

ПОЛУЧЕНИЕ ХРЯЩЕПОДОБНЫХ СТРУКТУР ИЗ СТЕВЛОВЫХ КЛЕТОК С ИНДУЦИРОВАННОЙ ПЛЮРИПОТЕНТНОСТЬЮ

А. В. Еремеев^{1,3}✉, А. С. Пикина^{1,2}, Е. С. Ручко^{1,3}, В. С. Сидоров¹, А. О. Рагозин¹¹ Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины Федерального медико-биологического агентства, Москва, Россия² Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова, Москва, Россия³ Институт биологии развития имени Н. К. Кольцова, Москва, Россия

Одним из подходов для решения проблемы восстановления хрящевой ткани является использование клеточных технологий с применением ИПСК, обладающих большим потенциалом к дифференцировке и являющихся неограниченным источником клеточного материала для тканевой инженерии. Однако стандартизированных протоколов хондрогенной дифференцировки ИПСК нет. Целью работы было получить хрящеподобные образцы ткани с помощью метода 3D-культивирования сфероидов с использованием четырех протоколов хондрогенной дифференцировки, сравнить характеристики хрящеподобных образцов, полученных с помощью разных протоколов, и определить наиболее эффективный способ дифференцировки. ИПСК дифференцировали по хондрогенному пути с помощью четырех протоколов («долгий», «короткий», «комбинированный», с кондиционированной средой от первичной культуры аутологичных хондроцитов) при различном сочетании факторов TGFβ1, BMP2, Chir 99021 и PK. Для получения сфероидов использовали планшеты с микролунами. Профили синтеза и экспрессии оценивали с помощью методов иммуноцитохимического окрашивания, ПЦР в реальном времени, а также гистологического окрашивания. Высокие показатели синтеза и экспрессии хондрогенных маркеров Sox9, агрекана, коллагена II типа наблюдали в сфероидах «долгого», «комбинированного» протоколов и протокола с кондиционированной средой. Хондрогенез наиболее эффективно проходит при использовании «комбинированного» протокола дифференцировки. Высокую эффективность показало также использование кондиционированной среды для индукции и поддержания хондрогенной дифференцировки.

Ключевые слова: тканевая инженерия, суставной хрящ, индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (ИПСК), сфероиды, хондрогенез**Финансирование:** работа выполнена при поддержке РНФ #22-15-00250.**Благодарности:** авторы благодарят член-корр. РАН М. А. Лагарькову за предоставление научной базы для проведения исследования.**Вклад авторов:** А. В. Еремеев — дизайн эксперимента, общее руководство, написание статьи; А. С. Пикина — обзор литературы, сбор материала, участие в экспериментальной части работы, анализ полученных данных; Е. С. Ручко — участие в экспериментальной части работы; В. С. Сидоров, А. О. Рагозин — предоставление материала для эксперимента.**Соблюдение этических стандартов:** работа выполнена с соблюдением принципов Хельсинкской декларации Всемирной медицинской организации (2000 г.) и последующих ее пересмотров.✉ **Для корреспонденции:** Артём Валерьевич Еремеев
ул. Малая Пироговская, д. 1а, 119435, г. Москва, Россия; art-eremeev@yandex.ru**Статья получена:** 12.10.2022 **Статья принята к печати:** 28.10.2022 **Опубликована онлайн:** 23.11.2022**DOI:** 10.47183/mes.2022.037

FABRICATION OF CARTILAGE TISSUE SUBSTITUTES FROM CELLS WITH INDUCED PLURIPOTENCY

Eremeev AV^{1,3}✉, Pikina AS^{1,2}, Ruchko ES¹, Sidorov VS¹, Ragozin AO¹¹ Federal State Budgetary Institution Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine of the Federal Medical Biological Agency, Moscow, Russia² Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia³ Koltzov Institute of Developmental Biology, Moscow, Russia

One of the approaches to cartilage tissue restoration problem relies on cellular technologies that use iPSCs, induced pluripotency stem cells that are an unlimited source of cellular material for tissue engineering with significant differentiation potential. However, there are no standardized protocols for chondrogenic differentiation of iPSCs. This study aimed to make cartilage tissue samples using 3D spheroid cultures and following four chondrogenic differentiation protocols, then compare characteristics of the cartilage samples made under different protocols and isolate the most effective way of differentiation. The iPSCs were differentiated chondrogenically, the four protocols were "long", "short", "combined" and with conditioned medium from a primary culture of autologous chondrocytes; the combinations of TGFβ1, BMP2, Chir 99021, and PK factors varied. Microwell plates were used to make spheroids. Immunocytochemical staining, real-time PCR and histological staining enabled assessment of the synthesis and expression profiles. High rates of synthesis and expression of chondrogenic markers Sox9, aggrecan, type II collagen were observed in spheroids experimented with under the "long", "combined" protocols and the conditioned medium protocol. The "combined" differentiation protocol made chondrogenesis most effective, and conditioned medium was highly efficient in inducing and supporting chondrogenic differentiation.

Keywords: tissue engineering, articular cartilage, induced pluripotency stem cells (iPSCs), spheroids, chondrogenesis**Funding:** the study was supported with an allocation #22-15-00250 by the Russian Science Foundation.**Acknowledgments:** the authors thank Corresponding Member of the Russian Academy of Sciences M.A. Lagarkova for providing research facilities for the study**Author contribution:** Eremeev AV — design of the experiment, general guidance, article authoring; Pikina AS — literature review, collection of the material, participation in the experimental part of the work, analysis of the resulting data; Ruchko ES — participation in the experimental part of the work; Sidorov VS, Ragozin AO — provision of material for the experiment.**Compliance with ethical standards:** the study was performed in conformity with the principles of the Declaration of Helsinki (2000) and its subsequent revisions.✉ **Correspondence should be addressed:** Artem V. Eremeev
Malaya Pirogovskaya, 1a, 119435, Moscow, Russia; art-eremeev@yandex.ru**Received:** 12.10.2022 **Accepted:** 28.10.2022 **Published online:** 23.11.2022**DOI:** 10.47183/mes.2022.037

Ткань гиалинового хряща обладает достаточно низкой способностью к заживлению из-за особенностей своей организации. В связи с этим большая часть дефектов хряща, вызванных травмами, очаговыми поражениями или процессами дегенерации без должной терапии прогрессирует до таких заболеваний, как, например, артроз, что негативно влияет на качество жизни. Многообещающий подход для решения этой проблемы — применение клеточных технологий, позволяющих компенсировать потерю функционально активных клеток в зоне повреждения ткани и вызывающих эффективное заживление.

Такая клеточная терапия в клинике проводится уже более 10 лет компанией CO.DON (Германия), в которой лечение поврежденных суставных хрящей реализуется с использованием аутологичных хондроцитов, что позволяет получить фенотипически стабильный хрящ при заживлении [1–3]. Однако трансплантация аутологичных хондроцитов хоть и является доказанным успешным методом восстановления повреждений гиалинового хряща, но достаточно инвазивна: для получения донорского материала необходимо проведение биопсии [4, 5]. Кроме того, из-за ограниченного количества клеточного материала требуется длительное культивирование, при котором имеется риск потери клетками хондрогенных свойств и их дифференцировки в фибробласты, что может привести к фиброзу после трансплантации [4, 5]. В связи с этими недостатками выбор альтернативных клеточных ресурсов особенно актуален.

Одним из перспективных клеточных источников на данный момент являются индуцированные плюрипотентные

клетки (ИПСК). Благодаря таким свойствам, как плюрипотентность, широкий потенциал дифференцировки во все типы соматических клеток, включая хондроциты, а также неограниченная способность к самообновлению, ИПСК имеют сходство с эмбриональными стволовыми клетками (ЭСК), при этом их получение не связано с этическими проблемами [4, 6, 7]. В технологии получения ИПСК могут быть использованы любые соматические клетки организма [5, 8]. Хондроциты, дифференцированные из ИПСК, проявляют ювенильный фенотип, что выражается в высокой скорости пролиферации и усиленной выработке внеклеточного матрикса (ВКМ). Данная особенность способствует более эффективному заживлению суставных дефектов [4, 5]. Таким образом, ИПСК представляют собой перспективный источник клеток, позволяющий получить большое количество биоматериала для клеточных технологий. Однако, несмотря на большое число исследований, отсутствует стандартизированный протокол, обеспечивающий качественную дифференцировку по хондрогенному пути [9]. Активно используется метод направленной дифференцировки, что в грубом приближении воспроизводит события хондрогенеза [10]. При этом чаще применяют рекомбинантные белки, соответствующие основным хондроиндукторам в процессах развития, а также их различные комбинации (рис. 1).

Для дифференцировки по хондрогенному пути *in vitro* широко применяют белки надсемейства трансформирующего фактора роста — (TGFβ), такие как, собственно, TGFβ и семейство костных морфогенетических

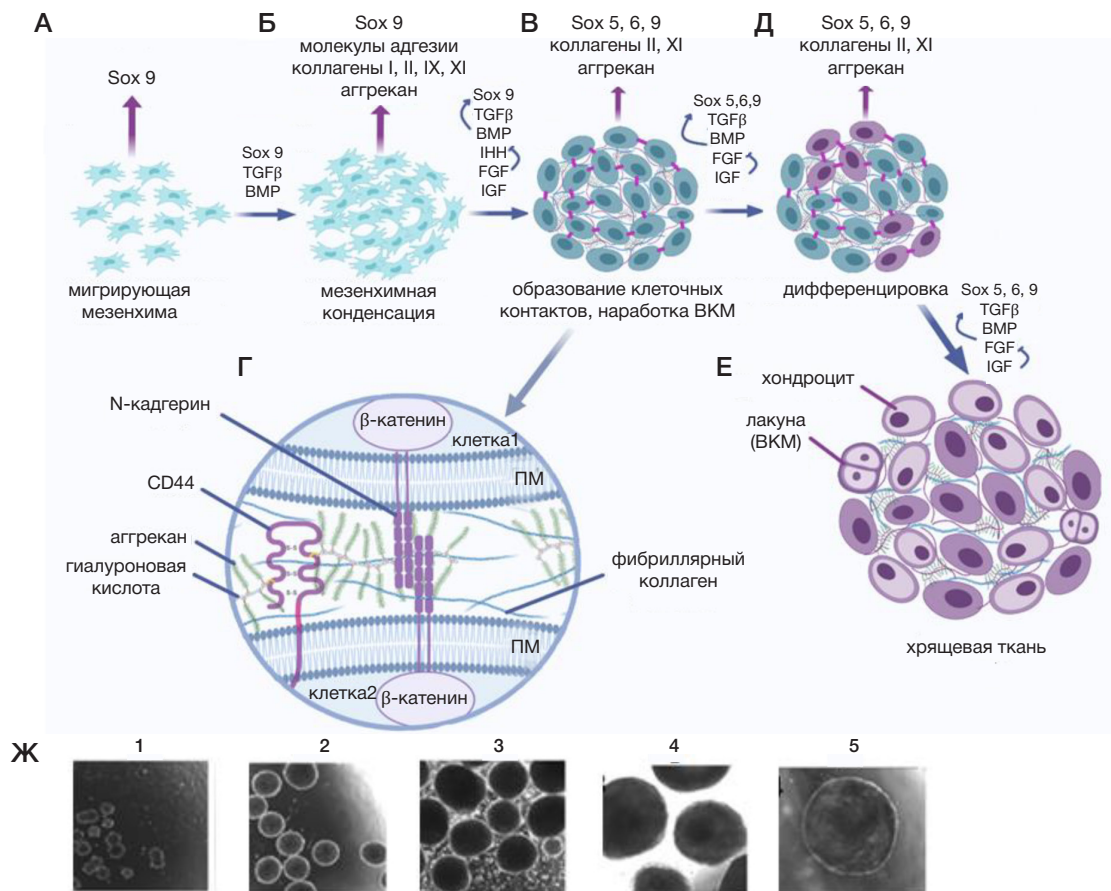


Рис. 1. Общая схема процессов хондрогенеза. **А.** Миграция мезенхимы. **Б.** Прехондрогенная мезенхимная конденсация. **В.** Образование клеточных контактов, синтез ВКМ. **Г.** Межклеточное пространство и микроокружение дифференцирующихся клеток. **Д.** Начало дифференцировки по хондрогенному пути. **Е.** Образование хрящевой ткани. **Ж.** Фотографии, полученные методом фазово-контрастной микроскопии 1-5 — внешний вид сфероидов через 1, 2, 3, 4 и 5 недель культивирования после перевода их в условия 3D-культивирования. Увеличение X100

белков (BMP2). В исследовании, где в качестве фактора дифференцировки использовали только TGFβ3, в культурах ИПСК наблюдали неполный хондрогенез [11]. Более качественные результаты были получены в работах с применением комбинации TGFβ1 и BMP2 [12]. Еще одним подходом к увеличению эффективности хондрогенеза *in vitro* является включение предварительного этапа дифференцировки в МСК-подобную популяцию клеток. Эту стратегию использовали в «классическом» протоколе [3] с предварительной индукцией мезенхимных предшественников с помощью Wnt3a и Активина А. Затем проводили хондрогенную индукцию с помощью TGFβ1 и BMP2, что позволило получить хрящеподобные структуры с высокой экспрессией хондрогенных маркеров и низким уровнем гипертрофии. Тот же протокол, но с увеличенным временем культивирования, тоже привел к результатам, демонстрирующим эффективный хондрогенез, а при подкожной пересадке полученных структур мыши образовывался хрящ ювенильного фенотипа с большим содержанием протеогликанов [4]. Ретиноевая кислота (РК) и ретиноиды необходимы для развития конечностей, поскольку отвечают за активацию Нох-генов, участвующих в определении области формирования зачатка [13]. Так, комбинация Chir 99021 (6-[[2-[[4-(2,4-дихлорфенил)-5-(5-метил-1Н-имидазол-2-yl)-2-пиримидинил]амино]этил]амино]-3-пиридинкарбонитрил — ингибитор киназы гликоген-синтазы-3 (GSK-3)) и РК *in vitro* способствовала направленной дифференцировке в хондроциты за короткие сроки [14]. К тому же низкомолекулярные соединения достаточно просты в использовании, эффективно доставляются в клетки и неиммуногенны [15].

Стандартный подход 2D-культивирования не соответствует естественному окружению клеток и значительно ограничивает дифференцировку [16]. Клетки в условиях как *in vivo*, так и *in vitro*, нуждаются в трехмерном окружении.

Одним из распространенных методов 3D-культивирования и дифференцировки клеток является получение сфероидов [17, 18]. Было продемонстрировано, что использование культур сфероидов значительно улучшает пролиферацию клеток с сохранением фенотипа и ключевых сигналов [16, 19]. К тому же данная методика 3D-культивирования имитирует процесс мезенхимной конденсации в раннем развитии хряща [20]. Способы получения сфероидов разнообразны и включают метод висячей капли [21, 22], центрифугирования суспензии клеток определенной плотности [23–25], самоагрегации в сфероиды в суспензионных культурах [2], с помощью планшетов с U-образными лунками или микролунками [26–28], а также с использованием биоматериалов [29, 30]. Готовые

конструкции эффективно культивировать в динамических условиях, например на орбитальном 3D-шейкере [8].

В этой работе образцы хрящеподобной ткани создавали методом 3D-культивирования сфероидов при использовании четырех различных протоколов, два из которых разработаны нашей лабораторией. Основной целью исследования было выявить и сравнить особенности полученных конструкций и определить наиболее эффективный способ дифференцировки.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Культуры ИПСК

В работе использовали линию ИПСК FD4S, которая ранее была получена из фибробластов кожи человека с применением по методу, описанному в работе (41), с использованием неинтеграционного вектора вируса Сендай, несущего гены транскрипционных факторов OCT3/4, SOX2, KLF4 и C-MYC. Клетки были криоконсервированы при температуре –80 °С.

Культивирование проводили при 37 °С и 5% CO₂ в смеси ростовых сред без фидера mTeSR1 (STEMCELL Technologies; Канада) и Essential 8 (Thermo Fisher Scientific; США) в соотношении 1 : 3 с добавлением 40 мкг/мл антибиотика гентамицина («ПанЭко»; Россия). Смену среды проводили раз в сутки. При достижении клетками монослоя культуру пассировали в соотношении 1 : 3, для улучшения жизнеспособности клеток после данной процедуры использовали 10 мкМ ингибитора Rock-киназы Y27632 (StemMACS, Miltenyi Biotec; Германия).

Протоколы дифференцировки

Хондрогенную дифференцировку ИПСК проводили с тестированием четырех протоколов (табл. 1):

- «долгий» [3];
- «короткий» [14];
- «комбинированный»;
- с кондиционированной средой.

В качестве положительного контроля использовали культуры хондроцитов человека, а также фрагменты суставного хряща человека. В качестве отрицательного контроля — культуры ИПСК и 3D-структуры из них.

Монослойные культуры

Монослойные культуры ИПСК дифференцировали в течение 7 суток при использовании базовой среды Advanced DMEM (Gibco, Thermo Fisher Scientific; США)

Таблица 1. Протоколы хондрогенной дифференцировки

Название протокола	Дифференцировка (35 суток)	
	В монослойной культуре (7 суток)	В 3D-культуре (28 суток)
«Долгий»	TGFβ1, BMP2, FBS 10%	
«Короткий»	Chir 99021, RA — 2 суток PK — 5 суток	Базовая среда с добавками
«Комбинированный»		TGFβ1, BMP2, FBS 10%
С кондиционированной средой		Кондиционированная среда из-под хондроцитов, GlutaMAX
Контрольные группы		
Положительный контроль	Базовая среда с добавками, FBS 15%	Базовая среда с добавками, FBS 10%
Отрицательный контроль	TeSR1, Essential8 (1 : 3)	Базовая среда без добавок

с добавлением 10 нг/мл bFGF (STEMCELL Technologies; Канада), 100× GlutaMAX (Gibco, Thermo Fisher Scientific; США), 50× B27 (Gibco, Thermo Fisher Scientific; США), 1% инсулин-трансферрин-селенита (ИТС) («ПанЭко»; Россия), 50 мкг/мл аскорбиновой кислоты (Sigma Aldrich; США), 50 мкМ β-меркаптоэтанола, 5 мкг/мл плазмоцина, гентамицина («ПанЭко»; Россия) и 40 мкг/мл раствора гентамицина («ПанЭко»; Россия).

Для дифференцировки по «долгому» протоколу к базовой среде добавляли также 10 нг/мл TGFβ1 (Miltenyi Biotec; Германия), 10 нг/мл BMP2, 10% FBS. По «короткому», «комбинированному» протоколам и протоколу с кондиционированной средой — 10 мкМ Chir 99021 (Miltenyi Biotec; Германия) и 10 нМ PK (Sigma Aldrich; США) в течение двух суток, затем только 10 нМ PK.

Смену среды проводили раз в сутки. На третьи–четвертые сутки проводили пассирование культур 1 : 3 с использованием 0,25%-го раствора трипсина.

Полученную ранее культуру хондроцитов человека размораживали из криобанка ФНКЦ ФХМ. Для этого криовиалу нагревали на водяной бане до полного исчезновения льда, после чего клетки отмывали от криопротектора DMSO в 10 мл предварительно нагретой до +37 °С чистой среды Advanced DMEM, путем центрифугирования в 15 мл пробирке (Servicebio; Китай) при 1000 об./мин 5 мин. Осадок с хондроцитами разводили для последующего культивирования в среде Advanced DMEM с добавлением 15% FBS или 10% сыворотки человека. Смену среды проводили раз в 4 суток, при этом кондиционированную среду отбирали и фильтровали дважды через шприцевые фильтры размера пор 0,45 мкм, затем 0,22 мкм.

3D-культуры

Для получения сфероидов использовали планшет с микролунками AggreWell 800 (STEMCELL Technologies; Канада) и раствор Anti-Adherence Rinsing Solution (STEMCELL Technologies; Канада) по протоколу производителя [31]. С учетом количества клеток добавляли 1 или 2 мл среды с 10 мкМ Y27632, соответствующей протоколу хондрогенной дифференцировки в 3D-культурах, до концентрации $1\text{--}1,5 \times 10^6$ кл/мл. На одну лунку планшета приходился 1 мл суспензии данной концентрации. Планшеты с равномерно распределенными в микролунках клетками инкубировали при 37 °С и 5% CO₂ 24 ч.

Для изготовления чашек Петри для культивирования сфероидов на 60 мм чашки Петри Ultra Low Attachment (Corning Inc.; США) наносили клей из хлороформа и пластика строго по центру в виде капли диаметром около 1 см. Затем чашки в открытом виде помещали под ультрафиолет на 6 ч. Перед использованием несколько раз ополаскивали поверхность раствором Версена [32].

Через 24 ч инкубирования в планшетах с микролунками сферические агрегаты клеток собирали осторожным пипетированием с помощью носиков с отрезанным кончиком для избежания повреждения сфероидов, а затем переносили в заготовленные чашки Петри со средой, соответствующей протоколу дифференцировки. Чашки со сфероидом помещали в динамические условия на орбитальный 3D-шейкер при 37 °С и 5% CO₂.

Для дифференцировки 3D-культур по «долгому», «короткому» и «комбинированному» протоколам, а также для культивирования сфероидов положительного контроля использовали базовую среду Advanced DMEM

с добавлением 10 нг/мл bFGF (STEMCELL Technologies; Канада), 100× GlutaMAX (Gibco, Thermo Fisher Scientific; США), 50× B27 (Gibco, Thermo Fisher Scientific; США), 1% инсулин-трансферрин-селенита (ИТС) («ПанЭко»; Россия), 50 мкг/мл аскорбиновой кислоты (Sigma Aldrich; США), 50 мкМ β-меркаптоэтанола, 5 мкг/мл плазмоцина, гентамицина («ПанЭко»; Россия) и 10 мл/л 100х-раствора пенициллина/стрептомицина («ПанЭко»; Россия). В «долгом» и «комбинированном» протоколах к среде также добавляли 10 нг/мл TGFβ1 (Miltenyi Biotec; Германия), 10 нг/мл BMP2, 10% FBS. В протоколе с кондиционированной средой использовали кондиционированную среду от культуры суставных хондроцитов человека с добавлением 200× GlutaMAX. Для культивирования сфероидов положительного контроля к среде добавляли 10% FBS. Сфероиды отрицательного контроля культивировали в среде Advanced DMEM с добавлением антибиотиков и 200× GlutaMAX.

Дифференцировку сфероидов проводили в течение 28 суток. Смену среды осуществляли раз в 4 суток. Каждые 7 суток оценивали морфологию сфероидов с помощью микроскопа с фазовым контрастом Olympus IX53F (Olympus; Япония) и программного обеспечения для морфометрии CellSens Standart.

Иммунофлуоресцентный анализ

Для иммуноцитохимического окрашивания 3D-культур каждые 7 суток в течение культивирования сфероиды пересаживали в 48-луночные планшеты, дно лунок которых предварительно покрывали 0,1%-м раствором желатина. В течение 1–2 суток сфероиды прикреплялись и распластывались по поверхности.

Фиксированные 4%-м параформальдегидом (PFA) монослойные культуры и прикрепленные органоиды обрабатывали 0,1%-м Triton: для окрашивания на ядерный маркер — в течение 20 мин, на поверхностные и цитоплазматические — 10 мин. После пермеабилзации культуры обрабатывали блокирующим раствором на основе 0,01M PBS, содержащим 3% козьей сыворотки и 0,1% Tween в течение 30 мин.

Монослойные культуры, а также сфероиды на всех стадиях дифференцировки окрашивали первичными антителами к ядерному маркеру хондрогенеза Sox 9 (Rabbit, 1 : 400, Invitrogen; Thermo Fisher Scientific, США), к маркеру протеогликанового хрящевого ВКМ агрекану (Mouse, 1 : 500, Invitrogen; Thermo Fisher Scientific, США), маркеру фибриллярного ВКМ гиалинового хряща коллагену II типа (Rabbit, 1 : 200; Abcam, Великобритания) и маркеру волокнистого хряща коллагену I типа (Rabbit, 1 : 800, Invitrogen; Thermo Fisher Scientific, США), а также поверхностному маркеру прехондрогенной мезенхимы CD105 (Human, 1 : 500; Sony, Япония). Окрашивали растворами первичных антител на основе блокирующего раствора в течение 1,5 ч при комнатной температуре или 12 ч при 4 °С.

Для окрашивания вторичными антителами использовали Alexa Fluor 488 (Goat, Anti-Mouse, 1 : 500), Alexa Fluor 555 (Goat, Anti-Rabbit, 1 : 500) и Alexa Fluor 546 (Goat, Anti-Human, 1 : 500) (Invitrogen; Thermo Fisher Scientific, США). Окрашивание проводили в течение 1 ч в темноте. Для окрашивания ядер использовали 100 нг/мл DAPI (Sigma Aldrich; США).

Анализ окрашенных препаратов проводили на флуоресцентном микроскопе Olympus IX53F с четырьмя фильтрами флуоресценции (Olympus; Япония), используя

программное обеспечение для морфометрии CellSens Standart.

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) в реальном времени

Для лизиса клеток в монослойных культурах и сфероидов использовали буфер RLT (QIAGEN; Германия), к которому добавляли 10 мкл/мл β -меркаптоэтанола. Сфероиды по 3–5 штук, в зависимости от размера, а также монослойные культуры лизировали в 600 мкл RLT пипетированием.

Для выделения тотальной РНК использовали RNeasy Plus Mini Kit (QIAGEN; Германия) соответственно с прилагающейся инструкцией [33]. От геномной ДНК тотальную РНК очищали с помощью обработки раствором ДНКазы (СибЭнзим; Россия).

Для синтеза первой цепи кДНК с матрицы РНК использовали MMLV RT kit («Евроген»; Россия) в соответствии с инструкцией [34].

Для проведения ПЦР в реальном времени на одну лунку 96-луночного планшета (SIBIO, Scientific Specialities; США) добавляли 5 мкл 5 $\times$ qPCRmix-HS SYBR («Евроген»; Россия), 0,8 мкл 10 мкМ праймера (табл. 2), 18,2 мкл воды и 1 мкл кДНК матрицы. Реакцию проводили при использовании термоциклера для амплификации нуклеиновых кислот 1000 CFX Manager исполнения C10000 Touch (Bio-Rad; США) и программного обеспечения CFX Manager. Количество циклов — 39. В качестве зонда использовали SYBR («Евроген»; Россия). Для увеличения специфичности реакции использовали полимеразу с «горячим стартом» — HS Taq ДНК-полимеразу («Евроген»; Россия), а также подобрали оптимальную температуру отжига праймеров (60 °С). В качестве отрицательного контроля для оценивания специфичности реакции после получения результатов использовали кДНК, выделенную из ИПСК.

Анализ результатов проводили в программе Microsoft Excel по методу $\Delta\Delta C_t$. Показаны средние значения и доверительные интервалы. Для статистического анализа использовали t -критерий Уэлча, учитывающий, что у средних значений двух групп независимых выборок могут быть неодинаковые стандартные отклонения.

Гистологический анализ

Для изготовления парафиновых срезов последовательно проводили процедуры фиксации сфероидов и фрагментов хряща, гистологической проводки через ксилол и этанол концентраций 70, 80, 96 и 100%, а также заливки в жидкий парафин. Затем создавали серии парафиновых срезов толщиной 4 мкм. Криосрезы сфероидов толщиной

7 мкм изготавливали по описанному ранее протоколу [35]. Для создания гистологического блока в этом случае использовали заливочную смолу Shandon Cryotome FSE (Thermo Fisher Scientific; США). Срезы окрашивали гематоксилин-эозином, пикросириусом красным и сафранином О. После окрашивания срезы обезживали и заключали в полистирол.

Фотографии срезов получали с использованием микроскопа DM4000 B LED (Leica; Германия).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Дифференцировка в монослойных культурах

Недифференцированные культуры ИПСК представляли собой плотные колонии мелких клеток с высоким ядерно-цитоплазматическим соотношением, морфология колоний описана ранее [36]. На вторые сутки после начала дифференцировки путем воздействия Chir 99021 и РК или рекомбинантных факторов TGF β 1, BMP2 и 10% FBS клетки приняли округлую форму. При этом при дифференцировке по протоколам с Chir 99021 наблюдали усиление клеточной гибели, оцененной с помощью окраски раствором трипанового синего (возрастание метвых, включивших краситель, клеток достигало до 30–35% популяции). На 4-е сутки дифференцировки клетки приобрели полигональную и вытянутую форму. На 7-е сутки заметили отдельные популяции хондроцитоподобных клеток, которые имели округлую форму и крупное ядро. Также на 2–3-и сутки в культурах экспериментальных групп наблюдали почкующиеся скопления клеток, что было особенно выражено в культурах, дифференцированных по протоколу с Chir 99021.

При анализе результатов иммуноцитохимии наблюдали значительную флуоресценцию агрегана и коллагенов I и II типа в монослойных культурах протоколов как с применением рекомбинантных факторов TGF-1 и BMP2, так и Chir 99021 и РК (рис. 2). Однако синтез Sox9 оказался наиболее выраженным в культурах, дифференцированных с задействованием TGF-1 и BMP2 (рис. 2A1). Синтез мезодермального маркера CD105 был низким в экспериментальных и контрольных группах (рис. 2A4–D4), хотя небольшой сигнал наблюдали в культурах, дифференцированных Chir 99021 (рис. 2B4).

При анализе результатов ПЦР в реальном времени в образцах наблюдали показатели экспрессии хондрогенных маркеров, сопоставимые с таковыми в положительной контрольной группе. При использовании белковых факторов TGF β 1 и BMP2 показатели экспрессии SOX9 были выше, чем при использовании Chir 99021 и РК (рис. 3).

Таблица 2. Использованные в работе праймеры

Название гена	Последовательность 5'→3'	Длина продукта, п.н.
SOX9	F: GAAGTCGGTGAAGAACGGGC R: CACGTCGCGGAAGTCGATAG	283
ACAN	F: AGGAGTCCCTGACCTGGTTT R: CCTGACAGATCTGCCTCTCC	167
COL1A2	F: AGGGTGAGACAGGCGAACA R: CCGTTGAGTCCATCTTTGC	184
COL2A1	F: TGGACGCCATGAAGGTTTCT R: CCATTGATGGTTTCTCCAAACC	142
YWHAZ	F: ACTTTTGGTACATTGTGGCTTCAA R: CCGCCAGGACAAACAGTAT	94

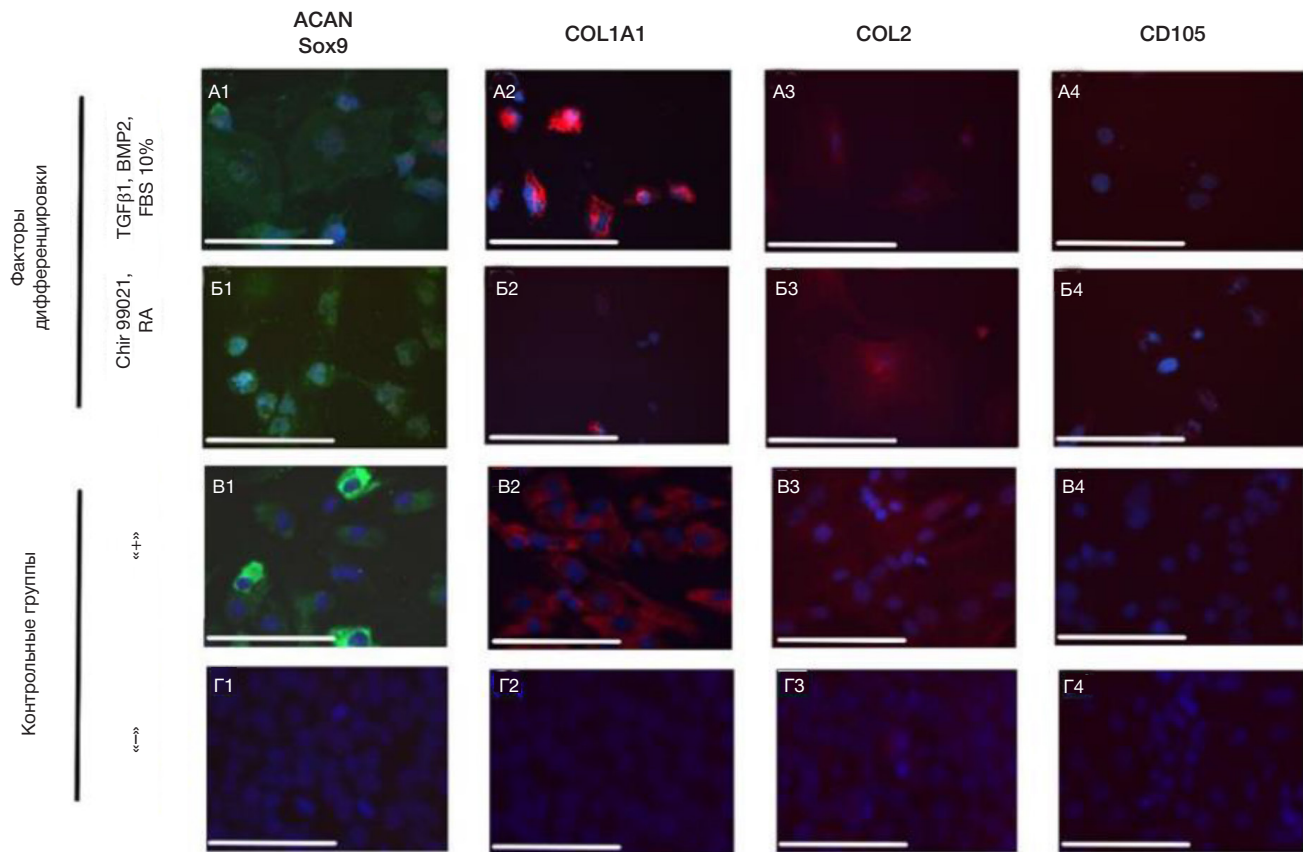


Рис. 2. Иммуноцитохимический анализ монослойных культур. **А.** Использование TGFβ1, BMP2 и 10% FBS. **Б.** Использование Chir99021 и РК. **В.** Культура «суставных» хондроцитов, положительный контроль. **Д.** Культура ИПСК FD4S, отрицательный контроль. 1 — агрекан (зеленый) и Sox9 (красный), 2 — коллаген I типа (красный), 3 — коллаген II типа (красный), 4 — CD105 (красный). Масштабный отрезок — 200 мкм

Дифференцировка в культурах сфероидов

Сразу после перемещения сформированных клеточных агрегатов в условиях 3D-культивирования они приобретали неправильную форму и неровную поверхность, но на 35-е сутки дифференцировки сфероиды всех протоколов и контрольных групп приобрели вид беловатых полупрозрачных конструкций с гладкой блестящей

поверхностью (рис. 1Ж). Этого не происходило в 3D-культурах протокола с кондиционированной средой.

В 3D-культурах сфероидов на 14-е и 21-е сутки дифференцировки наблюдали неинтенсивную флуоресценцию агрекана в конструкциях всех протоколов (рис. 4). Наибольшую интенсивность флуоресценции данного маркера фиксировали на 28-е и 35-е сутки в сфероидах «комбинированного» протокола (рис. 4В3, 4).

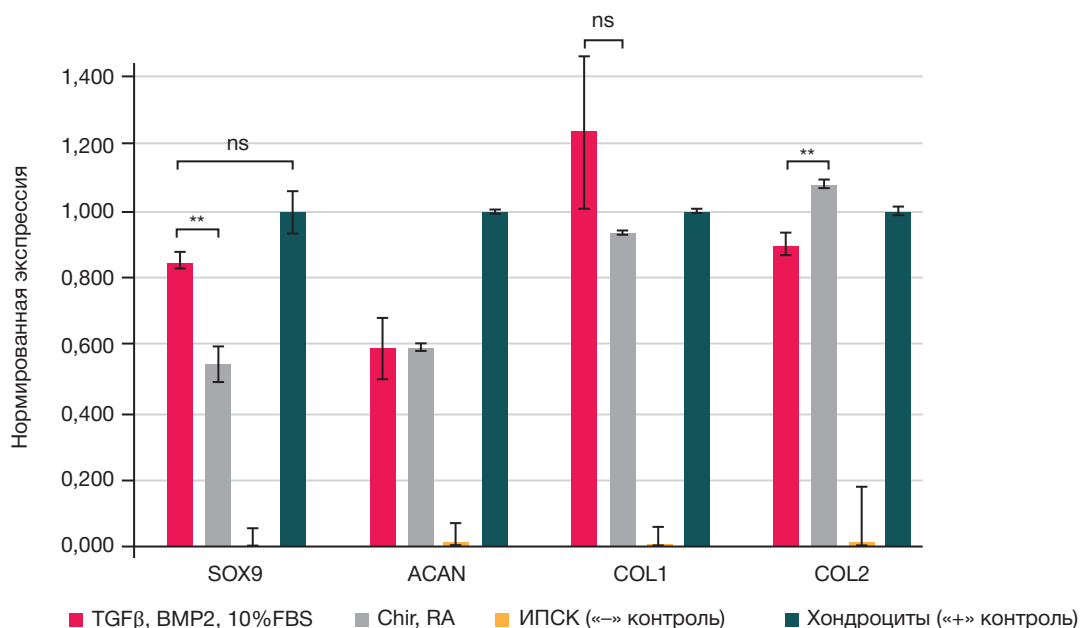


Рис. 3. Показатели экспрессии генов хондрогенных маркеров в монослойных культурах. «Усы» — стандартное отклонение. Достоверность различия между группами: ns — $p > 0,05$; * — $p < 0,05$; ** — $p < 0,01$; *** — $p < 0,001$

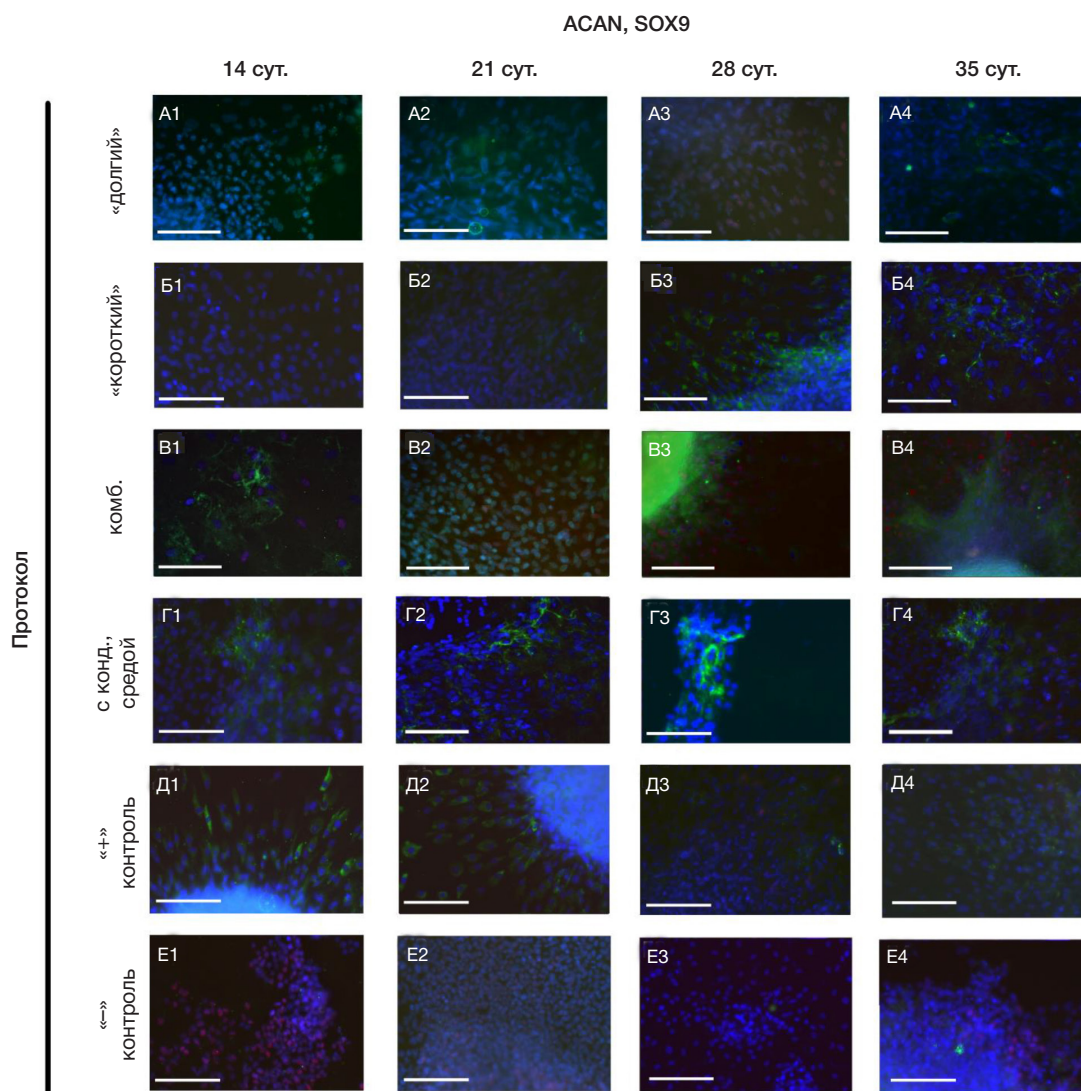


Рис. 4. Иммуноцитохимический анализ синтеза агрекана (зеленый) и Sox9 (красный) в 3D-культурах сфероидов разных протоколов. **А–Г.** Протоколы дифференцировки: «долгий» (**А**), «короткий» (**Б**), «комбинированный» (**В**), с кондиционированной средой (**Г**). **Д.** Сфероиды положительной контрольной группы. **Е.** Сфероиды отрицательной контрольной группы. Продолжительность дифференцировки: 1 — 14 суток, 2 — 21 сутки, 3 — 28 суток, 4 — 35 суток. Масштабный отрезок — 200 мкм

На 21-е и 28-е сутки наблюдали также высокий синтез агрекана в сфероидах протокола с кондиционированной средой (рис. 4Г1–3). Уровень экспрессии ACAN, сопоставимый с показателями в сфероидах положительной контрольной группы, наблюдали в образцах «долгого», «комбинированного» протоколов и протокола с кондиционированной средой. При этом на 28-е и 35-е сутки дифференцировки экспрессия ACAN значительно увеличилась в сфероидах «комбинированного» протокола и протокола с кондиционированной средой (рис. 5А).

Синтез Sox9 наблюдали в сфероидах «комбинированного» протокола на каждом временном этапе, при этом прослеживалось увеличение интенсивности флуоресценции этого маркера по мере дифференцировки (рис. 4В1–4). Интенсивные флуоресцентные сигналы Sox9 отмечали и на 28-е сутки в сфероидах «долгого» протокола и на 35-е сутки в сфероидах протокола с кондиционированной средой (рис. 4А3, Г4). В сфероидах группы отрицательного контроля тоже зафиксировали флуоресценцию данного маркера (рис. 4Е1–4). Проведенный ПЦР-анализ экспрессии SOX9 сравним с показателями в группе положительного контроля, что наблюдали в образцах «долгого» и «комбинированного» протоколов (рис. 5Б).

Высокую интенсивность флуоресценции коллагена I типа фиксировали во всех экспериментальных группах, но наибольшую — в сфероидах «долгого» и «комбинированного» протоколов. Экспрессия COL1A2 увеличивалась по мере дифференцировки в сфероидах, полученных по всем протоколам (рис. 6А). Наиболее высокие показатели наблюдали в образцах «долгого» и «комбинированного» протоколов.

В сфероидах «долгого», «комбинированного» протоколов и протокола с кондиционированной средой наблюдали высокую интенсивность флуоресценции коллагена II типа, при этом можно отметить, что она увеличивалась со временем. Выраженную экспрессию COL2A1 наблюдали в сфероидах всех протоколов дифференцировки (рис. 6Б). Максимальные показатели были отмечены в образцах «долгого» и «комбинированного» протоколов — они превышали экспрессию в положительной контрольной группе в несколько раз.

Синтез CD105 выявлен в начале культивирования в 3D-условиях, при этом флуоресценция данного маркера была хорошо выражена в сфероидах «долгого» и «комбинированного» протоколов, но к концу дифференцировки значительно снизилась.

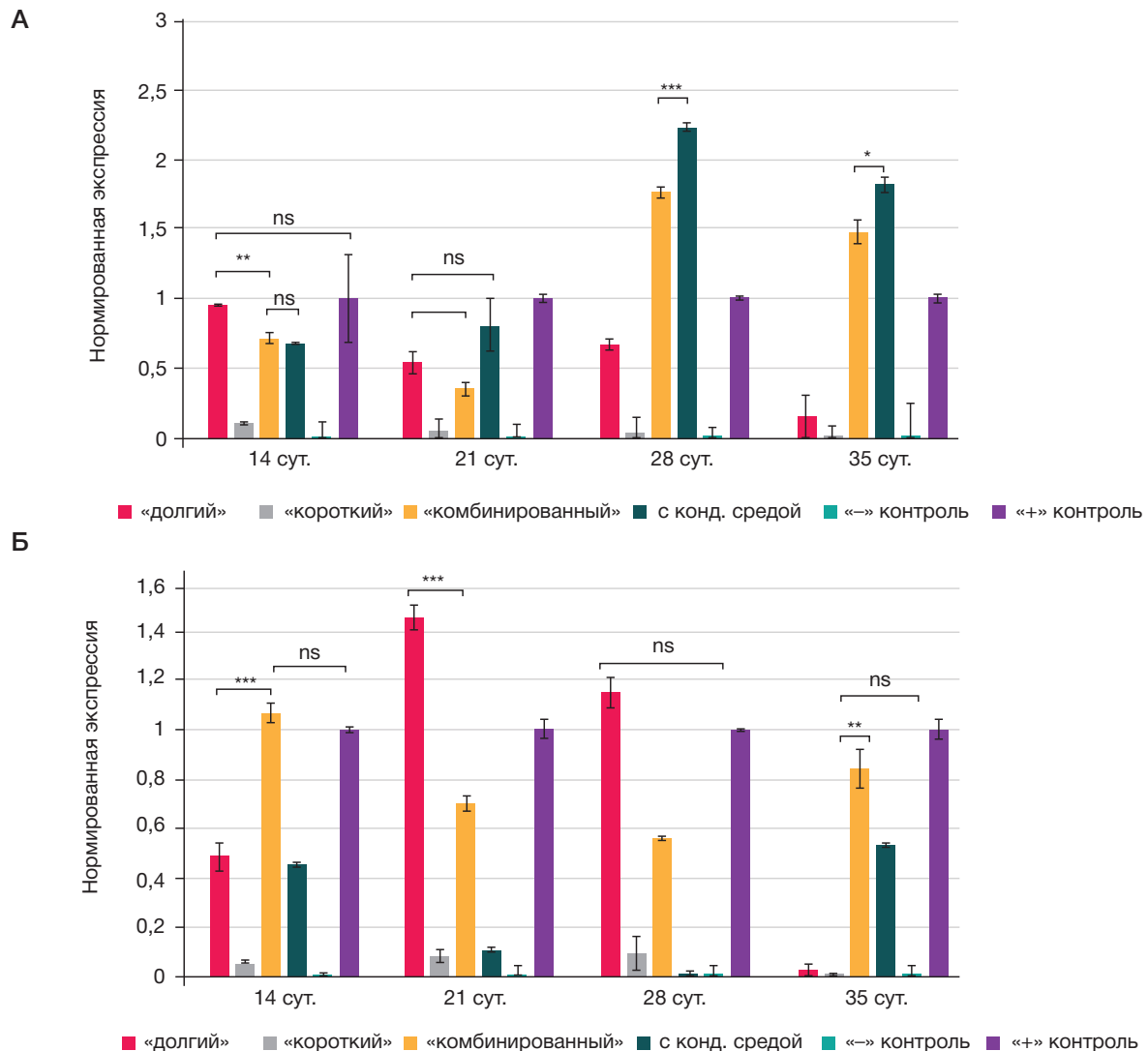


Рис. 5. А. Показатели экспрессии ACAN в 3D-культурах сфероидов различных протоколов. **Б.** Показатели экспрессии SOX9. По оси абсцисс — продолжительность дифференцировки, по оси ординат — величина нормированной экспрессии. «Усы» — стандартное отклонение. Достоверность различия между группами: ns — $p > 0,05$; * — $p < 0,05$; ** — $p < 0,01$; *** — $p < 0,001$

При анализе результатов гистологического окрашивания пикросириусом красным сфероидов, полученных с помощью «долгого» и «комбинированного» протоколов, наблюдали ярко-розовые коллагеновые волокна по всей площади среза (рис. 7). Однако окрашивание сфероидов всех протоколов сафранином О было неинтенсивным (рис. 7).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

При сравнении морфологических характеристик монослойных культур мы отметили, что дифференцировка ИПСК происходит при использовании как Chir 99021 и PK, так и TGF β , BMP2 и 10% FBS. Вытянутая полигональная форма клеток на 4-е сутки может говорить о приобретении клетками МСК-подобной морфологии при хондрогенной индукции. Усиленная клеточная гибель, которую мы наблюдали в культурах, дифференцированных с помощью Chir 99021 и PK, скорее всего, связана с действием Chir 99021, так как по данным прошлых экспериментов эта молекула усиливает апоптотическую активность [14]. Самоагрегирование клеток с образованием гиалиноподобных структур характерно для ранних этапов хондрогенной дифференцировки, когда происходит активное образование и накопление молекул адгезии [10].

Положительное влияние экзогенного присутствия TGF β 1 и BMP2 на синтез и экспрессию Sox9 в монослойных культурах, скорее всего, связано с участием этих молекул в стимуляции и стабилизации выработки данного транскрипционного фактора [37]. Поскольку Chir имитирует сигналы, индуцирующие мезодерму, присутствие CD105 может быть объяснено соответствием культуры на данной стадии дифференцировки ранней прехондрогенной мезенхиме [1, 14]. Можно заключить, что использование как TGF β 1, BMP2 и 10% FBS, так и Chir 99021 и PK, приводит к достаточно эффективной дифференцировке в монослойных культурах.

Для получения сфероидов мы использовали планшеты с микролунками. Клетки в таких планшетах агрегируют под действием силы тяжести, образуя клеточные конгломераты, которые иногда могут иметь неправильную форму [27]. Хрящеподобные структуры, которые были получены другими исследователями с помощью культур сфероидов, в итоге имели вид полупрозрачных беловатых структур с гладкой поверхностью [3]. Мы наблюдали подобные характеристики у сфероидов всех протоколов на последних этапах культивирования, кроме протокола с кондиционированной средой. Это может быть связано с тем, что при использовании данного протокола темпы

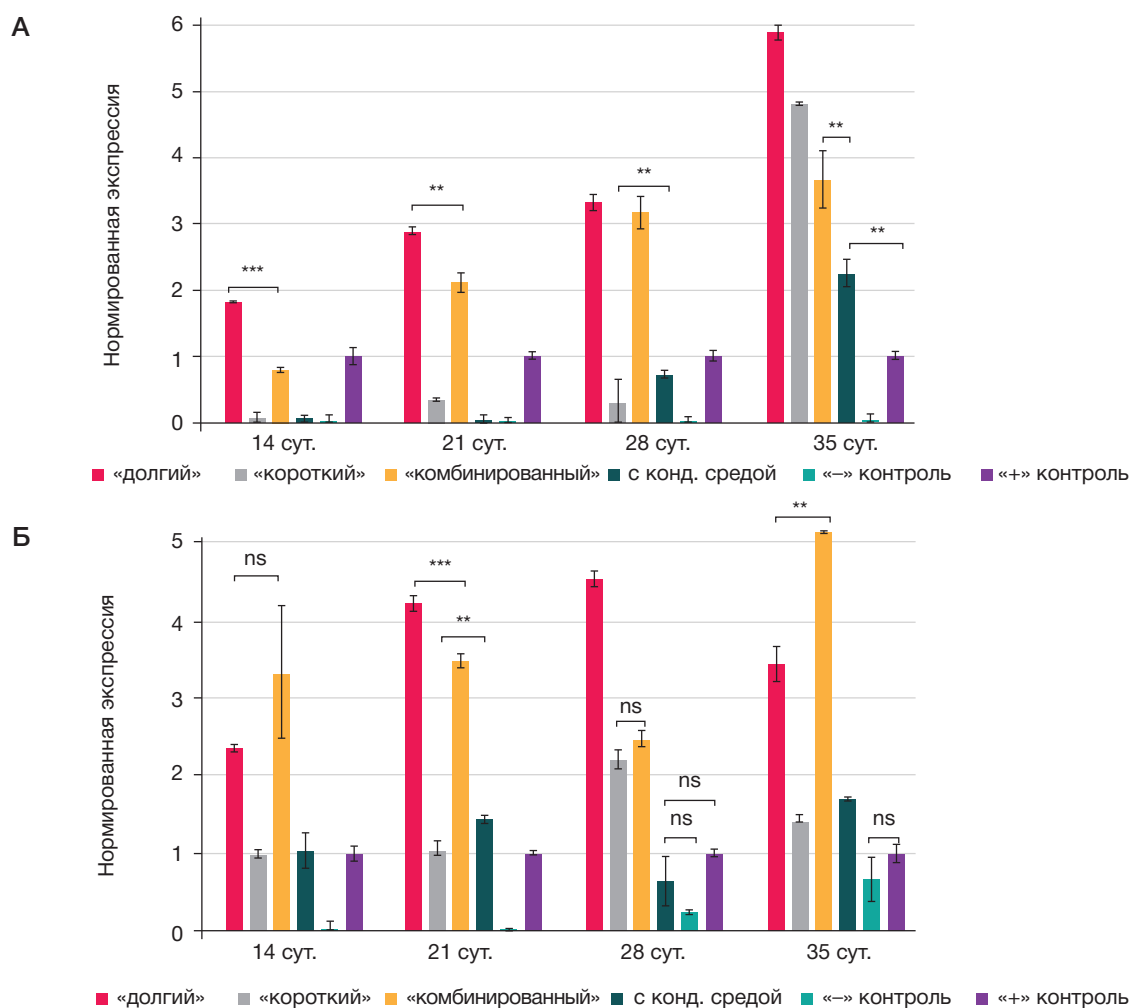


Рис. 6. А. Показатели экспрессии *COL1A2* в 3D-культурах сфероидов различных протоколов. **Б.** Показатели экспрессии *COL2A1*. По оси абсцисс — продолжительность дифференцировки, по оси ординат — величина нормированной экспрессии. «Усы» — стандартное отклонение. Достоверность различия между группами: ns — $p > 0,05$; * — $p < 0,05$; ** — $p < 0,01$; *** — $p < 0,001$

компактизации более медленные, и клетки внешнего слоя не нарабатывали достаточного количества молекул межклеточных контактов.

В нашем исследовании в протоколах с использованием TGF β 1 и BMP2 мы наблюдали достаточно высокие показатели экспрессии хондрогенных маркеров. Кроме того, мы имели дело с самопроизвольной

дифференцировкой ИПСК в сфероиде отрицательного контроля, так как отмечали флуоресцентные сигналы Sox9 и коллагена II типа, а также экспрессию COL2A1. Выработка хрящевого ВКМ — во многом механозависимый процесс, поэтому мы могли наблюдать синтез коллагена II типа в ответ на нахождение клеток в динамических условиях [38, 39].

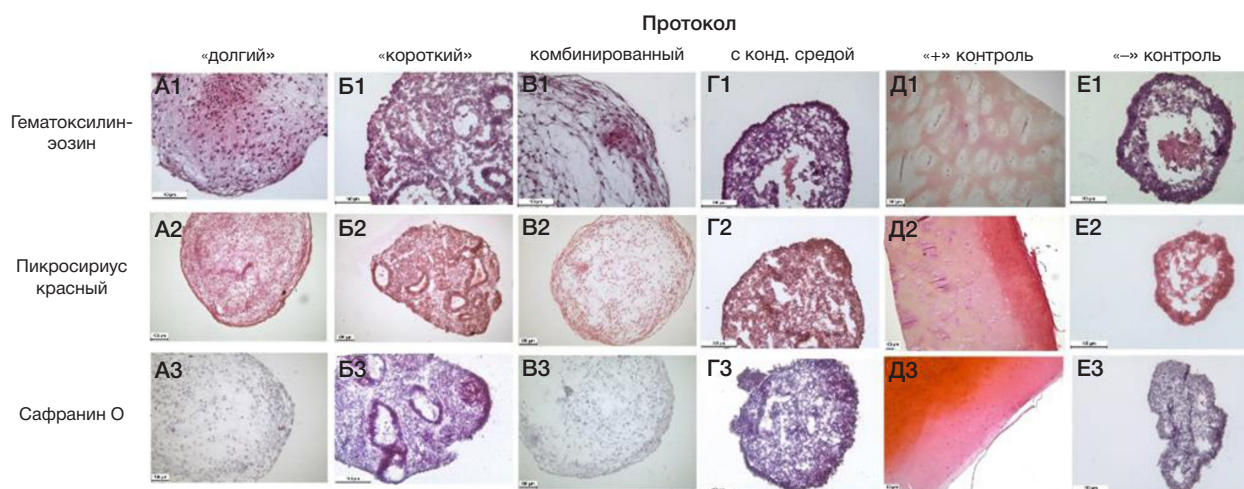


Рис. 7. Гистологический анализ 3D-культур сфероидов различных протоколов дифференцировки. Протоколы дифференцировки: «долгий» (А), «короткий» (Б), «комбинированный» (В), с кондиционированной средой (Г). Контрольные группы: положительный контроль (фрагменты суставного хряща) (Д), отрицательный контроль (Е). Тип гистологического окрашивания: 1 — гематоксилин-эозин, 2 — пикросириус красный, 3 — сафранин О

Синтез CD105 на 14-е и 21-е сутки в культурах сфероидов можно объяснить переходом от МСК-подобного фенотипа к хондроцитарному по мере дифференцировки клеток в сфероидах. *In vivo* CD105 наряду с другими поверхностными маркерами, такими как CD34, CD44, CD45, служит одним из маркеров, характерных для прехондрогенных мезенхимных клеток [1, 18].

Повышенный синтез и экспрессия коллагена I типа в сфероидах всех протоколов говорят о том, что конечные хрящеподобные структуры обладают смешанным фенотипом, совмещающим гиалиновую и волокнистую ткани. Наиболее сильная экспрессия COL1A2 наблюдается в образцах сфероидов протоколов, в которых использовали 10% FBS. В некоторых исследованиях упоминается фибротический эффект сыворотки, связанный с усилением синтеза коллагена I типа, поэтому вероятно, что высокие показатели этого коллагена могут быть обусловлены ее присутствием в среде для дифференцировки [40, 41].

При гистологическом анализе мы не обнаружили значимого присутствия протеогликанового матрикса в препаратах, окрашенных сафранином O. В связи с этим можно предположить, что полученные структуры соответствуют хрящам на ранней стадии хондрогенеза. Возможно, для выработки большего количества протеогликанового матрикса, детектируемого сафранином O, возможно, необходимо более длительное время культивирования. Так, в предыдущих работах сфероиды в возрасте 28 суток культивирования слабо окрашивались сафранином O, в то время как в возрасте 42 суток окрашивались интенсивно [3].

ВЫВОДЫ

В ходе нашего исследования были получены образцы хрящеподобной ткани с использованием четырех

протоколов, сравнительный анализ которых показал, что хондрогенез наиболее эффективно протекает в культурах 3D-сфероидов, дифференцированных с использованием «комбинированного» протокола, в котором мы предлагаем применение Chir 99021 и PK для дифференцировки монослойных культур и TGFβ1, BMP2 и 10% FBS для дифференцировки культур сфероидов. Высокими показателями синтеза и экспрессии хондрогенных маркеров обладали также конструкции, полученные с помощью «долгого» протокола и протокола с использованием кондиционированной среды. Использование кондиционированной среды, полученной от первичной культуры хондроцитов донорской ткани после экспозиции с Chir 99021 и PK, повышает эффективность дифференцировки. По нашему мнению, использование кондиционированной среды снижает себестоимость технологии, но делает ее трудно стандартизированной из-за вариабельности различных культур хондроцитов, полученных от разных доноров. Эту проблему можно решить при использовании культур ИПСК производных хондроцитов. Данный протокол нуждается в дальнейшей оптимизации, поскольку позволяет получить образцы, похожие на хрящ со смешанным фенотипом, сочетающим характеристики как гиалиновой, так и волокнистой хрящевой ткани, что соответствует незрелой ткани ранних стадий хондрогенеза. Тем не менее образцы хрящеподобной ткани, полученные с помощью изученных протоколов, можно эффективно использовать для моделирования процессов хондрогенеза в фундаментальных исследованиях. После оптимизации протоколов дифференцировки возможно использование получаемых хрящеподобных структур для получения прототипов клеточных продуктов для доклинической и, возможно, последующей клинической апробации.

Литература

1. Diederichs S, Gabler J, Autenrieth J. Differential regulation of SOX9 protein during chondrogenesis of induced pluripotent stem cells versus mesenchymal stromal cells: a shortcoming for cartilage formation. *Stem Cells and Development*. 2016; (April): 1–34.
2. Tsumaki N, Okada M, Yamashita A. iPS cell technologies and cartilage regeneration. *Bone*. 2015; 70: 48–54. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bone.2014.07.011>.
3. Yamashita A, Morioka M, Yahara Y, Okada M, Kobayashi T, Kuriyama S, et al. Generation of scaffoldless hyaline cartilaginous tissue from human iPSCs. *Stem Cell Reports*. 2015; 4 (3): 404–18.
4. Kimura T, Yamashita A, Ozono K, Tsumaki N. Limited Immunogenicity of Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Cartilages. *Tissue Engineering — Part A*. 2016; 22 (23–24): 1367–75.
5. Lietman SA. Induced pluripotent stem cells in cartilage repair. *World Journal of Orthopedics*. 2016; 7 (3): 149–55.
6. Narsinh KH, Plews J, Wu JC. Comparison of human induced pluripotent and embryonic stem cells: Fraternal or identical twins? *Molecular Therapy*. 2011; 19 (4): 635–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/mt.2011.41/nature06264>.
7. Cheng B, Tu T, Shi X, Liu Y, Zhao Y, Zhao Y, et al. A novel construct with biomechanical flexibility for articular cartilage regeneration. *Stem Cell Research and Therapy*. 2019; 10 (1): 1–16.
8. Limraksasin P, Kosaka Y, Zhang M, Horie N, Kondo T, Okawa H, et al. Shaking culture enhances chondrogenic differentiation of mouse induced pluripotent stem cell constructs. *Scientific Reports*. 2020; 10 (1): 1–15. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-72038-y>.
9. Suchorska WM, Augustyniak E, Richter M, Trzeciak T. Comparison of Four Protocols to Generate Chondrocyte-Like Cells from Human Induced Pluripotent Stem Cells (hiPSCs). *Stem Cell Reviews and Reports*. 2017; 13 (2): 299–308.
10. Castro-Viñuelas R, Sanjurjo-Rodríguez C, Piñeiro-Ramil M, Hermida-Gómez T, Fuentes-Boquete IM, de Toro-Santos FJ, et al. Induced pluripotent stem cells for cartilage repair: Current status and future perspectives. *European Cells and Materials*. 2018; 36 (2006): 96–109.
11. Qu C, Puttonen KA, Lindeberg H, Ruponen M, Hovatta O, Koistinaho J, et al. Chondrogenic differentiation of human pluripotent stem cells in chondrocyte co-culture. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. 2013; 45 (8): 1802–12.
12. Chijimatsu R, Ikeya M, Yasui Y, Ikeda Y, Ebina K, Moriguchi Y, et al. Characterization of Mesenchymal Stem Cell-Like Cells Derived from Human iPSCs via Neural Crest Development and Their Application for Osteochondral Repair. *Stem Cells International*. 2017: 1–18.
13. Karen Niederreither JV, Vermot J, Schuhbaur B, Chambon P, Dollé P. Embryonic retinoic acid synthesis is required for forelimb growth and anteroposterior patterning in the mouse. *Development*. 2002; 129 (15): 3563–74.
14. Kawata M, Mori D, Kanke K, Hojo H, Ohba S, Chung U il, et al. Simple and Robust Differentiation of Human Pluripotent Stem Cells toward Chondrocytes by Two Small-Molecule Compounds. *Stem Cell Reports*. 2019; 13 (3): 530–44.
15. Kreuser U, Buchert J, Haase A, Richter W, Diederichs S. Initial WNT/β-Catenin Activation Enhanced Mesoderm Commitment, Extracellular Matrix Expression, Cell Aggregation and Cartilage Tissue Yield From Induced Pluripotent Stem Cells. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 2020; 8: 581331. DOI: 10.3389/fcell.2020.581331.

16. Lee NH, Bayaraa O, Zechu Z, Kim HS. Biomaterials-assisted spheroid engineering for regenerative therapy. *BMB Reports*. 2021; 54 (7): 356–67.
17. Martin I, Suetterlin R, Baschong W, Heberer M, Vunjak-Novakovic G, Freed LE. Enhanced cartilage tissue engineering by sequential exposure of chondrocytes to FGF-2 during 2D expansion and BMP-2 during 3D cultivation. *J Cell Biochem*. 2001; 83 (1): 121–8. DOI: 10.1002/jcb.1203.
18. Kim J, Tomida K, Matsumoto T, Adachi T. Spheroid culture for chondrocytes triggers the initial stage of endochondral ossification. *Biotechnol Bioeng*. 2022; 119 (11): 3311–8. DOI: 10.1002/bit.28203.
19. Sulaiman S, Chowdhury SR, Fauzi MB, Rani RA, Mohamadyahya NH, Tabata Y, et al. 3d culture of MSCs on a gelatin microsphere in a dynamic culture system enhances chondrogenesis. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020; 21 (8): 1–17.
20. Gionet-Gonzales MA, Leach JK. Engineering principles for guiding spheroid function in the regeneration of bone, cartilage, and skin. *Biomedical Materials (Bristol)*. 2018; 13 (3): 034109. DOI: 10.1088/1748-605X/aab0b3.
21. Sridharan BP, Laffin AD, Detamore MS. Generating Chondromimetic Mesenchymal Stem Cell Spheroids by Regulating Media Composition and Surface Coating. *Cellular and Molecular Bioengineering*. 2018; 11 (2): 99–115.
22. Wang G, An Y, Zhang X, Ding P, Bi H, Zhao Z. Chondrocyte Spheroids Laden in GelMA/HAMA Hybrid Hydrogel for Tissue-Engineered Cartilage with Enhanced Proliferation, Better Phenotype Maintenance, and Natural Morphological Structure. *Gels*. 2021; 7 (4): 247. Available from: <https://www.mdpi.com/2310-2861/7/4/247>.
23. Jang Y, Jung H, Ju JH. Chondrogenic differentiation induction of adipose-derived stem cells by centrifugal gravity. *Journal of Visualized Experiments*. 2017; 2017 (120). DOI: 10.3791/54934.
24. Jang J, Lee J, Lee E, Lee EA, Son Y. Disc-type hyaline cartilage reconstruction using 3D-cell sheet culture of human bone marrow stromal cells and human costal chondrocytes and maintenance of its shape and phenotype after transplantation. *Tissue Engineering and Regenerative Medicine*. 2016; 13 (4): 352–63.
25. Saloni E, Kontturi L, Laitinen A, Haaparanta AM, Korhonen M, Nystedt J, et al. Chondrogenic differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stromal cells in a three-dimensional environment. *Journal of Cellular Physiology*. 2020; 235 (4): 3497–507.
26. Markway BD, Tan GK, Brooke G, Hudson JE, Cooper-White JJ, Doran MR. Enhanced chondrogenic differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells in low oxygen environment micropellet cultures. *Cell Transplantation*. 2010; 19 (1): 29–42.
27. Rogan H, Ilagan F, Yang F. Comparing Single Cell Versus Pellet Encapsulation of Mesenchymal Stem Cells in Three-Dimensional Hydrogels for Cartilage Regeneration. *Tissue Engineering — Part A*. 2019; 25 (19–20): 1404–12.
28. Zhang M, Shi J, Xie M, Wen J, Niibe K, Zhang X, et al. Recapitulation of cartilage/bone formation using iPSCs via biomimetic 3D rotary culture approach for developmental engineering. *Biomaterials*. 2020; 260. DOI: 10.1016/j.biomaterials.
29. Zhang K, Yan S, Li G, Cui L, Yin J. In-situ birth of MSCs multicellular spheroids in poly(L-glutamic acid)/chitosan scaffold for hyaline-like cartilage regeneration. *Biomaterials*. 2015; 71: 24–34.
30. Stuart MP, Matsui RAM, Santos MFS, Côrtes I, Azevedo MS, Silva KR, et al. Successful low-cost scaffold-free cartilage tissue engineering using human cartilage progenitor cell spheroids formed by micromolded nonadhesive hydrogel. *Stem Cells International*. 2017. 2017; DOI: 10.1155/2017/7053465. Epub 2017 Dec 20.
31. STEMCELL Technologies. Reproducible and Uniform Embryoid Bodies Using AggreWell™ Plates. 2011. Available from: https://www.stemcell.com/media/files/brochure/BR29150-AggreWell_Reproducible_Uniform_Embryoid_Bodies.pdf.
32. Ereemeev AV, Volovikov EA, Shuvalova LD, Davidenko AV, Khomyakova EA, Bogomiakova ME, Lebedeva OS, Zubkova OA, Lagarkova MA. “Necessity is the Mother of Invention” or Inexpensive, Reliable, and Reproducible Protocol for Generating Organoids. *Biochemistry (Moscow)*. 2019; 84 (3): 321–28. DOI: 10.1134/S0006297919030143.
33. QIAGEN. RNeasy® Plus Mini Handbook. 2020, 47 p. <https://www.qiagen.com/us/resources/resourcedetail?id=16b8f578-d192-4613-ae32-8e02e0b0fa77&lang=en>
34. Evrogen. MMLV RT kit. 2021. Available from: www.evrogen.ru.
35. Molecular Cellular and Developmental Biology. Cryostat Procedure. 2012; 5 p. Available from: <https://labs.mccdb.ucsb.edu/fisher/steven/Website/protocols/Cryosectioning.pdf>.
36. Shuvalova LD, Ereemeev AV, Bogomazova AN, Novosadova EV, Zerkalenkova EA, Olshanskaya YV, et al. Generation of induced pluripotent stem cell line RCPMi004-A derived from patient with Parkinson's disease with deletion of the exon 2 in PARK2 gene. *Stem Cell Res*. 2020; 44: 101733. DOI: 10.1016/j.scr.2020.101733.
37. Goldring MB, Tsuchimochi K, Ijiri K. The control of chondrogenesis. *Journal of Cellular Biochemistry*. 2006; 97: 33–44.
38. Rutgers M, Saris DB, Vonk LA, van Rijen MH, Akrum V, Langeveld D, et al. Effect of collagen type I or type II on chondrogenesis by cultured human articular chondrocytes. *Tissue Engineering — Part A*. 2013; 19 (1–2): 59–65.
39. Theodoropoulos JS, DeCroos AJN, Petrera M, Park S, Kandel RA. Mechanical stimulation enhances integration in an in vitro model of cartilage repair. *Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy*. 2016; 24 (6): 2055–64.
40. Endo K, Fujita N, Nakagawa T, Nishimura R. Effect of Fibroblast Growth Factor-2 and Serum on Canine Mesenchymal Stem Cell Chondrogenesis. *Tissue Engineering — Part A*. 2019; 25 (11–12): 901–10.
41. Wu CL, Dicks A, Steward N, Tang R, Katz DB, Choi YR, et al. Single cell transcriptomic analysis of human pluripotent stem cell chondrogenesis. *Nature Communications*. 2021; 12 (1): 1–18.

References

1. Diederichs S, Gabler J, Autenrieth J. Differential regulation of SOX9 protein during chondrogenesis of induced pluripotent stem cells versus mesenchymal stromal cells: a shortcoming for cartilage formation. *Stem Cells and Development*. 2016; (April): 1–34.
2. Tsumaki N, Okada M, Yamashita A. iPS cell technologies and cartilage regeneration. *Bone*. 2015; 70: 48–54. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bone.2014.07.011>.
3. Yamashita A, Morioka M, Yahara Y, Okada M, Kobayashi T, Kuriyama S, et al. Generation of scaffoldless hyaline cartilaginous tissue from human iPSCs. *Stem Cell Reports*. 2015; 4 (3): 404–18.
4. Kimura T, Yamashita A, Ozono K, Tsumaki N. Limited Immunogenicity of Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Cartilages. *Tissue Engineering — Part A*. 2016; 22 (23–24): 1367–75.
5. Lietman SA. Induced pluripotent stem cells in cartilage repair. *World Journal of Orthopedics*. 2016; 7 (3): 149–55.
6. Narsinh KH, Plews J, Wu JC. Comparison of human induced pluripotent and embryonic stem cells: Fraternal or identical twins? *Molecular Therapy*. 2011; 19 (4): 635–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/mt.2011.41/nature06264>.
7. Cheng B, Tu T, Shi X, Liu Y, Zhao Y, Zhao Y, et al. A novel construct with biomechanical flexibility for articular cartilage regeneration. *Stem Cell Research and Therapy*. 2019; 10 (1): 1–16.
8. Limraksasin P, Kosaka Y, Zhang M, Horie N, Kondo T, Okawa H, et al. Shaking culture enhances chondrogenic differentiation of mouse induced pluripotent stem cell constructs. *Scientific Reports*. 2020; 10 (1): 1–15. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-72038-y>.
9. Suchorska WM, Augustyniak E, Richter M, Trzeciak T. Comparison of Four Protocols to Generate Chondrocyte-Like Cells from Human Induced Pluripotent Stem Cells (hiPSCs). *Stem Cell Reviews and Reports*. 2017; 13 (2): 299–308.
10. Castro-Viñuelas R, Sanjurjo-Rodríguez C, Piñeiro-Ramil M,

- Hermida-Gómez T, Fuentes-Boquete IM, de Toro-Santos FJ, et al. Induced pluripotent stem cells for cartilage repair: Current status and future perspectives. *European Cells and Materials*. 2018; 36 (2006): 96–109.
11. Qu C, Puttonen KA, Lindeberg H, Ruponen M, Hovatta O, Koistinaho J, et al. Chondrogenic differentiation of human pluripotent stem cells in chondrocyte co-culture. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. 2013; 45 (8): 1802–12.
 12. Chijimatsu R, Ikeya M, Yasui Y, Ikeda Y, Ebina K, Moriguchi Y, et al. Characterization of Mesenchymal Stem Cell-Like Cells Derived from Human iPSCs via Neural Crest Development and Their Application for Osteochondral Repair. *Stem Cells International*. 2017; 1–18.
 13. Karen Niederreither JV, Vermot J, Schuhbaur B, Chambon P, Dollé P. Embryonic retinoic acid synthesis is required for forelimb growth and anteroposterior patterning in the mouse. *Development*. 2002; 129 (15): 3563–74.
 14. Kawata M, Mori D, Kanke K, Hojo H, Ohba S, Chung U il, et al. Simple and Robust Differentiation of Human Pluripotent Stem Cells toward Chondrocytes by Two Small-Molecule Compounds. *Stem Cell Reports*. 2019; 13 (3): 530–44.
 15. Kreuser U, Buchert J, Haase A, Richter W, Diederichs S. Initial WNT/ β -Catenin Activation Enhanced Mesoderm Commitment, Extracellular Matrix Expression, Cell Aggregation and Cartilage Tissue Yield From Induced Pluripotent Stem Cells. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 2020; 8: 581331. DOI: 10.3389/fcell.2020.581331.
 16. Lee NH, Bayarar O, Zechu Z, Kim HS. Biomaterials-assisted spheroid engineering for regenerative therapy. *BMB Reports*. 2021; 54 (7): 356–67.
 17. Martin I, Suetterlin R, Baschong W, Heberer M, Vunjak-Novakovic G, Freed LE. Enhanced cartilage tissue engineering by sequential exposure of chondrocytes to FGF-2 during 2D expansion and BMP-2 during 3D cultivation. *J Cell Biochem*. 2001; 83 (1): 121–8. DOI: 10.1002/jcb.1203.
 18. Kim J, Tomida K, Matsumoto T, Adachi T. Spheroid culture for chondrocytes triggers the initial stage of endochondral ossification. *Biotechnol Bioeng*. 2022; 119 (11): 3311–8. DOI: 10.1002/bit.28203.
 19. Sulaiman S, Chowdhury SR, Fauzi MB, Rani RA, Mohamadyahaya NH, Tabata Y, et al. 3d culture of MSCs on a gelatin microsphere in a dynamic culture system enhances chondrogenesis. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020; 21 (8): 1–17.
 20. Gionet-Gonzales MA, Leach JK. Engineering principles for guiding spheroid function in the regeneration of bone, cartilage, and skin. *Biomedical Materials (Bristol)*. 2018; 13 (3): 034109. DOI: 10.1088/1748-605X/aab0b3.
 21. Sridharan BP, Laffin AD, Detamore MS. Generating Chondromimetic Mesenchymal Stem Cell Spheroids by Regulating Media Composition and Surface Coating. *Cellular and Molecular Bioengineering*. 2018; 11 (2): 99–115.
 22. Wang G, An Y, Zhang X, Ding P, Bi H, Zhao Z. Chondrocyte Spheroids Laden in GelMA/HAMA Hybrid Hydrogel for Tissue-Engineered Cartilage with Enhanced Proliferation, Better Phenotype Maintenance, and Natural Morphological Structure. *Gels*. 2021; 7 (4): 247. Available from: <https://www.mdpi.com/2310-2861/7/4/247>.
 23. Jang Y, Jung H, Ju JH. Chondrogenic differentiation induction of adipose-derived stem cells by centrifugal gravity. *Journal of Visualized Experiments*. 2017; 2017 (120). DOI: 10.3791/54934.
 24. Jang J, Lee J, Lee E, Lee EA, Son Y. Disc-type hyaline cartilage reconstruction using 3D-cell sheet culture of human bone marrow stromal cells and human costal chondrocytes and maintenance of its shape and phenotype after transplantation. *Tissue Engineering and Regenerative Medicine*. 2016; 13 (4): 352–63.
 25. Saloni E, Kontturi L, Laitinen A, Haaparanta AM, Korhonen M, Nystedt J, et al. Chondrogenic differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stromal cells in a three-dimensional environment. *Journal of Cellular Physiology*. 2020; 235 (4): 3497–507.
 26. Markway BD, Tan GK, Brooke G, Hudson JE, Cooper-White JJ, Doran MR. Enhanced chondrogenic differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells in low oxygen environment micropellet cultures. *Cell Transplantation*. 2010; 19 (1): 29–42.
 27. Rogan H, Ilagan F, Yang F. Comparing Single Cell Versus Pellet Encapsulation of Mesenchymal Stem Cells in Three-Dimensional Hydrogels for Cartilage Regeneration. *Tissue Engineering — Part A*. 2019; 25 (19–20): 1404–12.
 28. Zhang M, Shi J, Xie M, Wen J, Niibe K, Zhang X, et al. Recapitulation of cartilage/bone formation using iPSCs via biomimetic 3D rotary culture approach for developmental engineering. *Biomaterials*. 2020; 260. DOI: 10.1016/j.biomaterials.
 29. Zhang K, Yan S, Li G, Cui L, Yin J. In-situ birth of MSCs multicellular spheroids in poly(L-glutamic acid)/chitosan scaffold for hyaline-like cartilage regeneration. *Biomaterials*. 2015; 71: 24–34.
 30. Stuart MP, Matsui RAM, Santos MFS, Côrtes I, Azevedo MS, Silva KR, et al. Successful low-cost scaffold-free cartilage tissue engineering using human cartilage progenitor cell spheroids formed by micromolded nonadhesive hydrogel. *Stem Cells International*. 2017; 2017. DOI: 10.1155/2017/7053465. Epub 2017 Dec 20.
 31. STEMCELL Technologies. Reproducible and Uniform Embryoid Bodies Using AggreWell™ Plates. 2011. Available from: https://www.stemcell.com/media/files/brochure/BR29150-AggreWell_Reproducible_Uniform_Embryoid_Bodies.pdf.
 32. Ereemeev AV, Volovikov EA, Shuvalova LD, Davidenko AV, Khomyakova EA, Bogomiyakova ME, Lebedeva OS, Zubkova OA, Lagarkova MA. "Necessity is the Mother of Invention" or Inexpensive, Reliable, and Reproducible Protocol for Generating Organoids. *Biochemistry (Moscow)*. 2019; 84 (3): 321–28. DOI: 10.1134/S0006297919030143.
 33. QIAGEN. RNeasy® Plus Mini Handbook. 2020, 47 p. <https://www.qiagen.com/us/resources/resourcedetail?id=16b8f578-d192-4613-ae32-8e02e0b0fa77&lang=en>
 34. Evrogen. MMLV RT kit. 2021. Available from: www.evrogen.ru. Russian.
 35. Molecular Cellular and Developmental Biology. Cryostat Procedure. 2012; 5 p. Available from: <https://labs.mcdb.ucsb.edu/fisher/steven/Website/protocols/Cryosectioning.pdf>.
 36. Shuvalova LD, Ereemeev AV, Bogomazova AN, Novosadova EV, Zerkalenkova EA, Olshanskaya YV, et al. Generation of induced pluripotent stem cell line RCPMi004-A derived from patient with Parkinson's disease with deletion of the exon 2 in PARK2 gene. *Stem Cell Res*. 2020; 44: 101733. DOI: 10.1016/j.scr.2020.101733.
 37. Goldring MB, Tsuchimochi K, Ijiri K. The control of chondrogenesis. *Journal of Cellular Biochemistry*. 2006; 97: 33–44.
 38. Rutgers M, Saris DB, Vonk LA, van Rijen MH, Akrum V, Langeveld D, et al. Effect of collagen type I or type II on chondrogenesis by cultured human articular chondrocytes. *Tissue Engineering — Part A*. 2013; 19 (1–2): 59–65.
 39. Theodoropoulos JS, DeCroos AJN, Petrera M, Park S, Kandel RA. Mechanical stimulation enhances integration in an in vitro model of cartilage repair. *Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy*. 2016; 24 (6): 2055–64.
 40. Endo K, Fujita N, Nakagawa T, Nishimura R. Effect of Fibroblast Growth Factor-2 and Serum on Canine Mesenchymal Stem Cell Chondrogenesis. *Tissue Engineering — Part A*. 2019; 25 (11–12): 901–10.
 41. Wu CL, Dicks A, Steward N, Tang R, Katz DB, Choi YR, et al. Single cell transcriptomic analysis of human pluripotent stem cell chondrogenesis. *Nature Communications*. 2021; 12 (1): 1–18.