

МОРФОЛОГИЯ ПОВЕРХНОСТИ ХОНДРОСФЕР ПОСЛЕ ОБРАБОТКИ ЦИТОХАЛАЗИНОМ Д

© 2021 г. А. А. Грядунова^{1,2,*}, Е. А. Буланова¹, Е. В. Кудан¹, В. А. Касьянов³,
Ю. Д. Хесуани¹, В. А. Миронов^{1,2}

¹Лаборатория биотехнологических исследований “3Д Биопринтинг Солюшенс”, Москва, 115409 Россия

²Институт регенеративной медицины Первого Московского медицинского университета
им. И.М. Сеченова Минздрава России, Москва, 119991 Россия

³Лаборатория биомеханики Рижского университета им. П. Страдиньша, Рига LV-1007, Латвия

*E-mail: zharnitskaya_anna@mail.ru

Поступила в редакцию 19.02.2021 г.

После доработки 26.02.2021 г.

Принята к публикации 06.03.2021 г.

Целью данной работы является изучение морфологии поверхности хондросфер после обработки цитохалазином Д. Хондросферы с концентрацией клеток 8000 на 1 сфероид получали из первичных хондроцитов барана. Подсчитывали диаметры хондросфер, количества микроворсинок и округленных клеток (%) на поверхности. Для оценки диаметра хондросфер использовали фотографии, полученные с помощью инвертированного светового микроскопа, оснащенного цифровой фотокамерой. Для оценки количества округленных клеток и микроворсинок использовали фотографии, полученные в ходе сканирующей электронной микроскопии. Морфометрический анализ показал, что после действия цитохалазина Д диаметр хондросфер увеличивается, хондроциты округляются, подавляющее большинство хондроцитов сохраняет на своей поверхности плотно расположенные микроворсинки. При этом в незначительной части клеток наблюдается ранее не описанный феномен прогрессирующей депопуляции микроворсинок. Таким образом, цитохалазин Д оказывает существенное влияние на размеры и морфологию поверхности хондросфер.

Ключевые слова: цитохалазин Д, хондросферы, микроворсинки, сканирующая электронная микроскопия

DOI: 10.31857/S0041377121030044

Тканевые сфероиды представляют собой плотно упакованные шарообразные агрегаты живых клеток, используемые в качестве “строительных блоков” в тканевой инженерии (Mironov et al., 2009). Некоторые виды тканевых сфероидов находят применение в клинической практике. Так, сфероиды, состоящие из первичных хондроцитов, или хондросферы, уже более десяти лет успешно применяются в качестве одной из форм клеточной терапии для лечения повреждений хряща (Schubert et al., 2009). Таким образом, изучение хондросфер является перспективным направлением в современной регенеративной медицине.

Для ускоренного созревания хрящевой ткани рекомендуется применять химическую стимуляцию (Huang et al., 2018). В качестве одного из важных компонентов химического хондрогенного коктейля для такой стимуляции впервые было предложено использовать цитохалазин Д (Huang et al., 2018). Цитохалазин Д является метаболитом некоторых видов плесневых грибов и широко используется в клеточ-

ной биологии как классический ингибитор полимеризации актина (Brown, Spudich, 1979). Показано, что цитохалазин Д вызывает деполимеризацию актиновых микрофиламентов в хондроцитах при культивировании в монослое, приводящую к округлению клеток и усилению синтеза компонентов внеклеточного матрикса хряща, в основном гликозаминогликанов (Newman, Watt, 1988). Включение цитохалазина Д в состав химического хондрогенного коктейля, по-видимому, обусловлено именно этим фактом. Следовательно, в настоящее время цитохалазин Д можно рассматривать в качестве хондрогенного агента. Несмотря на большое количество работ, посвященных изучению свойств цитохалазина Д, мы не нашли в литературе данных о его влиянии на хондроциты в условиях 3D-культивирования — в составе хондросфер.

Цель настоящей работы заключалась в изучении влияния цитохалазина Д на морфологию поверхности хондросфер с помощью метода сканирующей электронной микроскопии.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДИКА

Культура клеток. Первичные хондроциты барана были любезно предоставлены Н.П. Омеляненко (Национальный медицинский исследовательский центр травматологии и ортопедии им. Н.Н. Приорова, Москва, Россия). Клетки выращивали в культуральной среде DMEM (Gibco, США), содержащей 10% фетальной бычьей сыворотки (Gibco, США), 1% антибиотика/антимикотика (Gibco, США) и 2 мМ L-глутамин (ПанЭко, Россия). Клетки инкубировали при температуре 37°C во влажной атмосфере при 5% CO₂ до достижения 85–95% конfluence. Отсутствие микоплазменного заражения подтверждали по протоколу окрашивания Hoechst 33258 (Sigma, США).

Получение хондросфер. Для фабрикации хондросфер использовали хондроциты 3 пассажа. Хондросферы получали с использованием планшетов с низкодгезивным покрытием Corning Spheroid Microplates (Corning, США) по протоколу производителя. После достижения 85–95% конfluence клетки промывали раствором Версена (ПанЭко, Россия), добавляли 0.25%-ный раствор трипсина с 0.53 мМ ЭДТА (Gibco, США) и суспендировали в культуральной среде DMEM. Для получения хондросфер использовали клеточную суспензию с концентрацией клеток 80000 кл./мл. В каждую ячейку 96-луночного планшета Corning Spheroid Microplate помещали 100 мкл готовой суспензии. Таким образом, концентрация клеток в одном сфероиде составила 8000.

Обработка цитохалазином D. Через 3 сут хондросферы, находившиеся в ячейках 96-луночного планшета Corning Spheroid Microplate, обрабатывали раствором цитохалазина D (Sigma, США) в концентрации 10 мкМ в культуральной среде DMEM и оставляли на 24 ч. По истечении 24 ч хондросферы фиксировали в 2.5%-ном растворе глutarальдегида (Sigma, США) для дальнейшего сканирующего электронно-микроскопического исследования.

Сканирующая электронная микроскопия. Образцы клеток фиксировали в 1%-ном растворе OsO₄ в фосфатном буфере в течение 1–2 ч и дегидратировали в серии спиртов возрастающей концентрации. Дегидратированные образцы высушивали методом перехода критической точки на установке HCP-2 (Hitachi Koki Co. Ltd., Япония) и подвергали напылению золотом с помощью установки ионного напыления IB-3 (EIKO, Япония). Затем образцы исследовали на сканирующем электронном микроскопе JSM-6510 LV (JEOL, Япония).

Морфометрический анализ. Для оценки диаметров хондросфер использовали фотографии, полученные на инвертированном световом микроскопе Nikon Eclipse Ti-E (Nikon, Япония), оснащенный цифровой фотокамерой. Для оценки количества округленных клеток и микроворсинок использовали фотографии, полученные в ходе сканирующей электронной микроскопии. Подсчет диаметров хондро-

сфер, а также количества округленных хондроцитов и микроворсинок на их поверхности проводили с использованием программного обеспечения ImageJ 1.51 (NIH, Bethesda, США). При подсчете диаметров использовали 96 фотографий хондросфер в каждой группе. При подсчете микроворсинок анализировали 10 фотографий поверхности хондросфер, в каждой из которых подсчитывали количество микроворсинок в 3-х произвольных областях площадью 10 × 10 мкм².

Статистический анализ. Статистическую обработку проводили с использованием однофакторного дисперсионного анализа ANOVA в программном обеспечении GraphPad Prism 6.01 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, США). Эксперимент повторяли 3 раза. Результаты измерений представлены средними значениями и их ошибкой, различия между группами считали достоверными при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Морфометрический анализ с использованием световой микроскопии показал существенное увеличение диаметров хондросфер, обработанных цитохалазином D (365.31 ± 2.40 мкм), по сравнению с контрольной группой (287.28 ± 1.55 мкм). Следовательно, диаметр увеличился более чем на 20% (рис. 1а–в). При действии цитохалазина D также наблюдали округление практически всех хондроцитов на поверхности хондросфер (97.44 ± 1.95%), тогда как в контрольной группе количество округленных клеток составляло 10.10 ± 3.39% (рис. 1г–е).

По данным сканирующей электронной микроскопии подавляющее большинство хондроцитов сохранило на своей поверхности плотно расположенные микроворсинки после обработки цитохалазином D. Тем не менее, в незначительной части клеток наблюдали ранее не описанный феномен прогрессирующей депопуляции микроворсинок (рис. 1з). Редко можно было заметить хондроциты, практически полностью лишенные микроворсинок (рис. 1и). Таким образом, диаметр хондросфер, плотность упаковки клеток в их составе, а также форма самих клеток претерпевают существенные изменения после обработки цитохалазином D.

ОБСУЖДЕНИЕ

Проведенное исследование показало существенное влияние цитохалазина D на морфологию хондросфер, которое проявилось прежде всего в увеличении их диаметра. Такое увеличение, по нашим данным, не связано с пролиферацией хондроцитов в составе сфероидов, но может быть сопряжено с синтезом внеклеточного матрикса, хотя обычно для его накопления требуется более продолжительное время культивирования (Newman, Watt, 1988; Omelyanenko et al., 2020). Декомпактизация хондросфер, наиболее вероятно, связана с округлением хондроци-

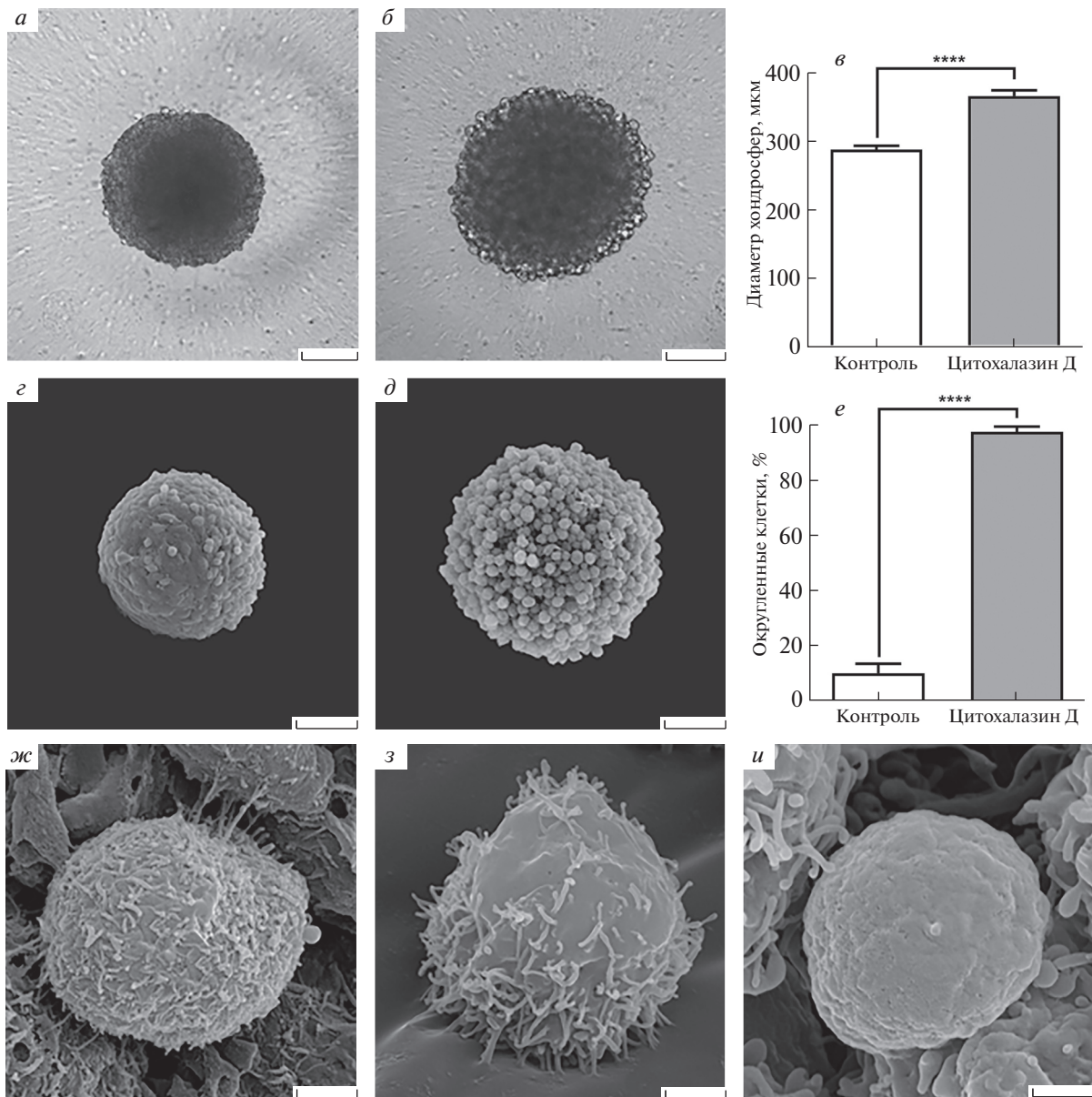


Рис. 1. Влияние цитохалазина Д на размеры и морфологию поверхности хондросфер: фазово-контрастные микрофотографии контрольного сфероиды (*а*) и сфероиды после обработки 10 мкМ цитохалазина Д (*б*); изменение диаметра хондросфер в процессе эксперимента (*в*); микрофотографии поверхности контрольного сфероиды (*г*) и сфероиды после обработки цитохалазином Д (*д*); изменение количества округленных клеток в процессе эксперимента (*е*); варианты поверхности клеток в составе контрольного сфероиды (*ж*) и сфероиды после обработки цитохалазином Д (*з, и*). Размерные шкалы: 100 мкм (*а, б, г, д*), 2 мкм (*ж–и*). Различия между группами достоверны при $p \leq 0.0001$ (звездочки).

тов в их составе, что является следствием деполимеризации актиновых микрофиламентов под воздействием цитохалазина Д. Примечательным является феномен депопуляции микроворсинок, наблюдаемый в некоторых хондроцитах на поверхности хондросфер. В качестве продолжения анализа этого феномена необходимо проведение дополнительных исследований, затрагивающих влияние цитохалазина Д на кинетику слияния хондросфер между собой и на кинетику распластывания хондросфер на различ-

ных субстратах, включая поверхность поврежденного хряща. Еще одним важным аспектом является изучение синтеза и накопления внеклеточного матрикса хряща в присутствии цитохалазина Д. Наконец, имеет значение включение в состав хондросфер микро- или наночастиц, содержащих цитохалазин Д как отдельно, так и в комбинации с другими хондрогенными факторами (Dang et al., 2016).

Известно, что обработка хондроцитов цитохалазином Д способствует восстановлению их хондро-

генного фенотипа (Newman, Watt, 1988). Перестройка актиновых микрофиламентов по данным из литературы приводит к увеличению экспрессии коллагена II типа и к повышению содержания протеогликанов в матриксе хондроцитов (Nofal, Knudson, 2002). В свою очередь, накопление компонентов внеклеточного матрикса вызывает увеличение модуля упругости хондросфер, характеризующего их биомеханические свойства (Omelyanenko et al., 2020). Усиление упругости хондросфер позволит им выдерживать высокое давление при встраивании в место дефекта и распределять возникающие сжимающие напряжения по подлежащей субхондральной кости.

Таким образом, использование цитохалазина D при культивировании хондросфер может помочь повысить их эффективность при замещении дефектов хрящевой ткани.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 19-315-90017).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Экспериментов с участием животных или людей авторы не проводили.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы сообщают об отсутствии в статье конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Brown S.S., Spudich J.A.* 1979. Cytochalasin inhibits the rate of elongation of actin filament fragments. *J. Cell Biol.* V. 83. P. 657.
- Dang P.N., Dwivedi N., Phillips L.M., Yu X., Herberg S., Bowman C., Solorio L.D., Murphy W.L., Alsbeg E.* 2016. Controlled Dual Growth Factor Delivery From Microparticles Incorporated Within Human Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cell Aggregates for Enhanced Bone Tissue Engineering via Endochondral Ossification. *Stem Cells Transl. Med.* V. 5. P. 206.
- Huang B.J., Brown W.E., Keown T., Hu J.C., Athanasiou K.A.* 2018. Overcoming Challenges in Engineering Large, Scaffold-Free Neocartilage with Functional Properties. *Tissue Eng. Part A.* V. 24. P. 1652.
- Mironov V., Visconti R.P., Kasyanov V., Forgacs G., Drake C.J., Markwald R.R.* 2009. Organ printing: tissue spheroids as building blocks. *Biomaterials.* V. 30. P. 2164.
- Newman P., Watt F.M.* 1988. Influence of cytochalasin D-induced changes in cell shape on proteoglycan synthesis by cultured articular chondrocytes. *Exp. Cell Res.* V. 178. P. 199.
- Nofal G.A., Knudson C.B.* 2002. Latrunculin and cytochalasin decrease chondrocyte matrix retention. *J. Histochem. Cytochem.* V. 50. P. 1313.
- Omelyanenko N.P., Karalkin P.A., Bulanova E.A., Koudan E.V., Parfenov V.A., Rodionov S.A., Knyazeva A.D., Kasyanov V.A., Babichenko I.I., Chkadua T.Z., Khesuani Y.D., Gryadunova A.A., Mironov V.A.* 2020. Extracellular Matrix Determines Biomechanical Properties of Chondrospheres during Their Maturation In Vitro. *Cartilage.* V. 11. P. 521.
- Schubert T., Anders S., Neumann E., Schölmerich J., Hofstädter F., Grifka J., Müller-Ladner U., Libera J., Schedel J.* 2009. Long-term effects of chondrospheres on cartilage lesions in an autologous chondrocyte implantation model as investigated in the SCID mouse model. *Int. J. Mol. Med.* V. 23. P. 455.

Chondrospheres Surface Morphology after Cytochalasin D Treatment

A. A. Gryadunova^{a, b, *}, E. A. Bulanova^a, E. V. Koudan^a, V. A. Kasyanov^c, Yu. D. Khesuani^a, and V. A. Mironov^{a, b}

^aPrivate Laboratory for Biotechnological Research “3D Bioprinting Solutions”, Moscow, 115409 Russia

^bInstitute for Regenerative Medicine of the I.M. Sechenov First Moscow State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, 119991 Russia

^cRiga Stradins University, Riga, LV-1007 Latvia

*e-mail: zharnitskaya_anna@mail.ru

The aim of the study is to investigate chondrospheres surface morphology after cytochalasin D treatment. Primary sheep chondrocytes from passage 3 were used for chondrospheres fabrication. The initial concentration was 8000 cells per spheroid. Chondrospheres diameters, number of microvilli and rounded cells on chondrospheres surface were calculated. Chondrospheres diameters examination was performed using inverted light microscope equipped with digital camera. Microphotographs from scanning electron microscopy were used to estimate the number of microvilli and rounded cells. Morphometric analysis showed that chondrospheres diameter increases and chondrocytes become rounded while the densely packed microvilli remain intact in the majority of chondrocytes after cytochalasin D treatment. However, a previously undescribed phenomenon of progressive microvilli depopulation is observed in a small part of cells. Thus, cytochalasin D significantly affects chondrospheres size and surface morphology.

Keywords: cytochalasin D, chondrospheres, microvilli, scanning electron microscopy