

Оригинальная статья

УДК 544.6.018.2+576.54

<https://doi.org/10.26907/2542-064X.2025.2.185-200>**Электрохимический сенсор для оценки накопления внеклеточного матрикса в культивируемых хондросферах**

**В.Д. Новикова¹, Л.Е. Агафонова¹✉, Г.Е. Леонов¹, Л.А. Кирсанова², Ю.Б. Басок²,
А.В. Ковалёв³, В.В. Шумянцева¹, К.Н. Ярыгин¹, И.В. Вахрушев¹**

¹НИИ биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича, г. Москва, Россия

²НМИЦ трансплантологии и искусственных органов имени ак. В.И. Шумакова, г. Москва, Россия

³НМИЦ травматологии и ортопедии имени Н.Н. Приорова, г. Москва, Россия

✉ agafonovaluba@mail.ru

Аннотация

Повреждения суставного хряща представляют актуальную медицинскую проблему в связи с высокой частотой проявлений этого заболевания опорно-двигательного аппарата. Сниженная естественная способность хрящевой ткани к регенерации может быть компенсирована за счет регенеративной терапии. Золотым стандартом в данной области стала внутрисуставная матрикс-ассоциированная трансплантация аутологичных хондроцитов, которая подразумевает их введение либо в составе тканеинженерных конструкций в комплексе с матриксом-носителем (скаффолдом), либо в виде тканевых сфероидов (хондросфер). Последний подход представляется наиболее физиологичным, так как в составе сфероидов клетки имеют возможность продуцировать и накапливать собственный внеклеточный матрикс. При масштабном производстве такого типа биомедицинских клеточных продуктов встает вопрос о доступных и эффективных методах контроля качества получаемых хондросфер, позволяющих оценивать их химический состав и биологические свойства. В работе предложен прототип сенсора для сравнительного электрохимического профилирования хондросфер, обеспечивающий количественную оценку накопления компонентов внеклеточного матрикса гиалинового хряща в их составе.

Ключевые слова: хондросферы, суставной хрящ, клеточные сфероиды, внеклеточный матрикс, коллаген, гликозаминогликаны, электроанализ.

Заключение Комитета по этике. Исследование проведено в соответствии с положениями Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации и одобрено комитетом по этике ФГБУ «НМИЦ ТО им. Н.Н. Приорова» Минздрава России (протокол № 1/22 от 26 декабря 2022 года).

Информированное согласие. Информированное согласие было получено от всех субъектов, участвовавших в исследовании.

Благодарности. Работа выполнена в рамках Программы фундаментальных научных исследований в Российской Федерации на долгосрочный период (2021–2030 годы) (№ 122022800499-5).

Для цитирования: Новикова В.Д., Агафонова Л.Е., Леонов Г.Е., Кирсанова Л.А., Басок Ю.Б., Ковалёв А.В., Шумянцева В.В., Ярыгин К.Н., Вахрушев И.В. Электрохимический сенсор для оценки накопления внеклеточного матрикса в культивируемых хондросферах // Учен. зап. Казан. ун-та. Сер. Естеств. науки. 2025. Т. 167, кн. 2. С. 185–200. <https://doi.org/10.26907/2542-064X.2025.2.185-200>.

Original article

<https://doi.org/10.26907/2542-064X.2025.2.185-200>

Electrochemical sensor for assessing the accumulation of extracellular matrix in cultured chondrospheres

V.D. Novikova¹, L.E. Agafonova¹✉, G.E. Leonov¹, L.A. Kirsanova², Yu.B. Basok²,
A.V. Kovalev³, V.V. Shumyantseva¹, K.N. Yarygin¹, I.V. Vakhrushev¹

¹*Institute of Biomedical Chemistry, Moscow, Russia*

²*V.I. Shumakov National Medical Research Center of Transplantology and Artificial Organs, Moscow, Russia*

³*National Medical Research Center of Traumatology and Orthopedics named after N.N. Priorov, Moscow, Russia*

✉ agafonovaluba@mail.ru

Abstract

The degeneration of cartilage in articular joints is a significant medical concern due to its high incidence rate. Damaged articular cartilage has a limited ability to regenerate naturally and thus often requires regenerative therapy. Intra-articular matrix-associated autologous chondrocyte transplantation, which involves the introduction of chondrocytes into the damaged area either as part of tissue-engineered constructs with a carrier matrix (scaffold) or in the form of tissue spheroids (chondrospheres), is generally considered the gold standard for treating such defects. This approach is probably the most biomimetic restorative articular cartilage treatment in the sense that it supports the cells in spheroids to produce and accumulate their own extracellular matrix. The growing interest in large-scale production of such biomedical cellular products raises the question of accessible and effective methods for assessing the quality of obtained chondrospheres, both in terms of their chemical composition and biological properties. Here, a sensor prototype based on comparative electrochemical profiling of chondrospheres is proposed for quantitative assessment of the accumulation of extracellular matrix components in hyaline cartilage.

Keywords: chondrospheres, articular cartilage, cell spheroids, extracellular matrix, collagen, glycosaminoglycans, electroanalysis

Institutional Review Board Statement. The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki and approved by the Ethics Committee of the National Medical Research Center of Traumatology and Orthopedics named after N.N. Priorov (protocol code 1/22 dated December 26, 2022).

Informed Consent Statement. Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

Acknowledgments. This study was performed as part of the Program for Basic Research in the Russian Federation for a Long-Term Period (2021–2030) (no. 122022800499-5).

For citation: Novikova V.D., Agafonova L.E., Leonov G.E., Kirsanova L.A., Basok Yu.B., Kovalev A.V., Shumyantseva V.V., Yarygin K.N., Vakhrushev I.V. Electrochemical sensor for assessing the accumulation of extracellular matrix in cultured chondrospheres. *Uchenye Zapiski Kazanskogo Universiteta. Seriya Estestvennye Nauki*, 2025, vol. 167, no. 2, pp. 185–200. <https://doi.org/10.26907/2542-064X.2025.2.185-200>. (In Russian)

Введение

Несмотря на критически важную физиологическую роль суставного хряща в обеспечении подвижности опорно-двигательного аппарата, его ткань обладает крайне низкой природной способностью к самовосстановлению. Главными причинами являются отсутствие в хряще кровеносных сосудов, а также высокая плотность внеклеточного матрикса (ВКМ). В течение жизни суставы испытывают высокую механическую нагрузку и нередко подвергаются травмам, что часто приводит к развитию хронических дегенеративных заболеваний, наиболее распространённым из которых является остеоартрит.

Золотым стандартом в регенеративной медицине хряща на сегодняшний день является трансплантация аутологичных хондроцитов в комплексе с матриксом-носителем (англ. MACI – matrix-associated autologous chondrocyte implantation) [1]. Основными функциями трехмерного матрикса (скаффолда) являются иммобилизация клеток и имитация их тканевой ниши. Его применение позволяет продлить выживаемость клеток в зоне введения и дает им возможность полнее реализовать свои регенеративные функции, что существенно повышает терапевтическую эффективность процедуры.

Для этих целей предложены различные биоразлагающиеся матриксы на основе природных и синтетических материалов, однако большинство из них не дошли до клинического применения. Первое разрешение Администрации по делам продовольствия и медикаментов США (англ. FDA – Food and Drug Administration) получил тканеинженерный препарат MACI (Vericel Corp., США) в 2021 г., представляющий собой аутологичные хондроциты, культивированные на мембране, состоящей из свиного коллагена [2].

Другим хорошо себя зарекомендовавшим подходом является трансплантация хондроцитов в виде трехмерных тканевых сфероидов, называемых хондросферами [3]. Формируясь в результате агрегации клеток в низкоадгезивных условиях, они являются, по сути, бескаффолдными тканеинженерными конструкциями [4]. При таком способе культивирования хондроциты имеют возможность образовывать межклеточные контакты и обмениваться регуляторными сигналами, а также вырабатывать и накапливать собственный ВКМ, что способствует сохранению их фенотипа и свойств [5].

Хондросферы успешно применяются в клинической практике с 2017 г. под брендом Spherex (CO.DON AG, Германия). Накопленные за этот период положительные результаты позволяют предположить, что производство хондросфер для терапевтических целей будет получать все более широкое распространение [6]. Одной из наиболее значимых проблем, сдерживающих этот процесс, является высокая вариабельность свойств первичных культур аутологичных хондроцитов, от которых напрямую зависит и терапевтическая эффективность хондросфер на их основе. По этой причине разработка способов контроля качества производимых хондросфер представляет важную практическую задачу для активно развивающейся регенеративной медицины [7].

Перспективным представляется применение для этих целей электрохимических методов. Многие важные процессы в живых клетках основаны на переносе электронов и, соответственно, могут быть зарегистрированы электрохимически. Например, окислительно-восстановительные реакции и изменения в ионном составе за счет протекания различных клеточных процессов, приводят к генерации и/или переносу электронов на внутренних и внешних мембранах клеток [8]. Кроме того, белки внешней оболочки клеточной мембраны могут быть зарегистрированы и идентифицированы на основе по реакциям электрохимического окисления некоторых аминокислот, входящих в состав белков (тирозин, триптофан,

цистеин, гистидин, цистин, метионин) [9, 10]. Следовательно, эукариотические и прокариотические клетки могут быть охарактеризованы как электрохимически динамичные системы, способные к переносу электронов, то есть к окислению и/или восстановлению клеточных компонентов, таких как белки, ДНК, РНК, простетические группы клеточных ферментов (гем, флавины, хиноны) [8]. Электроанализ клеток позволяет исследовать каталитические и электрохимические свойства их электротранспортных белков, анализировать метаболические клеточные процессы, прогнозировать антибиотикорезистентность клеток, использовать клетки для «зеленого» синтеза наночастиц металлов [11, 12]

Электрохимические методы позволяют не только зарегистрировать отдельные компоненты клеток (белковые и нуклеотидные молекулярные отпечатки, электроактивные ферменты), но и анализировать молекулярно-биологические процессы при трансфекции клеток, фрагментации ДНК после воздействия ферментов рестрикции и при апоптозе, при исследовании инактивации вирусов [13, 14]. Так, авторами работы [15] разработан подход для быстрого (3 мин) электрохимического скрининга внеклеточного матрикса дрожжей (*Saccharomyces cerevisiae*) *in vitro* с помощью электродов, модифицированных наночастицами палладия, в зависимости от оптической плотности, времени культивирования и используемой среды роста. Скрининг проводили по электроокислению вторичных метаболитов (органогидразинов) дрожжей в диапазоне потенциалов от +0.18 до +0.35 В в условиях циклической вольтамперометрии. Такой подход позволяет зарегистрировать незначительные различия в условиях культивирования клеток, а также отличить клетки дикого типа от генетически модифицированных вариантов.

На примере двумерных культур хондроцитов и клеточных сфероидов при концентрации 2×10^6 клеток/мл с помощью дифференциально-импульсной вольтамперометрии установлено [16], что для двумерных культур характерен один пик окисления при потенциале 0.56 ± 0.01 В, который, скорее всего, соответствует электрохимическому окислению экспонированных аминокислот (тирозин, триптофан, цистеин) мембранных белков клеток. Для хондросфер как моделей 3D-клеток регистрировали также второй пик окисления при потенциале 0.86 ± 0.01 В, который может соответствовать электропревращению метаболитов и других компонентов ВКМ. Таким образом, дифференциально-импульсная вольтамперометрия позволяет достоверно и количественно различать «двумерные» и «трехмерные» клетки.

В настоящем исследовании разработан сенсор для количественной оценки накопления ВКМ в составе тканевых сфероидов на основе хондроцитов человека (хондросфер) путем сравнительного электрохимического профилирования биоконпонентов, иммобилизованных на рабочей поверхности электрода.

1. Материалы и методы

1.1. Первичные культуры хондроцитов. Фрагменты суставного хряща получали с интактной суставной поверхности мышелка бедренной кости человека. Образцы промывали раствором Хенкса (ПанЭко, Россия) с добавлением 1 % антибиотика/антимикотика (ПанЭко, Россия). Ткань механически измельчали на кусочки размером менее ~ 1 мм³, помещали в 0.1 % раствор коллагеназы I (Gibco, США) и инкубировали в стандартных условиях (37 °С, 5 % CO₂, 80 % влажность) в течение 60 мин. Далее, осадив центрифугированием, измельченную и обработанную коллагеназой ткань переносили в культуральные флаконы 75 см² с питательной средой DMEM/F12 (ПанЭко, Россия) с добавлением 10 % фетальной бычьей сыворотки (Gibco, США), 100 ед/мл пенициллина/стрептомицина (ПанЭко, Россия) и 2 мМ L-глутамина (Gibco, США).

Культивирование проводили при 37 °С, 5 % CO₂, 80 % влажности со сменой питательной среды каждые 3–4 дня. По мере достижения монослоя, культуры пассировали. Сначала промывали клетки раствором Версена (ПанЭко, Россия), после чего инкубировали в смеси Версен + трипсин (1 : 1) (ПанЭко, Россия) в течение 5 мин при 37 °С. Затем клетки переводили в суспензию, центрифугировали, ресуспендировали в свежей питательной среде и пассировали в соотношении 1 : 3.

1.2. Получение хондросфер и хондрогенная дифференцировка. Сфероиды формировали с использованием 96 луночных планшетов из низкоадгезивного пластика (Corning, США). Для приготовления сфероидов клеточную суспензию, рассчитанную в количестве 250 тыс. кл./мл, вносили аликвотами по 200 мкл в лунки планшета. Планшеты с клетками помещали на 48 ч в CO₂-инкубатор в стандартные для культивирования условия (37 °С, 5 % CO₂, 80 % влажность). Спустя 48 ч, обычную ростовую среду заменяли на среду для хондрогенной дифференцировки, представлявшую собой DMEM HG (Gibco, США) с добавлением 100 ед/мл пенициллина (Gibco, США), 100 ед/мл стрептомицина (Gibco, США) и 2 мМ L-глутамина (Gibco, США), 1 % пирувата натрия (Gibco, США), 10 % ITS+Premix (Corning, США), 1 % фетальной бычьей сыворотки (Gibco, США), 0.25 % аскорбат-2-фосфата (Sigma-Aldrich, США), 0.0001 % дексаметазона (Sigma-Aldrich, США) и 10 нг/мл трансформирующего фактора роста β1 (TGF-β1) (PeproTech, США). Дальнейшее культивирование проводили в вышеуказанных условиях в течение трех недель с ежедневной сменой хондрогенной среды.

1.3. Гистологический анализ. Оценка накопления ВКМ. Хондросферы фиксировали в 10 % растворе забуференного формалина (Биовитрум, Россия) в течение 24 ч, промывали в проточной воде и обезвоживали в этаноле восходящей концентрации (70, 80, 90, и 96 %), затем выдерживали в смеси 96 % этанола с хлороформом или ксилолом и заливали в парафин. Срезы образцов толщиной 4–5 мкм делали с помощью микротомы Leica RM3255 (Leica Microsystems, Германия).

Гликозаминогликаны в исследуемых образцах выявляли, окрашивая срезы 1 % раствором альцианового синего (Sigma, США) в течение 30–45 минут. Затем срезы ополаскивали дистиллированной водой и докрашивали гематоксилином Майера 2 мин, обезвоживали в спиртах восходящей концентрации, просветляли в карбол-ксилоле, ксилоле и заключали в бальзам. Окрашивание образцов на общий коллаген проводили по методу Массона. Депарафинированные, регидратированные срезы окрашивали железным гематоксилином Вейгерта (Биовитрум, Россия) в течение 2 мин, затем 15 мин промывали водопроводной водой и окрашивали кислым фуксином 2 мин. После чего срезы быстро ополаскивали дистиллированной водой и помещали в 1 % раствор фосфорновольфрамовой кислоты на 10 мин. Раствор кислоты сливали, не ополаскивая срезы в воде, и помещали стекла в раствор анилинового синего на 1–2 мин, срезы ополаскивали водопроводной водой и дифференцировали в 1 % уксусной кислоте в течение 10 мин. Проводили обезвоживание в спиртах восходящих концентраций, просветляли в ксилоле и заключали в бальзам.

1.4. Подготовка образцов для электрохимического анализа. Образцы хондросфер после культивирования трижды отмывали фосфатно-солевым буферным раствором (ПанЭко, Россия) от хондрогенной среды и лизировали тремя циклами замораживания-размораживания с последующей ультразвуковой дезинтеграцией для равномерного нанесения на рабочий электрод.

Концентрацию ДНК измеряли с помощью набора Quant-IT® PicoGreen dsDNA Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, США). Хондросферы до и после культивирования с TGF- β 1 дважды отмывали фосфатно-солевым буферным раствором, разбавляли до 300 мкл и разрушали с помощью ультразвука до получения гомогената. В полученный лизат добавляли реагент PicoGreen™ согласно рекомендациям производителя и измеряли флуоресценцию ($\lambda_{\text{возб}} = 480$ нм, $\lambda_{\text{эм}} = 560$ нм) на микропланшетном ридере Infinite M200 Pro (Tecan, Швейцария).

1.5. Электрохимический анализ. Электрохимические измерения проводили на потенциостате PalmSens (PalmSens BV, Нидерланды) с программным обеспечением PSTrace (версия 5.8) и трехконтактными электродами, изготовленными методом трафаретной печати (КолорЭлектроникс, Россия). Электродная система состояла из графитовых рабочего и вспомогательного электродов (ПГЭ) и хлоридсеребряного электрода сравнения. Диаметр рабочего электрода равен 0.2 см (площадь 0.0314 см²).

Для приготовления 0.1 М калий-фосфатного буферного раствора, pH 7.4, содержащего 0.05 М NaCl, использовали однозамещенный фосфат калия и хлорид натрия («Реахим», Россия). В работе применяли также коммерческие реактивы: гиалуронат натрия (высокомолекулярная 1.2–1.4 МДа гиалуриновая кислота “CristalHyal”) (Soliance, Франция), одностенные углеродные нанотрубки (ОУНТ), стабилизированные карбоксиметилцеллюлозой (OCSiAl, Россия), и коллаген I типа (Gibco, США).

Электрохимические измерения проводили в аэробных условиях при комнатной температуре в условиях циклической (диапазон потенциалов от –0.3 до +1.2 В, шаг потенциала 10 мВ, скорость сканирования потенциала 50 мВ/с) и квадратно-волновой (диапазон потенциалов от 0.0 до +1.2 В, шаг потенциала 10 мВ, амплитуда 20 мВ и частота 10 Гц, скорость сканирования потенциала 100 мВ/с).

Рабочую поверхность ПГЭ модифицировали 2 мкл водной дисперсии (0.75 ± 0.05) мг/мл ОУНТ, стабилизированных карбоксиметилцеллюлозой (ПГЭ/ОУНТ). ПГЭ/ОУНТ инкубировали в течение 30 мин при комнатной температуре, затем проводили их предобработку (четыре скана в рабочем диапазоне потенциалов в квадратно-волновом режиме). На ПГЭ/ОУНТ наносили 2 мкл лизата клеток, коллагена или гиалуроната натрия и инкубировали 24 ч при +4 °С. Затем на электрод наносили 60 мкл калий-фосфатного буферного раствора, pH 7.4, содержащего 0.05 М NaCl, и проводили измерения в планарном режиме.

Для измерения электрохимических характеристик применяли коррекцию базовой линии в программе PSTrace. Электрохимическими характеристиками служили численные значения максимальной амплитуды тока пика окисления (I , мкА) и площадь пика (S , мкА $\times$ В) при соответствующих потенциалах (E , В). Для количественного сравнения полученные максимальные амплитуды токов электроокисления образцов хондросфер нормировали по концентрации в них двухцепочечной ДНК (дцДНК).

1.6. Статистическая обработка результатов. Статистический анализ выполняли в программе GraphPad Prism 9.0 (GraphPad Software, США). Сравнение двух групп проводили с помощью t -теста Стьюдента. Различия считали статистически значимыми при $p < 0.05$. Результаты представляли в виде среднего значения и стандартного отклонения.

2. Результаты и их обсуждение

2.1. Получение хондросфер из первичных хондроцитов человека. Из фрагментов ткани суставного хряща выделяли первичные культуры хондроцитов человека. Полученные культуры представляли собой морфологически однородную популяцию адгезивных одноядерных клеток с характерной полигональной морфологией. Клетки обладали выраженной способностью к миграции, позволявшей им быстро покидать фрагменты тканевого эксплантата и равномерно распределяться по пластику (рис. 1).

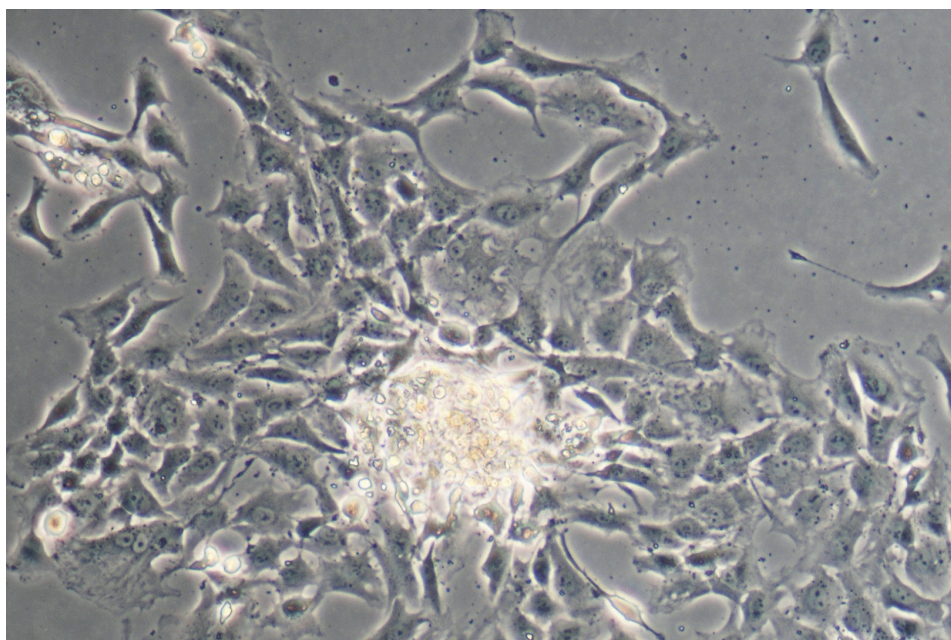


Рис. 1. Первичная культура хондроцитов человека на стадии выделения по данным фазово-контрастной микроскопии

Fig. 1. Primary culture of human chondrocytes at the stage of isolation based on phase-contrast microscopy data

Далее, по ранее отработанной методике [5, 17, 18], из двумерных культур получали трехмерные сфероиды (хондросферы) путем агрегации клеток в низкоадгезивных условиях. Как известно, в сфероиде клетки имеют возможность продуцировать и накапливать собственный экстрацеллюлярный матрикс, образуя при этом тканеподобные морфологические структуры [19]. Благодаря этим качествам, сфероиды на основе хондросферы являются эффективным терапевтическим инструментом для восстановления суставного хряща [20] и одновременно представляют собой оптимальную модель для изучения хондрогенеза *in vitro* [5]. Чтобы стимулировать продукцию ВКМ, характерного для гиалинового хряща, полученные хондросферы культивировали в течение трех недель в среде для индукции хондрогенной дифференцировки на основе TGF- β 1.

2.2. Гистологическое исследование накопления ВКМ в результате хондрогенной дифференцировки. Гистологическое исследование срезов хондросфер до и после культивирования с TGF- β 1 показало, что в процессе хондрогенной дифференцировки клетки наработали значительное количество ВКМ (рис. 2).

Методы гистохимического окрашивания позволили выявить в дифференцированных хондросферах высокое содержание гликозаминогликанов и коллагена, которые являются основными молекулярными компонентами хрящевой ткани [21].

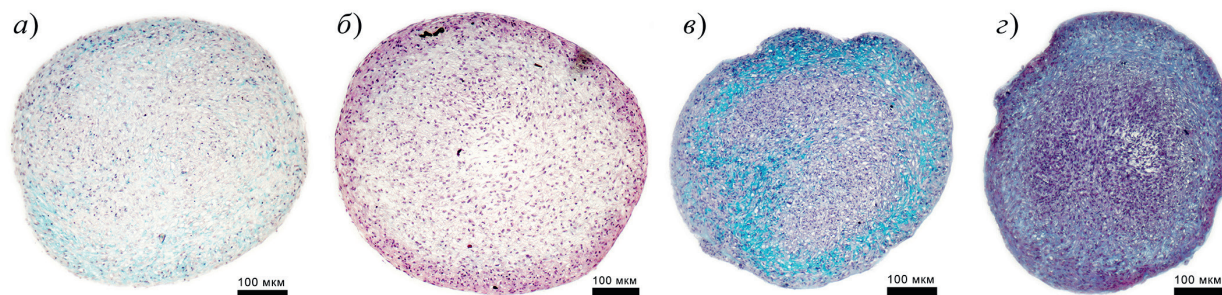


Рис. 2. Накопление внеклеточного матрикса в процессе хондрогенной дифференцировки клеток до внесения индукторов (*а* и *б*) и на 21-е сутки дифференцировки (*в* и *г*). Окрашивание альциановым синим (*а* и *в*) и по методу Массона (*б* и *г*)

Fig. 2. Accumulation of extracellular matrix during chondrogenic cell differentiation prior to the introduction of inducers (*a* and *b*) and on day 21 of differentiation (*c* and *d*). Alcian blue (*a* and *c*) and Masson's (*b* and *d*) staining

2.3. Электрохимическое профилирование хондросфер до и после культивирования с TGF- β 1. Количественная оценка накопления ВКМ. Поскольку методики гистохимического и гистоиммунологического окрашивания срезов являются качественными и не позволяют количественно оценить рост и накопление внеклеточного матрикса, был разработан электрохимический подход для выявления накопления ВКМ и степени дифференцировки клеток в культивируемых хондросферах на основе электроокисления основных компонентов ВКМ.

Образцы хондросфер до и после культивирования с TGF- β 1 не показали электрохимическую активность в условиях циклической вольтамперометрии в широком диапазоне потенциалов (от -0.3 до +1.2 В), что подтверждается отсутствием редокс-пигов на вольтамперограммах (рис. 3, *а*) и может быть связано с недостаточной чувствительностью метода применительно к исследованным клеточным моделям.

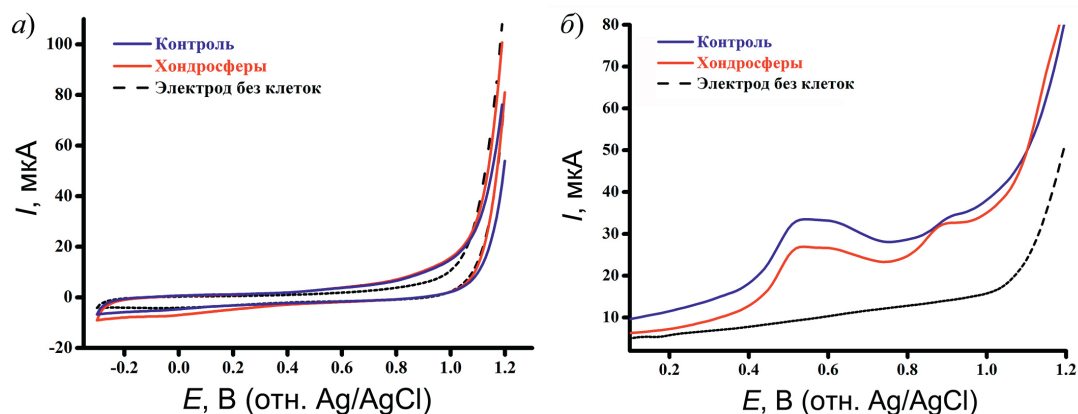


Рис. 3. Циклические (*а*) и квадратно-волновые (*б*) вольтамперограммы лизата контрольных сфероидов без добавления TGF- β 1 (синяя кривая) и дифференцированных хондросфер, культивированных в течение трех недель с добавлением TGF- β 1 (красная кривая), а также электрода без клеток (пунктирная кривая). Скорость сканирования потенциала 50 мВ/с в циклической вольтамперометрии, шаг потенциала 10 мВ, амплитуда 20 мВ и частота 10 Гц при скорости сканирования потенциала 100 мВ/с в квадратно-волновой вольтамперометрии

Fig. 3. Cyclic (*a*) and square wave (*b*) voltammograms of the lysates from the control spheroids without TGF- β 1 addition (blue curve) and differentiated chondrospheres cultured for three weeks with TGF- β 1 addition (red curve), as well as an electrode without cells (dashed curve). In cyclic voltammetry, potential scan rate is 50 mV/s. In square wave voltammetry, potential scan rate is 100 mV/s with potential step 10 mV, amplitude 20 mV, and frequency 10 Hz

Для увеличения чувствительности электрохимическое профилирование биообразцов проводили методом квадратно-волновой вольтамперометрии. В этом случае получены строго воспроизводимые значимые различия в свойствах контрольных и дифференцированных хондросфер (до и после культивирования с TGF- β 1, соответственно). В области потенциалов от +0.4 до +1.0 В для контрольных хондросфер регистрируется один интенсивный пик при потенциале 0.53 ± 0.01 В и «плечо» при потенциале 0.91 ± 0.01 В (рис. 3, б). Для дифференцированных хондросфер (трехнедельное культивирование с индуктором хондрогенной дифференцировки TGF- β 1) регистрируются два интенсивных пика окисления при потенциалах 0.52 ± 0.01 и 0.88 ± 0.01 В. Увеличение интенсивности максимальной амплитуды тока второго пика 2.5 ± 0.5 мкА при смещенном в область меньших значений потенциале 0.88 ± 0.01 В для дифференцированных хондросфер по сравнению с контрольными хондросферами, для которых ток окисления при 0.91 ± 0.01 В составляет 1.2 ± 0.1 мкА (рис. 3, б), говорит о термодинамически более выгодном процессе окисления на электроде. Разница в электрохимических профилях образцов (рис. 3, б) отражает изменение биологических характеристик хондросфер в процессе хондрогенной дифференцировки и, вероятно, связана с накоплением ВКМ в их структуре [16, 22–26].

Главными компонентами ВКМ в суставном хряще являются коллагены, эластин, адгезивные белки и основное вещество – протеогликаны, которые представляют собой высокомолекулярные соединения, состоящие из 5–10 % белка и 90–95 % гликозаминогликанов (гиалуроновая кислота, хондроитинсульфаты, кератансульфат, гепарансульфат и гепарин) [21]. Для идентификации зарегистрированных пиков окисления хондросфер электрохимически охарактеризованы основные компоненты ВКМ, характерные для хрящевой ткани, а именно коллаген и гиалуроновая кислота. На рис. 4 представлены квадратно-волновые вольтамперограммы окисления коллагена, гиалуроновой кислоты (гиалуроната натрия) и дифференцированных хондросфер в области потенциалов от 0.0 до +1.2 В.

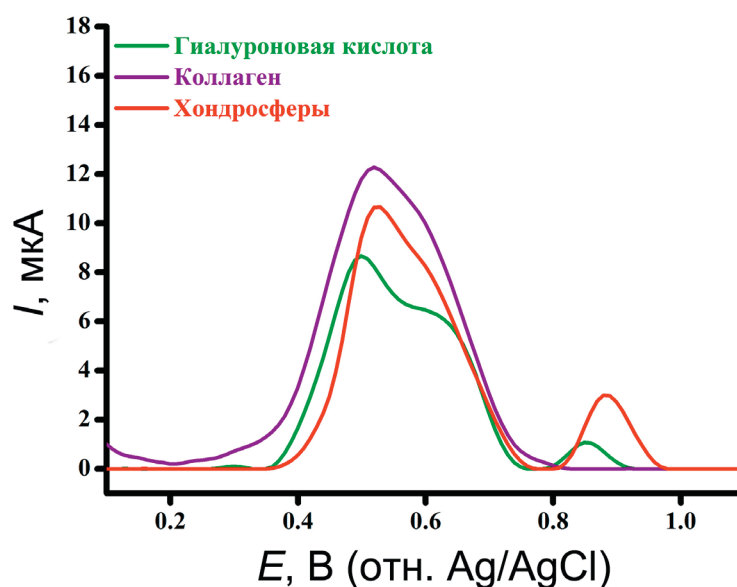


Рис. 4. Квадратно-волновые вольтамперограммы лизата дифференцированных хондросфер (красная кривая), 1 мг/мл гиалуроновой кислоты (зеленая кривая) и 0.5 мг/мл коллагена (фиолетовая кривая)

Fig. 4. Square wave voltammograms of the lysate of differentiated chondrospheres (red curve), 1 mg/mL of hyaluronic acid (green curve), and 0.5 mg/mL of collagen (purple curve)

Пик окисления дифференцированных хондросфер при потенциале 0.52 ± 0.01 В можно соотнести с окислением коллагена (рис. 4), входящего в состав внеклеточного матрикса. Пик обусловлен электроокислением аминокислотных остатков коллагена. Второй пик при потенциале 0.88 ± 0.01 В может соответствовать окислению гиалуроновой кислоты (рис. 4), являющейся одними из основных компонентов матрикса [27, 28].

Электрохимические характеристики дифференцированных хондросфер, коллагена и гиалуроната натрия приведены в табл. 1.

Табл. 1. Электрохимические характеристики дифференцированных хондросфер, коллагена и гиалуроната натрия, полученные на ПГЭ/ОУНТ в 0.1 М калий-фосфатном буферном растворе (pH 7.4)

Table 1. Electrochemical characteristics of differentiated chondrospheres, collagen, and sodium hyaluronate at SPGE/SWNT in 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 7.4)

Образец	$E_{ок1}$, В	$E_{ок2}$, В	$I_{ок1}$, мкА	$I_{ок2}$, мкА	S_1 , мкА×В	S_2 , мкА×В
Дифференцированные хондросферы	0.52 ± 0.01	0.88 ± 0.01	10.6 ± 0.2	2.5 ± 0.5	1.97 ± 0.04	0.20 ± 0.05
Коллаген	0.52 ± 0.01	—	11 ± 1	—	2.4 ± 0.2	—
Гиалуронат натрия	0.50 ± 0.01	0.85 ± 0.01	8.7 ± 0.2	1.3 ± 0.1	1.89 ± 0.05	0.088 ± 0.009

Для количественного сравнения дифференцированных и контрольных хондросфер полученные максимальные амплитуды токов электроокисления образцов (рис. 3, б) нормировали по концентрации в них дцДНК (табл. 2). Токи пиков электроокисления дифференцированных хондросфер увеличиваются на 13 % и 66 % для первого и второго пиков соответственно по сравнению с контрольными сфероидами (различия статистически значимы ($p \leq 0.05$ для первого пика и $p \leq 0.01$ для второго пика)), что подтверждает накопление экстрацеллюлярного матрикса при культивировании с TGF- β 1 в течение трех недель и согласуется с результатами гистохимического окрашивания (рис. 2).

Табл. 2. Электрохимические характеристики контрольных сфероидов и дифференцированных хондросфер, полученные на ПГЭ/ОУНТ в 0.1 М калий-фосфатном буферном растворе (pH 7.4) и нормированные по концентрации дцДНК, выделенной из клеток

Table 2. Electrochemical characteristics of control spheroids and differentiated chondrospheres at SPGE/SWNT in 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 7.4) and normalized by the concentration of dsDNA isolated from the cells

Тип клеток	[ДНК], мкг/мл	$E_{ок}$, В	$I/[ДНК]$, мкА/мкг×мл ⁻¹
Контрольные сфероиды	15.675	0.53 ± 0.01	0.82 ± 0.04
		0.91 ± 0.01	0.074 ± 0.009
Дифференцированные хондросферы	11.217	0.52 ± 0.01	0.94 ± 0.02
		0.88 ± 0.03	0.22 ± 0.04

Заключение

Предложен прототип сенсора для количественной оценки накопления компонентов внеклеточного матрикса гиалинового хряща в составе хондросфер, основанный на их сравнительном электрохимическом профилировании по данным квадратно-волновой вольтамперометрии. Регистрируемый вольтамперометрический сигнал хондросфероидов идентифицирован как электроокисление коллагена и гиалуроновой кислоты – основных компонентов экстра-

целлюлярного матрикса в исследованных образцах клеток. Проведено сравнительное электрохимическое профилирование контрольных сфероидов, культивированных без добавления TGF- β 1 и дифференцированных в течение трех недель с TGF- β 1 3D-хондросфер. При индуцированной дифференцировке хондроцитов происходит накопление экстрацеллюлярного матрикса, что отражается в увеличении максимальных амплитуд токов пиков электрохимического окисления дифференцированных хондросфер по сравнению с контрольными сфероидными. Полученные результаты согласуются с данными гистохимического исследования.

Сравнительный электроанализ позволяет зарегистрировать различия в условиях культивирования клеток, количественно охарактеризовать трехмерные клеточные сферические по величинам токов пиков электрохимического окисления компонентов экстрацеллюлярного матрикса. Такой подход может найти практическое применение в области контроля качества не только хондросфер, но и других тканеинженерных препаратов.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflicts of Interest. The authors declare no conflicts of interest.

Литература

1. Gille J., Behrens P., Schulz A.P., Oheim R., Kienast B. Matrix-associated autologous chondrocyte implantation: A clinical follow-up at 15 years // *Cartilage*. 2016. V. 7, No 4. P. 309–315. <https://doi.org/10.1177/1947603516638901>.
2. Carey J.L., Remmers A.E., Flanigan D.C. Use of MACI (autologous cultured chondrocytes on porcine collagen membrane) in the United States: Preliminary experience // *Orthop. J. Sports Med.* 2020. V. 8, No 8. Art. 2325967120941816. <https://doi.org/10.1177/2325967120941816>.
3. Vonk L.A., Roël G., Hernigou J., Kaps C., Hernigou P. Role of matrix-associated autologous chondrocyte implantation with spheroids in the treatment of large chondral defects in the knee: A systematic review // *Int. J. Mol. Sci.* 2021. V. 22, No 13. Art. 7149. <https://doi.org/10.3390/ijms22137149>.
4. Omelyanenko N.P., Karalkin P.A., Bulanov E.A., Koudan E.V., Parfenov V.A., Rodionov S.A., Knyazeva A.D., Kasyanov V.A., Babichenko I.I., Chkadua T.Z., Khesuani Y.D., Gryadunova A.A., Mironov V.A. Extracellular matrix determines biomechanical properties of chondrospheres during their maturation *in vitro* // *Cartilage*. 2020. V. 11, No 4. P. 521–531. <https://doi.org/10.1177/1947603518798890>.
5. Vakhrushev I.V., Basok Y.B., Baskaev K.K., Novikova V.D., Leonov G.E., Grigoriev A.M., Belova A.D., Kirsanova L.A., Lupatov A.Y., Burunova V.V., Kovalev A.V., Makarevich P.I., Sevastianov V.I., Yarygin K.N. Cartilage-specific gene expression and extracellular matrix deposition in the course of mesenchymal stromal cell chondrogenic differentiation in 3D spheroid culture // *Int. J. Mol. Sci.* 2024. V. 25, No 11. Art. 5695. <https://doi.org/10.3390/ijms25115695>.
6. Hoburg A., Löer I., Körsmeier K., Siebold R., Niemeyer P., Fickert S., Ruhnau K. Matrix-associated autologous chondrocyte implantation is an effective treatment at midterm follow-up in adolescents and young adults // *Orthop. J. Sports Med.* 2019. V. 7, No 4. Art. 2325967119841077. <https://doi.org/10.1177/2325967119841077>.
7. Eschen C., Kaps C., Widuchowski W., Fickert S., Zinser W., Niemeyer Ph., Roël G. Clinical outcome is significantly better with spheroid-based autologous chondrocyte implantation manufactured with more stringent cell culture criteria // *Osteoarthritis Cartilage Open*. 2020. V. 2, No 1. Art. 100033. <https://doi.org/10.1016/j.ocarto.2020.100033>.
8. Lovley D.R. Electromicrobiology // *Annu. Rev. Microbiol.* 2012. V. 66. P. 391–409. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-092611-150104>.
9. Brabec V., Mornstein V. Electrochemical behaviour of proteins at graphite electrodes. I. Electrooxidation of proteins as a new probe of protein structure and reactions // *Biochim. Biophys. Acta, Protein Struct.* 1980. V. 625, No 1. P. 43–50. [https://doi.org/10.1016/0005-2795\(80\)90106-3](https://doi.org/10.1016/0005-2795(80)90106-3).

10. Malfoy B., Reynaud J.A. Electrochemical investigations of amino acids at solid electrodes: Part II. Amino acids containing no sulfur atoms: Tryptophan, tyrosine, histidine and derivatives // J. Electroanal. Chem. Interfacial Electrochem. 1980. V. 114, No 2. P. 213–223. [https://doi.org/10.1016/S0022-0728\(80\)80448-7](https://doi.org/10.1016/S0022-0728(80)80448-7).
11. Шумянцева В.В., Шебанова А.С., Чаленко Я.М., Воейкова Т.А., Кирпичников М.П., Шайтан К.В., Дебабов В.Г. Электроанализ бактериальных клеток *Shewanella oneidensis* MR-1 // Доклады Академии наук. 2015. Т. 464, № 5. С. 629–632. <https://doi.org/10.7868/S0869565215290277>.
12. Chalenko Y., Shumyantseva V., Ermolaeva S., Archakov A. Electrochemistry of *Escherichia coli* JM109: Direct electron transfer and antibiotic resistance // Biosens. Bioelectron. 2012. V. 32, No 1. P. 219–223. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2011.12.015>.
13. Agafonova L.E., Zhdanov D.D., Gladilina Y.A., Shishparenok A.N., Shumyantseva V.V. Electrochemical approach for the analysis of DNA degradation in native DNA and apoptotic cells // Heliyon. 2024. V. 10, No 3. Art. e25602. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e25602>.
14. Жданов Д.Д., Ивин Ю.Ю., Шишпарёнок А.Н., Краевский С.В., Канащенко С.Л., Агафонова Л.Е., Шумянцева В.В., Гнеденко О.В., Пиняева А.Н., Ковпак А.А., Ишмухаметов А.А., Арчаков А.И. Перспективы создания вакцинных препаратов нового типа на основе псевдовиральных частиц (на примере вакцины против полиомиелита) // Биомедицинская химия. 2023. Т. 69, Вып. 5. С. 253–280. <https://doi.org/10.18097/PBMC20236905253>.
15. Silina Y.E., Fink-Straube C., Koch M., Zolotukhina E.V. A rapid *in vitro* electrochemical screening of extracellular matrix of *Saccharomyces cerevisiae* by palladium nanoparticles-modified electrodes // Bioelectrochemistry. 2023. V. 149. Art. 108283. <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2022.108283>.
16. Агафонова Л.Е., Вахрушев И.В., Новикова В.Д., Ярыгин К.Н., Шумянцева В.В. Перспективы электрохимических методов для сравнительного анализа двумерных культур хондроцитов и клеточных сфероидов // Тезисы докл. Междунар. конгр. «Биотехнология: состояние и перспективы развития», Москва, 25 сент. 2023 г. М.: ООО «Экспо-Биохим-Технологии», 2023. Вып. 21. С. 56–58. <https://doi.org/10.37747/2312-640X-2023-21-56-58>.
17. Басок Ю.Б., Григорьев А.М., Кирсанова Л.А., Вахрушев И.В., Цветкова А.В., Грядунова А.А., Ярыгин К.Н., Севастьянов В.И. Сравнительное исследование процесса хондрогенной дифференцировки мезенхимальных стромальных клеток, выделенных из разных источников // Вестник трансплантологии и искусственных органов. 2019. Т. 21, Вып. 1. С. 101–112. <https://doi.org/10.15825/1995-1191-2019-1-101-112>.
18. Цветкова А.В., Вахрушев И.В., Басок Ю.Б., Григорьев А.М., Кирсанова Л.А., Лунатов А.Ю., Севастьянов В.И., Ярыгин К.Н. Хондрогенный потенциал МСК различного происхождения в условиях сфероидного культивирования // Клеточные технологии в биологии и медицине. 2020. № 4. С. 237–246. <https://doi.org/10.47056/1814-3490-2020-4-237-246>.
19. Cui X., Hartanto Y., Zhang H. Advances in multicellular spheroids formation // J. R. Soc. Interface. 2017. V. 14, No 127. Art. 20160877. <https://doi.org/10.1098/rsif.2016.0877>.
20. Grevenstein D., Mamilos A., Schmitt V.H., Niedermair T., Wagner W., Kirkpatrick C.J., Brochhausen C. Excellent histological results in terms of articular cartilage regeneration after spheroid-based autologous chondrocyte implantation (ACI) // Knee Surg. Sports Traumatol. Arthrosc. 2021. V. 29, No 2. P. 417–421. <https://doi.org/10.1007/s00167-020-05976-9>.
21. Muir H. The chondrocyte, architect of cartilage. Biomechanics, structure, function and molecular biology of cartilage matrix macromolecules // BioEssays. 1995. V. 17, No 12. P. 1039–1048. <https://doi.org/10.1002/bies.950171208>.
22. Astashkina A., Grainger D.W. Critical analysis of 3-D organoid *in vitro* cell culture models for high-throughput drug candidate toxicity assessments // Adv. Drug Delivery Rev. 2014. V. 69–70. P. 1–18. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2014.02.008>.
23. Esch E.W., Bahinski A., Huh D. Organs-on-chips at the frontiers of drug discovery // Nat. Rev. Drug Discovery. 2015. V. 14, No 4. P. 248–260. <https://doi.org/10.1038/nrd4539>.

24. Hjelm B.E., Berta A.N., Nickerson C.A., Arntzen C.J., Herbst-Kralovetz M.M. Development and characterization of a three-dimensional organotypic human vaginal epithelial cell model // *Biol. Reprod.* 2010. V. 82, No 3. P. 617–627. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.109.080408>.
25. Radtke A.L., Herbst-Kralovetz M.M. Culturing and applications of rotating wall vessel bioreactor derived 3D epithelial cell models // *J. Visualized Exp.* 2012. No 62. Art. e3868. <https://doi.org/10.3791/3868>.
26. Shologu N., Gurdal M., Szegezdi E., FitzGerald U., Zeugolis D.I. Macromolecular crowding in the development of a three-dimensional organotypic human breast cancer model // *Biomaterials.* 2022. V. 287. Art. 121642. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2022.121642>.
27. Neame P.J., Barry F.P. The link proteins // *Experientia.* 1993. V. 49, No 5. P. 393–402. <https://doi.org/10.1007/BF01923584>.
28. Wilusz R.E., Sanchez-Adams J., Guilak F. The structure and function of the pericellular matrix of articular cartilage // *Matrix Biol.* 2014. V. 39. P. 25–32. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2014.08.009>.

References

1. Gille J., Behrens P., Schulz A.P., Oheim R., Kienast B. Matrix-associated autologous chondrocyte implantation: A clinical follow-up at 15 years. *Cartilage*, 2016, vol. 7, no. 4, pp. 309–315. <https://doi.org/10.1177/1947603516638901>.
2. Carey J.L., Remmers A.E., Flanigan D.C. Use of MACI (autologous cultured chondrocytes on porcine collagen membrane) in the United States: Preliminary experience. *Orthop. J. Sports Med.*, 2020, vol. 8, no. 8, art. 2325967120941816. <https://doi.org/10.1177/2325967120941816>.
3. Vonk L.A., Roël G., Hernigou J., Kaps C., Hernigou P. Role of matrix-associated autologous chondrocyte implantation with spheroids in the treatment of large chondral defects in the knee: A systematic review. *Int. J. Mol. Sci.*, 2021, vol. 22, no. 13, art. 7149. <https://doi.org/10.3390/ijms22137149>.
4. Omelyanenko N.P., Karalkin P.A., Bulanov E.A., Koudan E.V., Parfenov V.A., Rodionov S.A., Knyazeva A.D., Kasyanov V.A., Babichenko I.I., Chkadua T.Z., Khesuani Y.D., Gryadunova A.A., Mironov V.A. Extracellular matrix determines biomechanical properties of chondrospheres during their maturation *in vitro*. *Cartilage*, 2020, vol. 11, no. 4, pp. 521–531. <https://doi.org/10.1177/1947603518798890>.
5. Vakhrushev I.V., Basok Y.B., Baskaev K.K., Novikova V.D., Leonov G.E., Grigoriev A.M., Belova A.D., Kirsanova L.A., Lupatov A.Y., Burunova V.V., Kovalev A.V., Makarevich P.I., Sevastianov V.I., Yarygin K.N. Cartilage-specific gene expression and extracellular matrix deposition in the course of mesenchymal stromal cell chondrogenic differentiation in 3D spheroid culture. *Int. J. Mol. Sci.*, 2024, vol. 25, no. 11, art. 5695. <https://doi.org/10.3390/ijms25115695>.
6. Hoburg A., Löer I., Körsmeier K., Siebold R., Niemeyer P., Fickert S., Ruhnau K. Matrix-associated autologous chondrocyte implantation is an effective treatment at midterm follow-up in adolescents and young adults. *Orthop. J. Sports Med.*, 2019, vol. 7, no. 4, art. 2325967119841077. <https://doi.org/10.1177/2325967119841077>.
7. Eschen C., Kaps C., Widuchowski W., Fickert S., Zinser W., Niemeyer Ph., Roël G. Clinical outcome is significantly better with spheroid-based autologous chondrocyte implantation manufactured with more stringent cell culture criteria. *Osteoarthritis Cartilage Open*, 2020, vol. 2, no. 1, art. 100033. <https://doi.org/10.1016/j.ocarto.2020.100033>.
8. Lovley D.R. Electromicrobiology. *Annu. Rev. Microbiol.*, 2012, vol. 66, pp. 391–409. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-092611-150104>.
9. Brabec V., Mornstein V. Electrochemical behaviour of proteins at graphite electrodes. I. Electrooxidation of proteins as a new probe of protein structure and reactions. *Biochim. Biophys. Acta, Protein Struct.*, 1980, vol. 625, no. 1, pp. 43–50. [https://doi.org/10.1016/0005-2795\(80\)90106-3](https://doi.org/10.1016/0005-2795(80)90106-3).
10. Malfoy B., Reynaud J.A. Electrochemical investigations of amino acids at solid electrodes: Part II. Amino acids containing no sulfur atoms: Tryptophan, tyrosine, histidine and deriv-

- atives. *J. Electroanal. Chem. Interfacial Electrochem.*, 1980, vol. 114, no. 2, pp. 213–223. [https://doi.org/10.1016/S0022-0728\(80\)80448-7](https://doi.org/10.1016/S0022-0728(80)80448-7).
11. Shumyantseva V.V., Shebanova A.S., Chalenko Ya.M., Voeikova T.A., Kirpichnikov M.P., Shaitan K.V., Debabov V.G. Electroanalysis of *Shewanella oneidensis* MR-1. *Dokl. Biochem. Biophys.*, 2015, vol. 464, no. 1, pp. 325–328. <https://doi.org/10.1134/S1607672915050154>.
 12. Chalenko Y., Shumyantseva V., Ermolaeva S., Archakov A. Electrochemistry of *Escherichia coli* JM109: Direct electron transfer and antibiotic resistance. *Biosens. Bioelectron.*, 2012, vol. 32, no. 1, pp. 219–223. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2011.12.015>.
 13. Agafonova L.E., Zhdanov D.D., Gladilina Y.A., Shishparenok A.N., Shumyantseva V.V. Electrochemical approach for the analysis of DNA degradation in native DNA and apoptotic cells. *Heliyon*, 2024, vol. 10, no. 3, art. e25602. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e25602>.
 14. Zhdanov D.D., Ivin Yu.Yu., Shishparenok A.N., Kraevskiy S.V., Kanashenko S.L., Agafonova L.E., Shumyantseva V.V., Gnedenko O.V., Pinyeva A.N., Kovpak A.A., Ishmukhametov A.A., Archakov A.I. Perspectives for the creation of a new type of vaccine preparations based on pseudovirus particles using polio vaccine as an example. *Biomed. Khim.*, 2023, vol. 69, no. 5, pp. 253–280. <https://doi.org/10.18097/PBMC20236905253>.
 15. Silina Y.E., Fink-Straube C., Koch M., Zolotukhina E.V. A rapid *in vitro* electrochemical screening of extracellular matrix of *Saccharomyces cerevisiae* by palladium nanoparticles-modified electrodes. *Bioelectrochemistry*, 2023, vol. 149, art. 108283. <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2022.108283>.
 16. Agafonova L.E., Vakhrushev I.V., Novikova V.D., Yarygin K.N., Shumyantseva V.V. Prospects of electrochemical methods for the comparative analysis of two-dimensional cultures of chondrocytes and cell spheroids. *Tezisy dokl. Mezhdunar. kong. "Biotehnologiya: sostoyanie i perspektivy razvitiya"*, Moskva, 25 sent. 2023 g. [Proc. Int. Congr. "Biotechnology: State of the Art and Perspectives", Moscow, September 25, 2023]. Issue 21. Moscow, OOO "Ekspo-Biokhim-Tekhnologii", 2023, pp. 56–58. <https://doi.org/10.37747/2312-640X-2023-21-56-58>. (In Russian)
 17. Basok Yu.B., Grigoriev A.M., Kirsanova L.A., Vakhrushev I.V., Tsvetkova A.V., Gryadunova A.A., Yarygin K.N., Sevastianov V.I. The comparative study of chondrogenic differentiation of mesenchymal stromal cells allocated from different sources. *Vestn. Transplantologii Iskusstv. Organov*, 2019, vol. 21, no. 1, pp. 101–112. <https://doi.org/10.15825/1995-1191-2019-1-101-112>. (In Russian)
 18. Tsvetkova A.V., Vakhrushev I.V., Basok Yu.B., Grigor'ev A.M., Kirsanova L.A., Lupatov A.Yu., Sevastianov V.I., Yarygin K.N. Chondrogenic potential of the MSC of different origin in spheroid culture. *Bull. Exp. Biol. Med.*, 2021, vol. 170, no. 4, pp. 528–536. <https://doi.org/10.1007/s10517-021-05101-x>.
 19. Cui X., Hartanto Y., Zhang H. Advances in multicellular spheroids formation. *J. R. Soc. Interface*, 2017, vol. 14, no. 127, art. 20160877. <https://doi.org/10.1098/rsif.2016.0877>.
 20. Grevenstein D., Mamilos A., Schmitt V.H., Niedermair T., Wagner W., Kirkpatrick C.J., Brochhausen C. Excellent histological results in terms of articular cartilage regeneration after spheroid-based autologous chondrocyte implantation (ACI). *Knee Surg. Sports Traumatol. Arthrosc.*, 2021, vol. 29, no. 2, pp. 417–421. <https://doi.org/10.1007/s00167-020-05976-9>.
 21. Muir H. The chondrocyte, architect of cartilage. Biomechanics, structure, function and molecular biology of cartilage matrix macromolecules. *BioEssays*, 1995, vol. 17, no. 12, pp. 1039–1048. <https://doi.org/10.1002/bies.950171208>.
 22. Astashkina A., Grainger D.W. Critical analysis of 3-D organoid in vitro cell culture models for high-throughput drug candidate toxicity assessments. *Adv. Drug Delivery Rev.*, 2014, vol. 69–70, pp. 1–18. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2014.02.008>.
 23. Esch E.W., Bahinski A., Huh D. Organs-on-chips at the frontiers of drug discovery. *Nat. Rev. Drug Discovery*, 2015, vol. 14, no. 4, pp. 248–260. <https://doi.org/10.1038/nrd4539>.
 24. Hjelm B.E., Berta A.N., Nickerson C.A., Arntzen C.J., Herbst-Kralovetz M.M. Development and characterization of a three-dimensional organotypic human vaginal epithelial cell model. *Biol. Reprod.*, 2010, vol. 82, no. 3, pp. 617–627. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.109.080408>.

25. Radtke A.L., Herbst-Kralovetz M.M. Culturing and applications of rotating wall vessel bioreactor derived 3D epithelial cell models. *J. Visualized Exp.*, 2012, no. 62, art. e3868. <https://doi.org/10.3791/3868>.
26. Shologu N., Gurdal M., Szegezdi E., FitzGerald U., Zeugolis D.I. Macromolecular crowding in the development of a three-dimensional organotypic human breast cancer model. *Biomaterials*, 2022, vol. 287, art. 121642. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2022.121642>.
27. Neame P.J., Barry F.P. The link proteins. *Experientia*, 1993, vol. 49, no. 5, pp. 393–402. <https://doi.org/10.1007/BF01923584>.
28. Wilusz R.E., Sanchez-Adams J., Guilak F. The structure and function of the pericellular matrix of articular cartilage. *Matrix Biol.*, 2014, vol. 39, pp. 25–32. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2014.08.009>.

Информация об авторах

Виктория Дмитриевна Новикова, младший научный сотрудник лаборатории клеточной биологии, НИИ биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича

E-mail: vnlvikova@gmail.com

ORCID: <https://orcid.org/0009-0006-4502-6898>

Любовь Евгеньевна Агафонова, кандидат химических наук, старший научный сотрудник лаборатории биоэлектрохимии, НИИ биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича

E-mail: agafonovaluba@mail.ru

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3874-6556>

Георгий Евгеньевич Леонов, младший научный сотрудник лаборатории клеточной биологии, НИИ биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича

E-mail: golerus@gmail.com

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5632-7040>

Людмила Анфилофьевна Кирсанова, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник отдела биомедицинских материалов и тканевой инженерии, НМИЦ трансплантологии и искусственных органов имени академика В.И. Шумакова

E-mail: lyudochkakirsanova@mail.ru

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4870-611X>

Юлия Борисовна Басок, доктор биологических наук, заведующий отделом биомедицинских материалов и тканевой инженерии, НМИЦ трансплантологии и искусственных органов имени академика В.И. Шумакова

E-mail: bjb2005@mail.ru

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4807-3164>

Алексей Вячеславович Ковалев, кандидат медицинских наук, заведующий лабораторией клеточных технологий и медицинской генетики, НМИЦ травматологии и ортопедии имени Н.Н. Приорова

E-mail: kovalevav@cito-priorov.ru

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1277-5228>

Виктория Васильевна Шумянцева, доктор биологических наук, профессор, главный научный сотрудник, заведующий лабораторией биоэлектрохимии, НИИ биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича

E-mail: viktoria.shumyantseva@ibmc.msk.ru

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1509-7218>

Константин Никитич Ярыгин, доктор биологических наук, член-корреспондент РАН, главный научный сотрудник, заведующий лабораторией клеточной биологии, НИИ биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича

E-mail: kyarygin@yandex.ru

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2261-851X>

Игорь Викторович Вахрушев, кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник лаборатории клеточной биологии, НИИ биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича

E-mail: vakhrunya@gmail.com

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9367-6656>

Author Information

Victoria D. Novikova, Junior Researcher, Laboratory of Cell Biology, Institute of Biomedical Chemistry

E-mail: vnlvikova@gmail.com

ORCID: <https://orcid.org/0009-0006-4502-6898>

Lyubov E. Agafonova, Cand. Sci. (Chemistry), Senior Researcher, Laboratory of Bioelectrochemistry, Institute of Biomedical Chemistry

E-mail: agafonovaluba@mail.ru

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3874-6556>

Georgy E. Leonov, Junior Researcher, Laboratory of Cell Biology, Institute of Biomedical Chemistry

E-mail: golerus@gmail.com

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5632-7040>

Lyudmila A. Kirsanova, Cand. Sci. (Biology), Senior Researcher, Department of Biomedical Materials and Tissue Engineering, V.I. Shumakov National Medical Research Center of Transplantology and Artificial Organs

E-mail: lyudochkakirsanova@mail.ru

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4870-611X>

Yulia B. Basok, Dr. Sci. (Biology), Head of Department of Biomedical Materials and Tissue Engineering, V.I. Shumakov National Medical Research Center of Transplantology and Artificial Organs

E-mail: bjb2005@mail.ru

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4807-3164>

Alexey V. Kovalev, Cand. Sci. (Medicine), Head of Laboratory of Cell Technologies and Medicinal Genetics, National Medical Research Center of Traumatology and Orthopedics named after N.N. Priorov

E-mail: kovalevav@cito-priorov.ru

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1277-5228>

Victoria V. Shumyantseva, Dr. Sci. (Biology), Full Professor, Chief Researcher, Head of Laboratory of Bioelectrochemistry, Institute of Biomedical Chemistry

E-mail: viktoria.shumyantseva@ibmc.msk.ru

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1509-7218>

Konstantin N. Yarygin, Dr. Sci. (Biology), Corresponding Member of Russian Academy of Sciences, Chief Researcher, Head of the Laboratory of Cell Biology, Institute of Biomedical Chemistry

E-mail: kyarygin@yandex.ru

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2261-851X>

Igor V. Vakhrushev, Cand. Sci. (Medicine), Senior Researcher, Laboratory of Cell Biology, Institute of Biomedical Chemistry

E-mail: vakhrunya@gmail.com

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9367-6656>

Поступила в редакцию 13.12.2024

Принята к публикации 20.01.2025

Received December 13, 2024

Accepted January 20, 2025