*; *l* — *SOX9*. The scale bar size is 200 μ m.

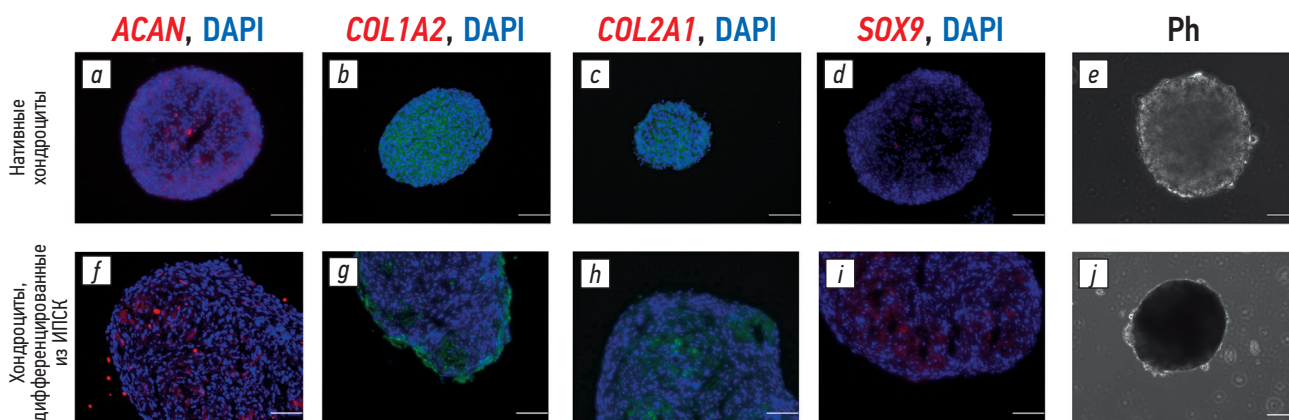


Рис. 4. Иммуноцитохимический анализ сфероидов, полученных из хондроцитов разных источников, на 30-й день от начала дифференцировки, когда сфероиды находились на стадии культивирования в мини-биореакторах. Экспрессия агрекана и коллагена II типа в образцах сфероидов из нативных хондроцитов (*a* — *ACAN*; *c* — *COL2A1*) и сфероидов хондроцитов, дифференцированных из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК) (*f* — *ACAN*; *h* — *COL2A1*), находится на одинаковом уровне. Однако сфероиды, полученные из хондроцитов, дифференцированных из ИПСК (*g* — *COL1A1*; *i* — *SOX9*), по сравнению с нативными хондроцитами (*b* — *COL1A1*; *d* — *SOX9*), характеризуются более высоким уровнем экспрессии коллагена I типа и *SOX9*. Морфология сфероидов, полученных из нативных хондроцитов (*e*) и сфероидов хондроцитов, дифференцированных из ИПСК (*j*) на стадии культивирования в мини-биореакторах. Бар — 100 мкм.

Fig. 4. Immunocytochemical analysis of spheroid generated from chondrocytes different sources. ICC analysis was performed at day 30 from the start of differentiation when the spheroids were at the stage of culturing in mini-bioreactors. The expression of aggrecan and collagen II type in spheroid samples from native chondrocytes (*a* — *ACAN*; *c* — *COL2A1*) and spheroid of chondrocytes differentiated from induced pluripotent stem cells (iPSC) (*f* — *ACAN*; *h* — *COL2A1*) is at a similar level. However, spheroids of chondrocytes differentiated from iPSCs (*g* — *COL1A1*; *i* — *SOX9*), as compared to native chondrocytes (*b* — *COL1A1*; *d* — *SOX9*), are characterised by higher expression levels of collagen I type and *SOX9*. Morphology of spheroids generated from native chondrocytes (*e*) and spheroids of chondrocytes differentiated from iPSCs (*j*) at the stage of cultivation in mini-bioreactors. The scale bar size is 100 μ m.

генов методом $\Delta\Delta C_t$ подтвердили, что их значение было близко к уровням, характерным для зрелых нативных хондроцитов. Это подчёркивает способность полученных из ИПСК клеток формировать гиалиноподобный хрящ (см. рис. 5). Тем не менее, несмотря на положительные результаты дифференцировки, статистически значимое повышение экспрессии гена *COL1A2* в сфероиде хондроцитов, дифференцированных из ИПСК, по сравнению с нативными хондроцитами указывает на присутствие клеток, характерных для волокнистого хряща (см. рис. 5). Экспрессия *ACAN*, *COL2A1* и *SOX9* достоверно не отличалась между образцами сфероидов хондроцитов, дифференцированных из ИПСК, и нативных хондроцитов, но была статистически значимо выше наблюдаемой в образцах недифференцированных ИПСК.

ОБСУЖДЕНИЕ

Нативные хондроциты функционально являются полностью зрелыми клетками, которые после выделения и культивирования *in vitro* сохраняют свойства конкретного хряща, из которого были получены, например гиалинового, волокнистого или эластичного. Как правило, нативные хондроциты синтезируют большое количество ВКМ. Выделение хондроцитов из хрящевой ткани пациента — относительно простая процедура, но она ограничена доступностью донорских тканей, необходимостью хирургического вмешательства и сложностью поддержания

клеточного фенотипа хондроцитов *in vitro*. Процесс получения ИПСК, их дифференцировка в хондроциты и в особенности обеспечение высокого качества функциональных клеток являются ещё более сложными и дорогостоящими процессами [25]. Однако использование клеточных технологий, основанных на применении ИПСК, позволяет масштабировать процесс получения клеточного материала и обеспечить гибкость в применении тканеинженерных технологий для тех пациентов, у которых пролиферативный потенциал нативных хондроцитов снижен [26].

В начале протокола, используемого в нашей работе, применение среды А позволило осуществить дифференцировку ИПСК в мезодермальном направлении, а также индуцировать формирование прогениторных предшественников хондроцитов. В состав среды А входила малая молекула CHIR99021. Она специфически ингибирует киназу GSK-3, что ведёт к накоплению β -катенина в ядре клетки и индуцирует активацию сигнального пути Wnt/ β -катенин, который регулирует формирование мезодермы в эмбриональном периоде развития млекопитающих [27]. Среда А также содержала ретиноевую кислоту, которая усиливает процесс мезенхимальной конденсации и участвует в регуляции экспрессии генов ВКМ хрящевой ткани [28], и аскорбиновую кислоту, необходимую для биосинтеза и созревания коллагена [29].

Для усиления эффективности хондрогенеза в среде Б были добавлены рекомбинантные факторы роста

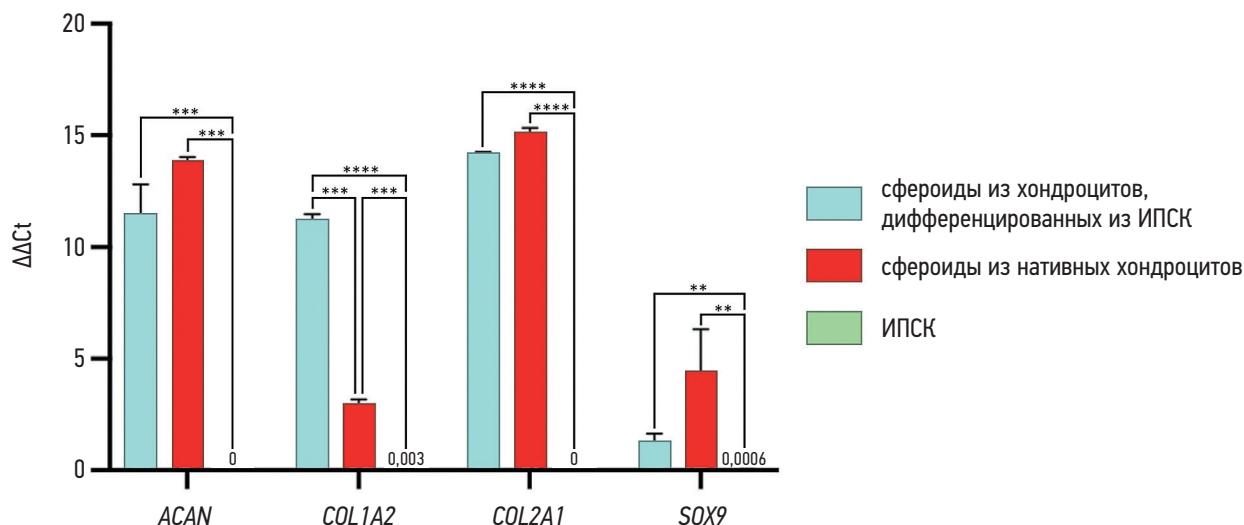


Рис. 5. Результаты анализа относительной нормализованной экспрессии хондроцитарных генов в образцах сфероидов хондроцитов, дифференцированных из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК) (1 биологический повтор) и сфероидов нативных хондроцитов (3 биологических повтора). Сфероиды ИПСК (1 биологический повтор) были взяты в качестве отрицательного контроля. Экспрессия хондроцитарных генов *ACAN*, *COL2A1* и *SOX9* значительно выше в сфероидах хондроцитов, дифференцированных из ИПСК, и сфероидах нативных хондроцитов по сравнению с контрольной группой ИПСК. Это указывает на успешную дифференцировку ИПСК в хондроцитарном направлении. Однако в группе сфероидов, которые сформированы из хондроцитов, дифференцированных из ИПСК, наблюдается значительное повышение экспрессии гена *COL1A2* по сравнению с группой сфероидов нативных хондроцитов, что свидетельствует о наличии хондроцитов, характерных для волокнистого хряща. На графиках указана статистическая значимость различий по тесту Тьюки: ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$, **** $p \leq 0,0001$.

Fig. 5. Results of relative normalized chondrocyte gene expression analysis in spheroids from chondrocytes differentiated from induced pluripotent stem cells (iPSC) (1 biological replicate) and spheroids of native chondrocytes (3 biological replicates). iPSC spheroids (1 biological repeat) were taken as a negative control. The expression levels of the chondrocytic genes *ACAN*, *COL2A1*, and *SOX9* are significantly higher in spheroids formed from chondrocytes differentiated from iPSCs and in spheroids of native chondrocytes compared to the control group of iPSCs. This result indicates successful differentiation of iPSCs toward the chondrocytic lineage. However, a significant increase in *COL1A2* gene expression was observed in the spheroids of chondrocytes differentiated from iPSCs compared to spheroids of native chondrocytes, suggesting the presence of chondrocytes with characteristics of fibrous cartilage. The graphs indicate the statistical significance of differences according to Tukey's test: ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$, **** $p \leq 0,0001$.

BMP2 и TGF- β 1. Данные факторы участвуют в активации каскада сигнального пути SMAD, который стимулирует экспрессию гена *SOX9*, непосредственно регулирующего гены *ACAN* и *COL2A1* [30]. Использование вышеописанной комбинации культуральных сред позволяет имитировать естественный процесс развития хрящевой ткани, что, по нашему мнению, значительно повышает эффективность хондрогенной дифференцировки.

Культивирование хондроцитов в условиях 3D-культуры с использованием мини-биореакторов стало важным аспектом для оптимальной пролиферации клеток. Наблюдаемый стабильный рост сфероидов хондроцитов, дифференцированных из ИПСК, и увеличение их размеров до 3–4 мм за два месяца культивирования подтверждают, что такие условия способствуют пролиферации и не противоречат дифференцировке клеток. Подобные размеры сфероидов также обеспечивают эффективное снабжение метаболитами, поддерживая клеточную активность и синтез компонентов ВКМ. Нами выявлено высокое иммунофенотипическое сходство сфероидов хондроцитов ИПСК и сфероидов нативных хондроцитов спустя 2 мес

культивирования. Наличие таких характеристик, как способность к поддержанию стабильного хондроцитарного фенотипа, высокая активность синтеза коллагена II типа и протеогликанов, в совокупности обеспечивает возможность формирования прочной и упругой хрящевой ткани, устойчивой к механическим нагрузкам (см. рис. 4). Однако стоит отметить повышенную экспрессию гена *COL1A2* в образцах сфероидов, которые получали из хондроцитов, дифференцированных из ИПСК, относительно сфероидов, агрегированных из нативных хондроцитов, что указывает на наличие внутри сфероидов структур с характеристиками как гиалинового, так и волокнистого хряща (см. рис. 5). Возможной причиной является применение в средах сыроворотки, которая, согласно некоторым данным, может обладать фибротическим эффектом, увеличивающим синтез коллагена I типа [31].

В совокупности результаты говорят об успешности использования ИПСК для получения функционально зрелых хондроцитов в виде сфероидов, которые способны к поддержанию хондроцитарного фенотипа на протяжении длительного культивирования. Высокая экспрессия

ключевых хондроцитарных генов и стабильный рост сфероидов хондроцитов, дифференцированных из ИПСК, делают их перспективными для трансплантационных целей в регенеративной медицине.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Настоящая работа демонстрирует, что дифференцировка ИПСК в хондроцитарном направлении с последующим формированием 3D-сфероидов является перспективным подходом к созданию клеточного продукта, пригодного для трансплантации и терапии поврежденных суставов. Применение рекомбинантных факторов, таких как TGF- β 1 и BMP2, обеспечивает эффективную индукцию экспрессии ключевых хондроцитарных генов (*ACAN*, *COL2A1*, *SOX9*), что подтверждает зрелость и функциональность полученных сфероидов. Устойчивая экспрессия хондроцитарных генов при длительном культивировании в мини-биореакторах указывает на стабильность клеточного фенотипа и качество синтеза ВКМ. Особенно важно, что хондроциты, дифференцированные из ИПСК, проявляют фенотипическое сходство с нативными хондроцитами и демонстрируют способность к формированию гиалиноподобного хряща, подходящего для несущих нагрузку суставов. Результаты данной работы подтверждают перспективность использования ИПСК для создания хондроцитов, фенотипически схожих с клетками зрелой гиалиновой хрящевой ткани и потенциально применимых в терапии заболеваний суставов.

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Вклад авторов. П.А. Голубинская — культивирование 2D-клеточных культур, дифференцировка ИПСК, обзор литературы, сбор и анализ литературных источников, написание текста и редактирование статьи; Е.С. Ручко — получение и культивирование 3D-клеточных культур, написание текста и редактирование статьи; А.С. Пикина — постановка и анализ данных ОТ-ПЦР, написание текста и редактирование статьи; А.А. Барина — постановка иммуноцитохимического исследования, написание текста и редактирование статьи; А.В. Еремеев — руководство экспериментами, написание и редактирование статьи. Все авторы одобрили рукопись (версию для публикации), а также согласились нести ответственность за все аспекты работы, гарантируя надлежащее рассмотрение и решение вопросов, связанных с точностью и добросовестностью любой её части.

Благодарности. Авторы благодарят А.Н. Богомазову за помощь в редактировании манускрипта.

Этическая экспертиза. Проведение исследования одобрено локальным этическим комитетом Федерального научно-клинического центра физико-химической медицины имени академика Ю.М. Лопухина Федерального медико-биологического агентства (протокол № 2019/02

от 9.04.2019). Все участники исследования подписали форму информированного добровольно согласия до включения в исследование.

Согласие на публикацию. Авторы получили письменное информированное добровольное согласие пациентов по форме, утверждённой локальным этическим комитетом Федерального научно-клинического центра физико-химической медицины имени академика Ю.М. Лопухина, на публикацию персональных данных в научном журнале «Гены и клетки», включая его электронную версию. Объём публикуемых данных с пациентами согласован.

Источник финансирования. Научное исследование проведено при поддержке Российского научного фонда (грант № 22-15-00250).

Раскрытие интересов. Авторы заявляют об отсутствии отношений, деятельности и интересов за последние три года, связанных с третьими лицами (коммерческими и некоммерческими), интересы которых могут быть затронуты содержанием статьи.

Оригинальность. При создании настоящей работы авторы не использовали ранее опубликованные сведения (текст, иллюстрации, данные).

Доступ к данным. Все данные, полученные в настоящем исследовании, доступны в статье.

Генеративный искусственный интеллект. При создании настоящей статьи технологии генеративного искусственного интеллекта не использовали.

Рассмотрение и рецензирование. Настоящая работа подана в журнал в инициативном порядке и рассмотрена по обычной процедуре. В рецензировании участвовали два внешних рецензента, член редакционной коллегии и научный редактор издания.

ADDITIONAL INFORMATION

Authors' contributions. P.A. Golubinskaya — 2D cell cultures cultivation, iPSCs differentiation, literature review, collection and analysis of literature sources, writing the text and editing of the article; E.S. Ruchko — obtaining and cultivation of 3D cell cultures, writing the text and editing of the article; A.S. Pikina — performing and analysis of quantitative PCR data, writing and editing of the article; A.A. Barinova — staging of ICR, writing and editing of the article; A.V. Eremeev — experimental supervision, writing and editing of the article. All authors approved the manuscript (version for publication) and agreed to take responsibility for all aspects of the work, ensuring the proper consideration and resolution of any issues related to the accuracy and integrity of any part of the study.

Acknowledgments. The authors thank A.N. Bogomazova for her help in editing the manuscript.

Ethics approval. The study was approved by the Local Ethics Committee of the Lopukhin Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine of Federal Medical Biological Agency (Protocol No. 2019/02 dated 2019 April 9).

All study participants signed an informed consent form prior to inclusion in the study.

Consent for publication. The authors obtained written informed consent from the patients, in a form approved by the Local Ethics Committee of the Lopukhin Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine of Federal Medical Biological Agency, for the publication of personal data in a scientific journal, including its electronic version. The scope of the published data was agreed upon with the patients.

Funding source. The research was supported with an allocation No. 22-15-00250 by the Russian Science Foundation.

Disclosure of interests. The authors have no relationships, activities or interests for the last three years related with

for-profit or not-for-profit third parties whose interests may be affected by the content of the article.

Statement of originality. In the preparation of this work, the authors did not use any previously published information (text, illustrations, or data).

Data availability statement. All data obtained in this study are available in the article.

Generative AI. No generative artificial intelligence technologies were used in the preparation of this article.

Provenance and peer-review. This work was submitted to the journal on the authors' initiative and underwent the standard review process. The manuscript was reviewed by one member of the editorial board, two external reviewers and the journal's scientific editor.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

1. Medvedeva EV, Grebenik EA, Gornostaeva SN, et al. Repair of damaged articular cartilage: current approaches and future directions. *Int J Mol Sci.* 2018;19(8):2366. doi: 10.3390/ijms19082366 EDN: YBORYD
2. Carey JL, Remmers AE, Flanigan DC. Use of MACI (Autologous Cultured Chondrocytes on Porcine Collagen Membrane) in the United States: Preliminary Experience. *Orthop J Sports Med.* 2020;8(8):2325967120941816. doi: 10.1177/2325967120941816 EDN: LMRFLF
3. Chu YY, Hikita A, Asawa Y, Hoshi K. Advancements in chondrocyte 3-dimensional embedded culture: implications for tissue engineering and regenerative medicine. *Biomed J.* 2024. doi: 10.1016/j.bj.2024.100786 EDN: NQFVPY
4. Zhang Z, McCaffery JM, Spencer RG, Francomano CA. Hyaline cartilage engineered by chondrocytes in pellet culture: histological, immunohistochemical and ultrastructural analysis in comparison with cartilage explants. *J Anat.* 2004;205(3):229–237. doi: 10.1111/j.0021-8782.2004.00327.x
5. Cacciamali A, Villa R, Dotti S. 3D cell cultures: evolution of an ancient tool for new applications. *Front Physiol.* 2022;13:836480. doi: 10.3389/fphys.2022.836480 EDN: UNAZBE
6. Guo X, Xi L, Yu M, et al. Regeneration of articular cartilage defects: Therapeutic strategies and perspectives. *J Tissue Eng.* 2023;14:20417314231164765. doi: 10.1177/20417314231164765 EDN: NRLTCH
7. Duval K, Grover H, Han LH, et al. Modeling physiological events in 2D vs. 3D cell culture. *Physiology (Bethesda).* 2017;32(4):266–277. doi: 10.1152/physiol.00036.2016
8. Ravi M, Paramesh V, Kaviya SR, et al. 3D cell culture systems: advantages and applications. *J Cell Physiol.* 2015;230(1):16–26. doi: 10.1002/jcp.24683
9. Gionet-Gonzales MA, Leach JK. Engineering principles for guiding spheroid function in the regeneration of bone, cartilage, and skin. *Biomed Mater.* 2018;13(3):034109. doi: 10.1088/1748-605X/aab0b3
10. Kim J, Tomida K, Matsumoto T, Adachi T. Spheroid culture for chondrocytes triggers the initial stage of endochondral ossification. *Biotechnol Bioeng.* 2022;119(11):3311–3318. doi: 10.1002/bit.28203 EDN: OWZXGN
11. Ruedel A, Hofmeister S, Bosserhoff AK. Development of a model system to analyze chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *Int J Clin Exp Pathol.* 2013;6(12):3042–3048.
12. Jang Y, Jung H, Ju JH. Chondrogenic differentiation induction of adipose-derived stem cells by centrifugal gravity. *J Vis Exp.* 2017;(120):54934. doi: 10.3791/54934
13. He H, He Q, Xu F, et al. Dynamic formation of cellular aggregates of chondrocytes and mesenchymal stem cells in spinner flask. *Cell Prolif.* 2019;52(4):e12587. doi: 10.1111/cpr.12587 EDN: LBOUSQ
14. Fürsatz M, Gerges P, Wolbank S, Nürnberger S. Autonomous spheroid formation by culture plate compartmentation. *Biofabrication.* 2021;13(3):10.1088/1758-5090/abe186. doi: 10.1088/1758-5090/abe186 EDN: DFFXDE
15. Lee NH, Bayaraa O, Zechu Z, Kim HS. Biomaterials-assisted spheroid engineering for regenerative therapy. *BMB Rep.* 2021;54(7):356–367. doi: 10.5483/BMBRep.2021.54.7.059 EDN: CIRXKU
16. Limraksasin P, Kosaka Y, Zhang M, et al. Shaking culture enhances chondrogenic differentiation of mouse induced pluripotent stem cell constructs. *Sci Rep.* 2020;10(1):14996. doi: 10.1038/s41598-020-72038-y EDN: KHATGS
17. Salzmänn GM, Niemeyer P, Hochrein A, et al. Articular cartilage repair of the knee in children and adolescents. *Orthop J Sports Med.* 2018;6(3):2325967118760190. doi: 10.1177/2325967118760190 EDN: VFTOUU
18. Zha K, Li X, Yang Z, et al. Heterogeneity of mesenchymal stem cells in cartilage regeneration: from characterization to application. *NPJ Regen Med.* 2021;6(1):14. doi: 10.1038/s41536-021-00122-6 EDN: XAYMLH
19. Levy O, Kuai R, Siren EMJ, et al. Shattering barriers toward clinically meaningful MSC therapies. *Sci Adv.* 2020;6(30):eaba6884. doi: 10.1126/sciadv.aba6884 EDN: WKXTSK
20. Abe K, Yamashita A, Morioka M, et al. Engraftment of allogeneic iPS cell-derived cartilage organoid in a primate model of articular cartilage defect. *Nat Commun.* 2023;14(1):804. doi: 10.1038/s41467-023-36408-0 EDN: FDJHXR
21. Eremeev AV, Pikina AS, Ruchko ES, et al. Fabrication of cartilage tissue substitutes from cells with induced pluripotency. *Medicine*

of Extreme Situations. 2022;4:30–41. doi: 10.47183/mes.2022.037 EDN: WKQYHL

22. Holmqvist S, Lehtonen Š, Chumarina M, et al. Creation of a library of induced pluripotent stem cells from Parkinsonian patients. *NPJ Parkinsons Dis*. 2016;2:16009. doi: 10.1038/nnpjarkd.2016.9 EDN: DWPFQD

23. Eremeev A, Belikova L, Ruchko E, et al. Brain organoid generation from induced pluripotent stem cells in home-made mini bioreactors. *J Vis Exp*. 2021;(178):10.3791/62987. doi: 10.3791/62987 EDN: EOFSOK

24. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method. *Methods*. 2001;25(4):402–408. doi: 10.1006/meth.2001.1262

25. Abe K, Yamashita A, Morioka M, et al. Engraftment of allogeneic iPSC cell-derived cartilage organoid in a primate model of articular cartilage defect. *Nat Commun*. 2023;14(1):804. doi: 10.1038/s41467-023-36408-0 EDN: FDJHXR

26. Ali EAM, Smaida R, Meyer M, et al. iPSCs chondrogenic differentiation for personalized regenerative medicine:

a literature review. *Stem Cell Res Ther*. 2024;15(1):185. doi: 10.1186/s13287-024-03794-1 EDN: BQFASJ

27. Loh KM, van Amerongen R, Nusse R. Generating cellular diversity and spatial form: wnt signaling and the evolution of multicellular animals. *Dev Cell*. 2016;38(6):643–655. doi: 10.1016/j.devcel.2016.08.011 EDN: XTWTSN

28. Kawata M, Mori D, Kanke K, et al. Simple and robust differentiation of human pluripotent stem cells toward chondrocytes by two small-molecule compounds. *Stem Cell Reports*. 2019;13(3):530–544. doi: 10.1016/j.stemcr.2019.07.012

29. Pinnell SR. Regulation of collagen biosynthesis by ascorbic acid: a review. *Yale J Biol Med*. 1985;58(6):553–559.

30. Wu M, Wu S, Chen W, Li YP. The roles and regulatory mechanisms of TGF- β and BMP signaling in bone and cartilage development, homeostasis and disease. *Cell Res*. 2024;34(2):101–123. doi: 10.1038/s41422-023-00918-9 EDN: UIRBMF

31. Wu CL, Dicks A, Steward N, et al. Single cell transcriptomic analysis of human pluripotent stem cell chondrogenesis. *Nat Commun*. 2021;12(1):362. doi: 10.1038/s41467-020-20598-y EDN: TUVBGM

ОБ АВТОРАХ

* Ручко Евгений Сергеевич;

адрес: Россия, 119435, Москва, ул. Малая Пироговская, д. 1а;
ORCID: 0000-0002-1361-666X;
eLibrary SPIN: 7220-6031;
e-mail: ruchkoevgeny@yandex.ru

Голубинская Полина Александровна, канд. мед. наук;

ORCID: 0000-0002-1765-9042;
eLibrary SPIN: 5299-9693;
e-mail: polinapigeon@gmail.com

Пикина Арина Сергеевна;

ORCID: 0000-0002-8967-2318;
eLibrary SPIN: 8654-7318;
e-mail: arina.pikina@yandex.ru

Баринова Анна Александровна;

ORCID: 0009-0001-1212-8154;
eLibrary SPIN: 1955-4313;
e-mail: barinova.anna.al@mail.ru

Еремеев Артём Валерьевич, канд. биол. наук;

ORCID: 0000-0002-3428-7586;
eLibrary SPIN: 4825-5440;
e-mail: art-eremeev@yandex.ru

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author

AUTHORS' INFO

* Evgenii S. Ruchko;

address: 1a Malaya Pirogovskaya st, Moscow, Russia, 119435;
ORCID: 0000-0002-1361-666X;
eLibrary SPIN: 7220-6031;
e-mail: ruchkoevgeny@yandex.ru

Polina A. Golubinskaya, MD, Cand. Sci. (Medicine);

ORCID: 0000-0002-1765-9042;
eLibrary SPIN: 5299-9693;
e-mail: polinapigeon@gmail.com

Arina S. Pikina;

ORCID: 0000-0002-8967-2318;
eLibrary SPIN: 8654-7318;
e-mail: arina.pikina@yandex.ru

Anna A. Barinova;

ORCID: 0009-0001-1212-8154;
eLibrary SPIN: 1955-4313;
e-mail: barinova.anna.al@mail.ru

Artem V. Eremeev, Cand. Sci. (Biology);

ORCID: 0000-0002-3428-7586;
eLibrary SPIN: 4825-5440;
e-mail: art-eremeev@yandex.ru