

Federal State Budgetary Scientific Institution
«Institute of General Pathology and Pathophysiology»

PATHOGENESIS

Journal of Basic and Applied Medicine

Founded in 2003
Quarterly issue

Volume 13, №2, 2015

April—June

Editor-in-Chief
A.A. KUBATIEV (Moscow)

Co-editors
A.M. Dygay (Tomsk), E.A. Korneva (Saint-Petersburg), S.G. Morozov (Moscow)

Secretary
M.Yu. Karganov (Moscow)

Editorial board

Archakov A.I. (Moscow), Aftanas L.I. (Novosibirsk), Baranov V.M. (Moscow), Beregovykh V.V. (Moscow), Bobryshev Y.V. (Sydney, Australia), Ginter E.K. (Moscow), Grachev S.V. (Moscow), Downey H.F. (Fort Worth, USA), Kashkin K.P. (Moscow), Kzhyshkowska J.G. (Heidelberg, Germany), Kolesnikov S.I. (Moscow), Kushlinsky N.E. (Moscow), Manukhina E.B. (Fort Worth, USA), Ninkina N.N. (Cardiff, United Kingdom), Novitskiy V.V. (Tomsk), Paltsev M.A. (Moscow), Panchenko L.F. (Moscow), Petrov V.I. (Volgograd), Puzyrev V.P. (Tomsk), Revishvili A.Sh. (Moscow), Repin V.S. (Moscow), Sandrikov V.A. (Moscow), Sofronov G.A. (Saint-Petersburg), Sukhikh G.T. (Moscow), Tutelian V.A. (Moscow), Ugriumov M.V. (Moscow), Frank G.A. (Moscow), Chereshnev V.A. (Ekaterinburg), Chekhonin V.P. (Moscow), Shabalin V.N. (Moscow), Shvets V.I. (Moscow), Shliakhto E.V. (Saint-Petersburg), Yurkiv V.A. (Moscow)

Publish Department chief Irishkin D.A.
Scientific editor Chernobrovkina T.V.
Technical editor Komarova A.K.

Влияние эмбриональной телячьей сыворотки на формирование сфероидов из стромальных клеток лимба глаза

Кошелева Н.В.^{1,3}, Зурина И.М.¹, Сабурова И.Н.^{1,2}, Горкун А.А.¹, Колокольцова Т.Д.^{1,2}, Борзенко С.А.⁴, Репин В.С.^{1,2,4}

¹ — ФГБНУ «НИИ общей патологии и патофизиологии», Москва, Россия

² — ГБОУ ДПО РМАПО Минздрава России, 125993, Москва, Россия

³ — Биологический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

⁴ — ФГБУ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава РФ, Москва, Россия

E-mail: n_kosheleva@mail.ru

Широко используемый в последнее время метод 3D-культивирования с получением клеточных сфероидов открывает новые возможности моделирования и изучения патологических состояний, в том числе и в офтальмологии, позволяя изучать свойства и поведение клеток в условиях, приближенных к условиям *in vivo*. Основным источником стволовых клеток глаза для регенерации роговицы в норме и при патологии считается зона лимба. Мультипотентные мезенхимные стромальные клетки лимба (ММСК-Л), являющиеся производными нервного гребня, обладают широким дифференцировочным и регенеративным потенциалом. Одним из условий современных требований к культивированию клеток, особенно для применения в клинической практике, является использование бессывороточных сред. В настоящем исследовании изучали образование клеточных сфероидов из первичной культуры ММСК-Л при различной концентрации эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС) в ростовой среде. Показано, что за 7 сут. спонтанно формировались жизнеспособные сфероиды ММСК-Л как в бессывороточной среде, так и в среде, содержащей 1% и 10% ЭТС. В бессывороточной среде внешняя поверхность сфероидов состояла из округлых клеток. В присутствии ЭТС наблюдалось более плотное примыкание поверхностных клеток с образованием черепицеобразного наружного слоя. В среде с ЭТС между клетками внутренней зоны синтезировался внеклеточный матрикс, наибольшее количество внеклеточного матрикса обнаружено после культивирования в среде с 10% ЭТС.

Ключевые слова: 3D-культура, клеточные сфероиды, мультипотентные мезенхимные стромальные клетки лимба, эмбриональная телячья сыворотка, бессывороточная среда

Введение

Любым клеткам *in vitro* для поддержания жизнеспособности и пролиферации кроме базовых питательных веществ, таких, как соли, сахара, аминокислоты и витамины, необходимы компоненты, содержащиеся в биологических жидкостях и экстрактах. В качестве такой добавки к питательной среде пробовали использовать различные компоненты, например, экстракты эмбрионов, спинную и амниотическую жидкости, лимфу, молоко, молозиво, а также плазму крови и сыворотки из различных источников [11]. По доступности и простоте хранения проще всего использовать сыворотку крови. Поэтому эмбриональная телячья сыворотка (ЭТС) по-прежнему остается эталонным компонентом среды для культивирования клеток. ЭТС содержит питательный и гормональный компоненты, а также связывающие белки, которые необходимы для обеспечения пролиферации, дифференцировки и адгезии клеток [16, 26]. В разных партиях ЭТС сильно варьирует состав, что не позволяет стандартизовать этот компонент ростовых сред для клеток [30]. Кроме того, при использовании сыворотки животного происхождения для культивирования клеток человека с целью последующей трансплантации существует опасность иммунного ответа на ксеногенные компоненты сыворотки и возможность переноса вирусных и прионовых заболеваний. Для решения подобных задач разрабатывают различные варианты синтетических заменителей сыворотки крупного рогатого скота [9]. Бессывороточные среды про-

ще стандартизовать, они безопаснее и дешевле в производстве. Но для многих типов клеток из-за неполноты знаний об их физиологических и метаболических особенностях трудно заменить среду с ЭТС на раствор известных солей и заданных синтетических белковых добавок в подобранных концентрациях. Сведения о влиянии сыворотки на морфологию, пролиферацию и дифференцировочный потенциал для разных типов клеток противоречивы. Есть данные о поддержании недифференцированного статуса клеток в отсутствие сыворотки [18]. Напротив, недифференцированный статус эмбриональных стволовых клеток не удается поддержать без добавления сыворотки в ростовые среды [13]. На культуре мультипотентных мезенхимных стромальных клеток (ММСК) костного мозга было установлено снижение эффективности колониеобразования в бессывороточных средах, хотя недифференцированный фенотип клеток сохранялся [19]. Отсутствие сыворотки повышало эффективность индуцированной дифференцировки ММСК [8] и способствовало хондрогенезу в трехмерные условия культивирования [9, 20].

Поэтому разработка и внедрение бессывороточных сред являются одним из необходимых условий современных требований к культивированию клеток, особенно для применения в клинической практике. Эмбриональная телячья сыворотка, как компонент животного происхождения с непостоянным составом, обязательно должна быть по возможности исключена из состава ростовых сред по этическим и научно-практическим соображениям. Но различные линии и культуры клеток отличаются друг от

друга физиолого-биохимическими параметрами, поэтому, и составы сред должны подбираться индивидуально для каждой культуры. В протоколах надлежащей лабораторной практики (GLP — good laboratory practice) по работе с культурами клеток (GCCP — good cell culture practice) выделяют следующие типы полных ростовых сред без эмбриональной телячьей сыворотки: бессывороточные, безбелковые среды, среды без компонентов животного происхождения и синтетические среды. В бессывороточных средах не должно быть сыворотки крови, но могут присутствовать экстрагированные из тканей животных или растений белки. Безбелковые среды не должны содержать белки с большой молекулярной массой, но могут содержать фракции отдельных пептидов. В средах без компонентов животного происхождения не должно быть элементов, полученных из животных или от человека, но могут содержаться экстракты растительного происхождения, продукты синтеза дрожжей или бактерий. Для всех вышеуказанных сред невозможно описать полный химический состав. Химический состав должен быть описан для синтетических сред, не содержащих белки, лизаты и экстракты неизвестного состава. Синтетические среды при необходимости дополняют высокоочищенными гормонами и факторами роста животного или растительного происхождения или рекомбинантными аналогами [27]. Бессывороточные среды находят применение при различных вариантах культивирования: как при ведении культур клеток в монослой — 2D-культура, так и при культивировании в трехмерных 3D-условиях.

Поведение, пролиферативная активность и физиологические свойства клеток в трехмерных системах, в отличие от монослоя, приближены к условиям *in vivo*. Поэтому в последнее время именно в 3D-культурах проводят мониторинг пролиферации клеток, анализируют жизнеспособность, морфологию и дифференцировку клеток в ответ на разнообразные стимулы, изучают межклеточные взаимодействия, миграцию и инвазию опухолевых клеток в окружающие ткани, механизмы ангиогенеза, метаболизм лекарственных средств [6]. Кроме того, только 3D-культуры можно поддерживать в культуре в течение длительного времени — более месяца, в отличие от монослойных культур, которые быстро достигают конfluence и требуют постоянного пересева. Поэтому именно 3D-культуры используют в долгосрочных исследованиях, например, при изучении отсроченных эффектов лекарственных препаратов [10].

Возможность 3D-культивирования клеток, тканевая инженерия, совершенствование методов культивирования и состава ростовых сред позволяют создавать уникальные клеточные модели для фундаментального исследования различных патологий тканей и заболеваний [3]. Отсутствие животных со строением глаз полностью идентичным человеку способствует созданию моделей *in vitro* для исследования закономерностей строения и терапии зрительного аппарата человека. В последнее время основным источником стволовых клеток глаза, особенно для регенерации роговицы в норме и при патологии, считают зону лимба — 1,5–2 мм на границе роговицы и конъюнктивы. Стволовые клетки лимба человека, особенно для поддержания их фенотипа и сохранения дифференцировочного потенциала культивируют в 3D-системах с коллагеном [15, 22] или фидерными клетками животного происхождения [17]. Даже в новых

технологиях создания 3D-сэндвичей, когда фидерные клетки животного происхождения отделены от клеток человека мембраной, сохраняется компонент животного происхождения со всеми возможными рисками контаминации через среду [23].

Широко используемый в последнее время вариант 3D-культивирования с получением клеточных сфероидов открывает новые подходы моделирования патологических состояний, позволяет изучать гистогенез при помещении клеток в условия, воспроизводящие строение нативных тканей. Клеточные сфероиды получают в «висячих каплях» или на неадгезивных субстратах без фидера и матрикса животного происхождения. В нашей лаборатории давно идут успешные работы по культивированию эпителиальных и мезенхимных клеток различного происхождения в 3D-условиях с получением сфероидов [1, 2, 6, 7, 25].

Противоречивые сведения о влиянии бессывороточных сред на морфологию и физиологические свойства клеток, малочисленные данные о получении 3D-культур ММСК-Л определили цель нашего исследования — изучение и сравнение динамики формирования сфероидов ММСК-Л при изменении концентрации ЭТС в ростовой среде.

Материалы и методы

По предложенной ранее технологии получали первичные культуры ММСК из тканевых сегментов зоны лимба ММСК-Л постмортального глаза человека [4, 5]. Экспериментальные исследования на тканях, выделенных из постмортальных глаз человека, проводили в соответствии с официально принятыми процедурами и специальным разрешением в рамках законодательства РФ.

Клетки ММСК-Л до 4-го пассажа культивировали на чашках Петри в стандартных условиях (37 °C, 5% CO₂) в полной ростовой среде DMEM/F12 (1:1, БиолоТ, Санкт-Петербург) с добавлением L-глутамина (2 мМ/л, ПанЭко, Москва), гентамицина (50 мкг/мл, ПанЭко), инсулина-трансферрина-селенита (1:100, БиолоТ), 20 нг/мл bFGF (ProSpec, Израиль) и 10% эмбриональной телячьей сыворотки (HyClone, США). Смену полной ростовой среды осуществляли 2–3 раза в неделю. При достижении культурой 90% конfluence, пассировали ее с использованием растворов версена и 0,25% трипсина, действие трипсина инактивировали добавлением полной ростовой среды, плотность клеток при расसेве составляла 100 тыс.кл./мл. Для определения количества клеток и их жизнеспособности использовали автоматический счетчик клеток Countess (Invitrogen, США).

Иммунофенотипирование полученных культур проводили по следующим маркерным белкам: CD29, CD90, CD105, CD45, CD34, CD14, CD11b, CD19. Для иммунофенотипирования клетки отмывали от полной ростовой среды раствором версена, обрабатывали 0,25% раствором трипсина, инактивировали действие фермента добавлением среды, подсчитывали количество клеток и центрифугировали (7 мин, 1000g). Полученный осадок ресуспендировали и аликвотировали в растворе фосфатно-солевого буфера (pH = 7,4) с 1% сыворотки. Каждую пробу инкубировали в темноте (15 мин, 25 °C) с антителами (10 мкл антител на 1 млн клеток), конъюгированными с флуоресцентными метками (FITC — fluorescein isothiocyanate, PE

— phycoerythrin, PC5 Phycoerythrin-Cyanin 5.1). После центрифугирования (5 мин, 400g) пробы ресуспендировали в 1 мл раствора фосфатно-солевого буфера (pH = 7,4) с 1% сыворотки в пробирках для проточного цитофлуориметра. Полученные результаты анализировали на проточном цитофлуориметре Cytomics FC-500 (Beckman Coulter, Inc, США).

Из охарактеризованных монослойных 2D-культур 4-го пассажа получали 3D-культуры ММСК-Л — клеточные сфероиды по оригинальной разработанной методике культивирования в агарозных планшетах (Microtissues™, США), посевная концентрация составила 250 тыс.кл./мл. По составу полной ростовой среды для 3D-культивирования в работе использовали три варианта, отличающиеся содержанием эмбриональной телячьей сыворотки (HyClone, США): 0%, 1% и 10%.

Сфероидообразование изучали в течение 7 суток с использованием прибора для длительного прижизненного наблюдения Cell-IQ (CM Technologies, Финляндия). Фоторегистрацию каждые 30 мин осуществляли с помощью программы Cell-IQ Imagen, обработку изображений проводили в программном пакете Cell-IQ Analyzer.

Сформированные 7-дневные сфероиды фиксировали и исследовали с использованием методов световой и растровой электронной микроскопии. Фиксацию осуществляли в глutarовом альдегиде (1,5% раствор на 0,1M каодилатном буфере, pH = 7,3, 1–2 часа), дофиксировали OsO₄ (1% водный раствор, 1–2 часа), обезвоживали в спиртах восходящей концентрации (2 смены по 5 мин в каждой), ацетоне (3 смены по 10 мин) и заключали в смесь эпоксидных смол Araldite M и Araldite Hardener (Sigma, США), с добавлением катализатора DMP30 и пластификатора дибутилфталата. Для полимеризации смолы образцы инкубировали при +60°C в течение 3–5 суток. Ультратонкие срезы получали на ультратоме LKB-111 (Швеция), контрастировали в 1% растворе уранилацетата на дистиллированной воде и изучали с помощью просвечивающего электронного микроскопа JEM-1011. Для изучения препаратов с использованием метода растровой электронной микроскопии сфероиды после фиксации и обезвоживания высушивали в критической точке и перед сеансом образец напыляли в вакууме золотом, получая реплику (отпечаток), повторяющую контуры образца, которую впоследствии сканировали с использованием сканирующего электронного микроскопа CamScan.

Часть работы с использованием методов электронной микроскопии была выполнена на оборудовании лаборатории электронной микроскопии ЦКП Московского государственного университета им. М.В.Ломоносова при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ.

Результаты и обсуждение

ММСК-Л в условиях монослойного 2D-культивирования формировали монослой и сохраняли высокий пролиферативный потенциал до 4 пассажа. ММСК-Л имели характерную веретеновидную форму, диаметр клеток в суспензии при пассивировании не превышал 12 мкм. На 4-м пассаже ММСК-Л экспрессировали характерные для ММСК костного мозга маркеры (CD105, CD90 и CD29), практически не экспрессировали маркеры гемопоэтического и лимфоцитарного ряда CD45, CD34, CD14, CD11b, CD19. Сведения об иммунофенотипическом анализе культуры приведены в таблице.

Полученная культура ММСК-Л соответствует результатам других исследователей, выделявших мезенхимную популяцию из лимба глаза человека. Уже хорошо известно, что ММСК-Л — мультипотентные мезенхимные клетки, подобные ММСК костного мозга [21]. Более того, ММСК-Л являются не только нишеобразующими клетками для эпителиальных стволовых клеток лимба, при определенных условиях они могут менять фенотип на эпителиальный и участвовать в восстановлении, прежде всего эпителия роговицы. ММСК-Л в эмбриогенезе берут начало от производных нервного гребня. Эта уникальная популяция клеток коэкспрессирует маркеры классических ММСК (CD13, CD29, CD44, CD56, CD73, CD105) и гемопоэтические маркеры CD11b, CD34, CD133. Полученные нами данные иммунофенотипического анализа ММСК-Л согласуются с результатами американских учёных [24].

ММСК-Л полученной и охарактеризованной культуры 4-го пассажа переводили в условия 3D-культивирования в агарозных планшетах для получения клеточных сфероидов, позволяющей в каждой лунке планшета получать стандартные сфероиды из одинакового количества клеток. Единственным компонентом животного происхождения в такой системе являлась ЭТС. Для исследования использовали бессывороточную ростовую среду и среды с добавлением 1% и 10% ЭТС.

Иммунофенотипический анализ экспрессии поверхностных маркеров стромальными клетками зоны лимба человека (ММСК-Л) на 4-м пассаже

Таблица

Анализируемые маркеры	ММСК-Л (стромальные клетки зоны лимба)
CD105 (эндоглин)	99,5%
CD90 (Thy-1, гликопротеин суперсемейства иммуноглобулинов)	100%
CD29 (рецептор фибронектина, субъединица β1-интегрина)	100%
CD45 (LCA, общий антиген лейкоцитов)	16,8%
CD34 (поверхностный антиген предшественников гемопоэза)	5%
CD14 (активирующий макрофаги рецептор липополисахаридов и эндотоксинов)	11,0%
CD11b (интегрин α-M, участвующий во взаимодействии лимфоцитов)	21,9%
CD19 (B-лимфоцитарный антиген)	2,7%

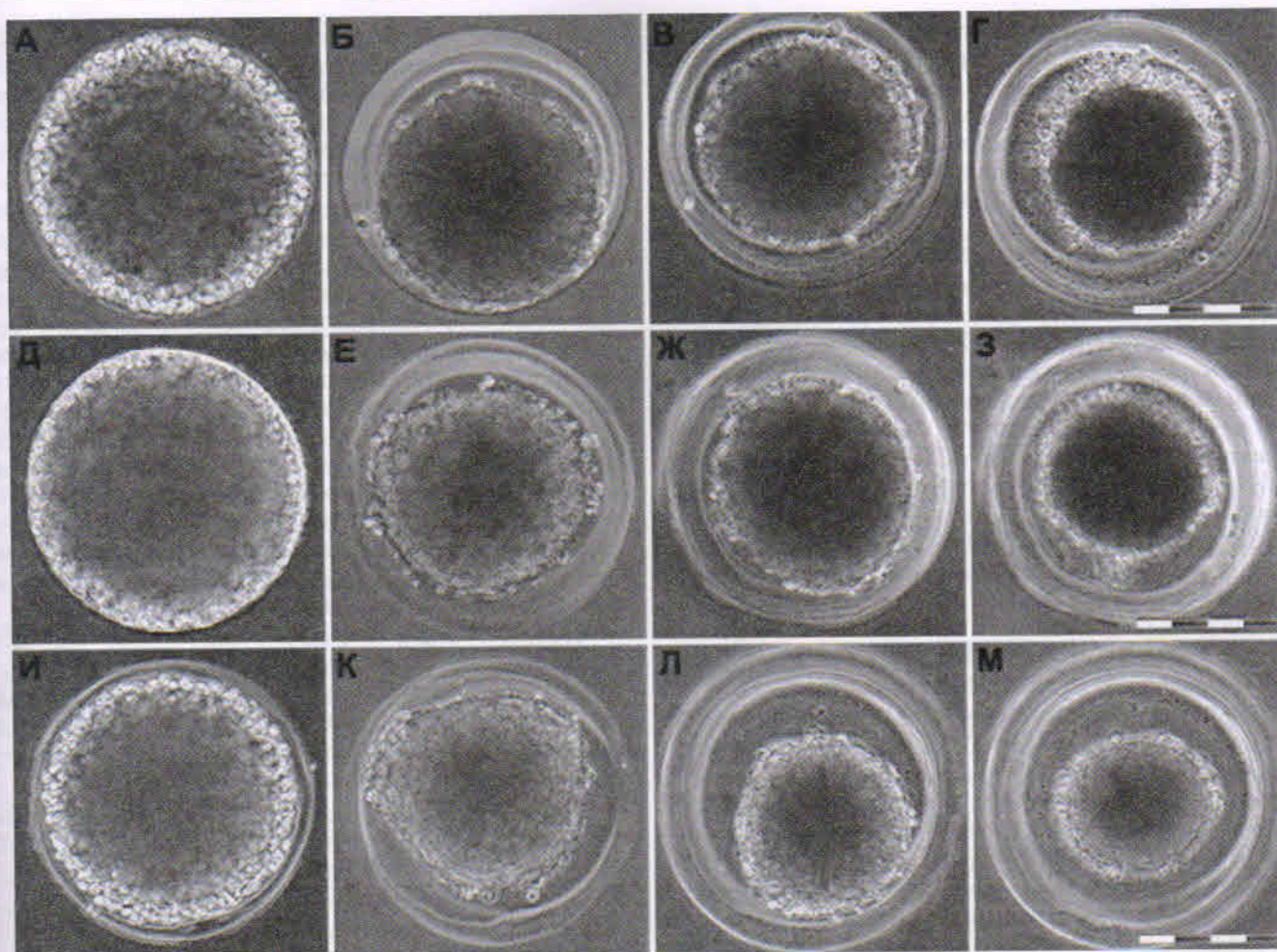


Рис. 1. Динамика формирования сфероидов ММСК-Л при различной концентрации ЭТС в среде: А-Г – бессывороточная среда (А – 0 часов, Б – 24 часа, В – 3 сутки, Г – 7 сутки); Д-З – 1% ЭТС в среде (Д – 0 часов, Е – 24 часа, Ж – 3 сутки, З – 7 сутки); И-К – 10% ЭТС в среде (И – 0 часов, К – 24 часа, Л – 3 сутки, М – 7 сутки). Прижизненная центрифужная световая микроскопия с фазовым контрастом. Измерительный отрезок 200 мкм.

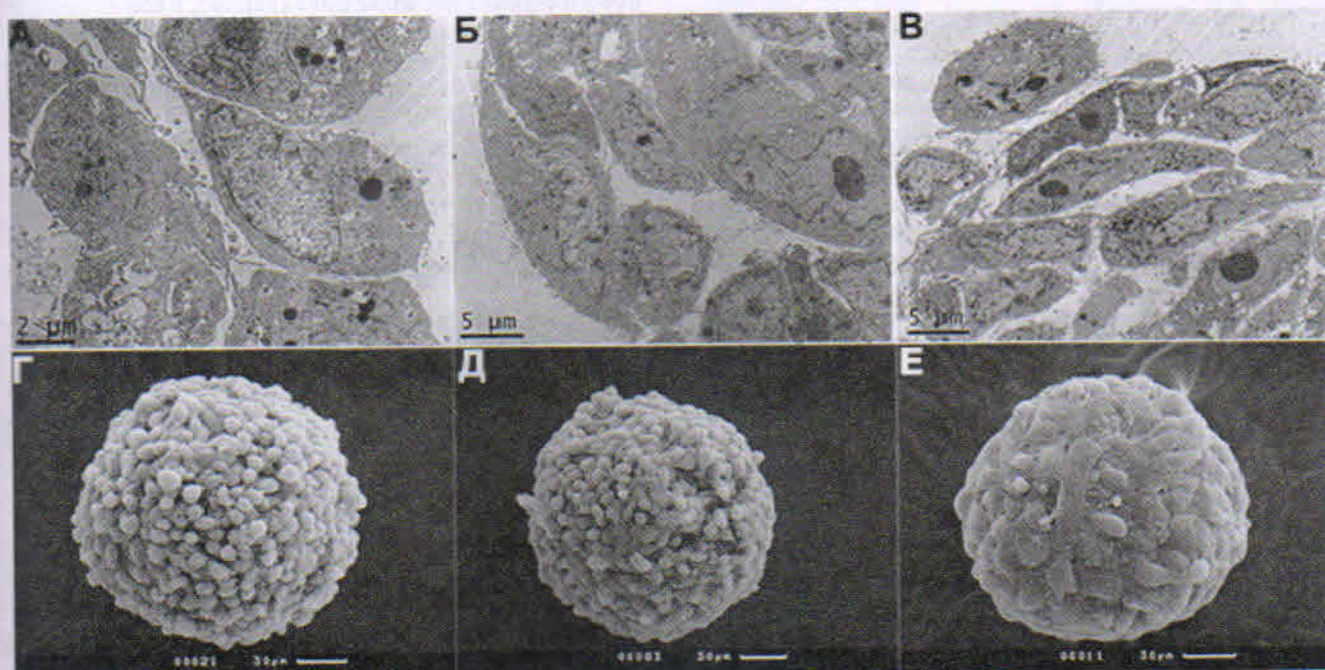


Рис. 2. Поверхностная зона сформированных 7-дневных сфероидов культивированных в средах с разным содержанием ЭТС: А, Г – бессывороточная среда, Б, Д – 1% ЭТС; В, Е – 10% ЭТС. А-В – просвечивающая электронная микроскопия; Г-Е – растровая электронная микроскопия.

Метод прижизненной цитраферной микроскопии на приборе Cell-IQ (СМ Technologies) позволил в динамике наблюдать процесс формирования сфероидов в 3D-культуре в разных ростовых средах. Общая динамика формирования сфероидов не зависела от наличия и количества ЭТС в среде — процесс компактизации начинался уже в первые сутки (рис. 1Б,Е,К) 3D-культивирования и продолжался до 7 суток (рис. 1Г,З,М). Однако при максимальной концентрации ЭТС (10%) компактизация проходила быстрее — уже на 3 сутки размер сфероидов был приближен к диаметру сформированного компактного 7-дневного сфероида (рис. 1Л). Размер сформированных сфероидов при разных концентрациях ЭТС практически не отличался и составлял примерно 200 мкм. Анализ изображений, полученных методом световой микроскопии с фазовым-контрастом, выявил разницу в общем строении сфероидов при различной концентрации ЭТС. В бессывороточной среде (рис. 1Г) и при 1% ЭТС (рис. 1З) поверхность сформированных сфероидов была рыхлой, в то время как на поверхности сфероидов, культивированных в присутствии 10% ЭТС (рис. 1М), на ровной поверхности сфероидов наблюдали лишь единичные округлые клетки. Поэтому был проведен дальнейший анализ морфологии полученных зрелых 7-дневных сфероидов.

Клеточные сфероиды состоят из поверхностной и внутренней зон, отличающихся морфологией и иммунотипом клеток [7, 25]. Анализ строения поверхностной зоны сфероидов ММСК-Л методами электронной микроскопии подтвердил наблюдения, полученные методом прижизненной цитраферной микроскопии. В бессывороточной среде поверхностные клетки были округлой формы и располагались рыхло (рис. 2А,Г), в то время как добавление минимального количества сыворотки (1% ЭТС) стимулировало распластывание клеток на поверхности сфероидов (рис. 2Б,Д). При добавлении в ростовую среду 10% ЭТС наблюдалось практически полное распластывание наружных слоев клеток и постепенное уплотнение поверхностной зоны в 3D-культуре (рис. 2В,Е). За счет растяжения клеток на поверхности сфероида в среде с добавлением ЭТС увеличивался их размер — если размер округлых клеток в отсутствие сыворотки составлял в среднем 5 мкм, то при добавлении ЭТС наибольшая протяженность вытянутых клеток достигала 15 мкм.

Электронно-микроскопический анализ строения внутренней области сфероидов также выявил определенные различия между сфероидом, культивированным

в средах с разным содержанием ЭТС. В бессывороточной среде внутренняя зона сфероидов была представлена рыхло расположенными полигональными клетками. В цитоплазме клеток присутствовало большое количество митохондрий, что свидетельствовало о высоком уровне энергетического обмена в клетках (рис. 3А).

Общая морфология клеток внутренней зоны в сфероиде, культивированном в ростовой среде с ЭТС, не отличалась от таковой в сфероиде из бессывороточной среды — мелкозернистая цитоплазма, большое количество митохондрий. Различия внутренней зоны выявили при изучении формирования внеклеточного матрикса. Добавление в ростовую среду даже 1% ЭТС запускало в клетках синтез небольшого количества внеклеточного матрикса (рис. 3Б). Увеличение количества ЭТС в ростовой среде до 10% дополнительно стимулировало синтез внеклеточного матрикса в межклеточном пространстве внутренней зоны сфероидов (рис. 3В). Вероятно, именно этот процесс способствовал распластыванию клеток поверхностной зоны и приводил к увеличению скорости компактизации сфероидов в среде с 10% ЭТС.

Известно, что в бессывороточных средах МССК-Л спонтанно формируют сфероиды [21]. Мы получили сфероиды ММСК-Л как в бессывороточной ростовой среде, так и в средах с 1% и 10% ЭТС. Процесс формирования сфероидов во всех случаях занимал 7 суток, диаметр сформированных сфероидов составлял 200 мкм.

Разработка технологии культивирования без сыворотки животного происхождения важна для последующего применения в клинической практике. Пока активно накапливаются сведения о строении и функциональном потенциале клеточных сфероидов. Работы по получению сфероидов в бессывороточных средах единичны. Например, в порах коммерческого продукта на основе альгинатов AlgiMatrix в бессывороточной среде успешно получили жизнеспособные сфероиды из ММСК Вартового студня пуповины быка [12]. Но, к сожалению, исследователи не охарактеризовали полученные сфероиды. Большинство исследователей при получении сфероидов в бессывороточных средах компенсируют ЭТС плазмой крови и факторами роста. Так, для культивирования сфероидов ММСК из подкожной жировой ткани человека использовали 2% плазмы крови человека с добавлением выделяемого тромбоцитами фактора роста (PDGF) и гепарина. В полученных сфероиде отсутствовали такие компоненты внеклеточного матрикса, как коллагены,

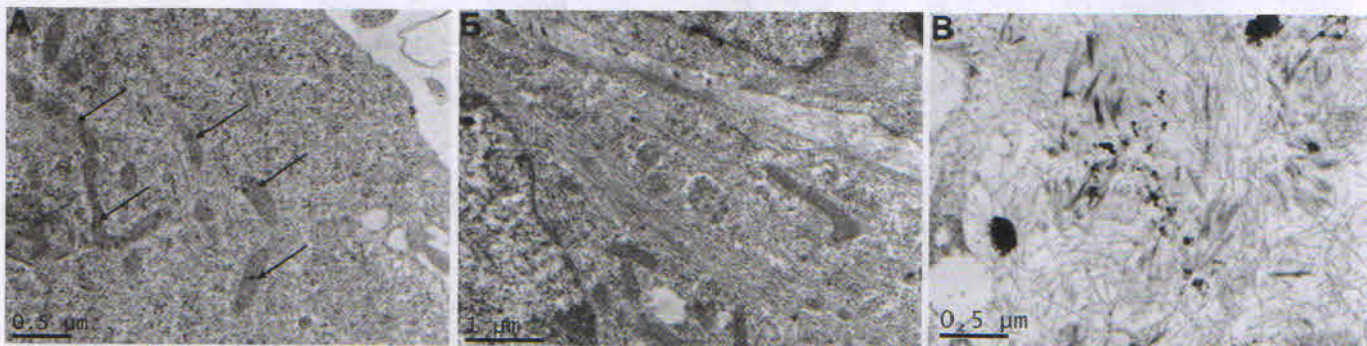


Рис. 3. Строение клеток внутренней зоны 7-дневных сфероидов ММСК-Л в средах с разным содержанием ЭТС: А — бессывороточная среда, стрелками обозначены митохондрии; Б — 1% ЭТС, синтез внеклеточного матрикса и появление развитого цитоскелета в клетке; В — 10% ЭТС, внеклеточный матрикс в межклеточном пространстве внутренней зоны сфероида. Просвечивающая электронная микроскопия.

фибронектин, эластин и гиалуроновая кислота [14]. Сфероиды из миобластов мышцы культивировали в бессывороточной среде с добавлением факторов роста фибробластов (bFGF), эпидермального фактора роста (hEGF) и B27 supplement, но полученные миосферы не были охарактеризованы [28].

Кроме того, существуют данные о негативном влиянии ЭТС на кератоциты — основные клетки роговицы, формирующиеся в результате дифференцировки стволовых клеток лимба. При культивировании в среде с ЭТС кератоциты теряли характерный для состояния *in vivo* покоящийся фенотип и приобретали фибробластоподобный фенотип с измененными физиологическими свойствами. В присутствии 2-10% ЭТС снижалась или прекращалась продукция основного компонента роговицы — кератан сульфата, а синтез дерматан сульфата, наоборот, повышался. Исследователи из Японии показали, что бессывороточные среды способствовали поддержанию морфологии кератоцитов и сохранению синтеза кератан сульфата, как в 2D, так и в 3D-культурах [29].

В нашем исследовании при культивировании ММСК-Л в бессывороточной среде формировались жизнеспособные сфероиды. Поверхностные клетки сфероидов сохраняли округлую форму, между клетками поверхностной и внутренней зон не выявлены компоненты внеклеточного матрикса. Синтез внеклеточного матрикса в сфероиде стимулировало добавление ЭТС в ростовую среду. Одним из основных компонентов внеклеточного матрикса является фибронектин, поверхностный белок, необходимый для контроля формы клеток и межклеточных взаимодействий [16]. Вероятно, ЭТС стимулирует синтез фибронектина ММСК-Л. Появление внеклеточного матрикса, развитый цитоскелет, в среде с ЭТС, вероятно, способствовали изменению формы поверхностных клеток, их распластыванию. Но, конечно, механизмы компактизации и формирования сфероидов ММСК-Л в бессывороточной среде и в присутствии ЭТС требуют дальнейшего изучения.

Полученные нами новые данные сравнительного анализа формирования сфероидов ММСК-Л в бессывороточной среде и в присутствии ЭТС расширяют и дополняют сведения о клеточных сфероиде. Показанная возможность получения жизнеспособных сфероидов ММСК-Л с сохранением высокой метаболической активности клеток в среде без сыворотки животного происхождения открывает новые перспективы в разработке терапевтических клеточных препаратов.

Заключение

В настоящем исследовании мы получили спонтанно сформировавшиеся жизнеспособные сфероиды ММСК-Л как в бессывороточной среде, так и в среде с содержанием 1 и 10% ЭТС. Формирование сфероидов происходило за 7 суток, пусковым фактором являлось отсутствие адгезии к субстрату, а не наличие сыворотки в среде. Во всех вариантах ростовых сред клетки сфероидов имели высокую энергетическую и метаболическую активность, хорошо были развиты митохондрии и везикулярный транспорт. Однако присутствие ЭТС в среде влияло на компактизацию сфероидов, только при 10% сыворотки клетки поверхностной зоны были уплощены. В бессывороточной среде клетки поверхностной зоны были ошарены, добавление

1% ЭТС инициировало их распластывание по поверхности сфероидов. В среде с ЭТС между клетками внутренней зоны синтезировался внеклеточный матрикс, наибольшее количество внеклеточного матрикса обнаружено после культивирования в среде с 10% ЭТС. Вероятно, именно вызванный наличием ЭТС синтез внеклеточного матрикса влиял на изменение формы клетками поверхностной зоны, стимулировал их распластывание с формированием черепицеобразных слоев.

Получение сфероидов клеток тканей глаза, в том числе ММСК-Л, открывает новые перспективы в разработке терапевтических агентов для купирования и лечения патологии и болезней зрительного аппарата.

Список литературы

1. Горкун А.А., Сабурин И.Н., Кошелева Н.В., Зурина И.М., Пулин А.А., Шагидулин М.Ю., Онищенко Н.А., Репин В.С. Эндотелиальные прогениторные клетки в мезенхимосфероиде пупочного канатика и их участие в процессах ангиогенеза и васкулогенеза при острой печеночной недостаточности // Патологическая физиология. — 2012. — №4. — С. 50—43.
2. Зурина И.М., Кошелева Н.В., Горкун А.А., Сабурин И.Н. Изучение формирования мезенхимосфероидов из соматических клеток человека // Онтогенез. — 2013. — Т. 44, №4. — С. 226—227.
3. Колокольцова Т.Д., Сабурин И.Н., Рыбаков А.С. Культура клеток как уникальная модель для исследования в современной биологии и медицине // Патогенез. — 2013. — Т. 11, №2. — С. 17—25.
4. Малюгин Б.Э., Борзенко С.А., Комах Ю.А., Арбуханова П.М., Желтоножко А.А., Сабурин И.Н., Колокольцова Т.Д., Зурина И.М., Агапов И.И., Богущ В.Г., Давыдова Л.И. Современные возможности клеточных технологий в конструировании биологического эквивалента искусственной роговицы // Бюллетень СО РАМН. — 2014. — Т. 34, №5. — С. 43—47.
5. Малюгин Б.Э., Борзенко С.А., Сабурин И.Н., Репин В.С., Кошелева Н.В., Колокольцова Т.Д., Зурина И.М., Комах Ю.А., Желтоножко А.А., Попов И.А., Давыдова Л.И., Богущ В.Г., Агапов И.И. Разработка биоинженерной конструкции искусственной роговицы на основе пленочного матрикса из спидроина и культивированных клеток лимбальной зоны глазного яблока // Офтальмохирургия. — 2013. — №4. — С. 89—97.
6. Сабурин И.Н., Горкун А.А., Кошелева Н.В., Семенов М.Л., Пулин А.А., Репин В.С. Сопоставление поведения стромальных клеток пупочного канатика и мультипотентных стромальных клеток взрослого костного мозга в 2-D- и 3-D-культуре: моделирование стромальной регенерации // Вестник новых медицинских технологий. — 2009. — Т. 16, №4. — С. 9—11.
7. Сабурин И.Н., Репин В.С. 3D-культивирование: от отдельных клеток к регенерационной ткани (к вопросу о феномене эпителио-мезенхимальной пластичности) // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. — 2010. — Т. 5, №2. — С. 75—86.
8. Agata H., Watanabe N., Ishii Y., Kubo N., Ohshima S., Yamazaki M., Tojo A., Kagami H. Feasibility and efficacy of bone tissue engineering using human bone marrow stromal cells cultivated in serum-free conditions // Biochemical and Biophysical Research Communications. — 2009. — Vol. 382, №2. — P. 353—358.
9. Ahmed N., Ju J., Brown C.E., Taylor D.W., Kandel R.A. Serum- and growth-factor-free three-dimensional culture system supports cartilage tissue formation by promoting collagen synthesis via Sox9-Col2a1 interaction // Tissue Engineering Part A. — 2014. — Vol. 20, №15—16. — P. 2224—2233.
10. Antoni D., Burckel H., Josset E., Noel G. Three-dimensional cell culture: a breakthrough in vivo // Int. J. Mol. Sci. — 2015. — Vol. 16. — P. 5517—5527.
11. Barnes D., Sato G. Serum-free cell culture: a unifying approach // Cell. — 1980. — Vol. 22. — P. 649—655.
12. Cardoso T.C., Ferrari H.F., Garcia A.F., Novais J.B., Silva-Frade C., Ferrarezi M.C., Andrade A.L., Gameiro R. Isolation and characterization of Wharton's jelly-derived multipotent mesenchymal stromal cells obtained from bovine umbilical cord and maintained in a defined serum-free three-dimensional system // BMC biotechnology. — 2012. — Vol. 12, №1. — P. 18.

13. Chen H.F., Kuo H.C., Chien C.L., Shun C.T., Yao Y.L., Ip P.L., Chuang C.Y., Wang C.C., Yang Y.S., Ho, H.N. Derivation, characterization and differentiation of human embryonic stem cells: comparing serum-containing versus serum-free media and evidence of germ cell differentiation // *Human Reproduction*. — 2007. — Vol. 22, №2. — С. 567–577.

14. Dromard C., Bourin P., Andre M., De Barros S., Casteilla L., Planat-Benard V. Human adipose derived stroma/stem cells grow in serum-free medium as floating spheres // *Experimental cell research*. — 2011. — Vol. 317, №6. — P. 770–780.

15. Dziasko M.A., Tuft S.J., Daniels J.T. Limbal melanocytes support limbal epithelial stem cells in 2D and 3D microenvironments // *Experimental eye research*. — 2015. — Vol. 138. — P. 70–79.

16. Grinnell F., Feld M.K. Initial adhesion of human fibroblasts in serum-free medium: possible role of secreted fibronectin // *Cell*. — 1979. — Vol. 17, №1. — P. 117–129.

17. Jung K.M., Lee S.H., Ryu Y.H., Jang W.H., Jung H.S., Han J.H., Seok S.H., Park J.H., Son Y., Park Y.H., Lim K.M. A new 3D reconstituted human corneal epithelium model as an alternative method for the eye irritation test // *Toxicology in Vitro*. — 2011. — Vol. 25, №1. — P. 403–410.

18. Okere B., Alviano F., Cost, R., Quaglini D., Ricci F., Dominici M., Paulucci P., Bonisi L., Iughetti L. In vitro differentiation of human amniotic epithelial cells into insulin-producing 3D spheroids // *International Journal of Immunopathology and Pharmacology*. — 2015. — P. 0394632015588439.

19. Koller M.R., Maher R.J., Manchel I., Oxender M., Smith A.K. Alternatives to animal sera for human bone marrow cell expansion: human serum and serum-free media // *Journal of hematotherapy*. — 1998. — Vol. 7, №5. — P. 413–423.

20. Malpeli M., Randazzo N., Cancedda R., Dozin B. Serum-free growth medium sustains commitment of human articular chondrocyte through maintenance of Sox9 expression // *Tissue engineering*. — 2004. — Vol. 10, №1–2. — P. 145–155.

21. Mariappan I., Kacham S., Purushotham J., Maddileti S., Siawwala J., Sangwan V.S. Spatial Distribution of Niche and Stem Cells in Ex Vivo Human Limbal Cultures // *Stem cells translational medicine*. — 2014. — P. sctm. 2014–0120.

22. Massie I., Kureshi A.K., Schrade S., Shortt A.J., Daniels J.T. Optimization of optical and mechanical properties of Real Architecture for 3-Dimensional Tissue equivalents: Towards treatment of limbal epithelial stem cell deficiency // *Acta biomaterialia*. — 2015.

23. Mei H., Gonzalez S., Nakatsu M.N., Baclagon E.R., Lopes V.S., Williams D.S., Deng S.X. A three-dimensional culture method to expand limbal stem/progenitor cells // *Tissue Engineering Part C: Methods*. — 2013. — Vol. 20, №5. — P. 393–400.

24. Nakatsu M.N., Gonzalez S., Mei H., Deng S.X. Human Limbal Mesenchymal Cells Support the Growth of Human Corneal Epithelial Stem/Progenitor Cells // *Investigative ophthalmology & visual science*. — 2014. — Vol. 55, №10. — P. 6953.

25. Repin V.S., Saburina I.N., Kosheleva N.V., Gorkun A.A., Zurina I.M., Kubatiev A.A. 3D-technology of the formation and maintenance of single dormant microspheres from 2000 human somatic cells and their reactivation in vitro // *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. — 2014. — Vol. 158, №1. — P. 137–144.

26. Sato J.D., Kan M. Media for culture of mammalian cells // *Current Protocols in Cell Biology*. — 2001. — P. 1.2. 1–1.2. 15.

27. Van der Valk J., Brunner D., De Smet K., Svenningsen E.F., Honegger P., Knudsen L.E., Lindl T., Norberg J., Price A., Scario M.L., Gstraunthaler G. Optimization of chemically defined cell culture media-replacing fetal bovine serum in mammalian in vitro methods // *Toxicology in vitro*. — 2010. — Vol. 24, №4. — P. 1053–1063.

28. Westerman K.A., Penvose A., Yang Z., Allen P.D., Vacanti C.A. Adult muscle 'stem' cells can be sustained in culture as free-floating myospheres // *Experimental cell research*. — 2010. — Vol. 316, №12. — P. 1966–1976.

29. Yoshida S., Shimmura S., Shimazaki J., Shinozaki N., Tsubota K. Serum-free spheroid culture of mouse corneal keratocytes // *Investigative ophthalmology & visual science*. — 2005. — Vol. 46, №5. — P. 1653–1658.

30. Zheng X., Baker H., Hancock W.S., Fawaz F., McCaman M., Pungor E. Proteomic analysis for the assessment of different lots of fetal bovine serum as a raw material for cell culture. Part IV. Application of proteomics to the manufacture of biological drugs // *Biotechnology progress*. — 2006. — Vol. 22, №5. — P. 1294–1300.

Список литературы

1. Gorkun A.A., Saburina I.N., Kosheleva N.V., Zurina I.M., Pulina A.A., Shagidulin M.Ju., Onishchenko N.A., Repin V.S. Jendoteliálne progenitorne kletky v mezenhimosferoidah pupochnogo kanatika i ih uchastie v processah angiogeneza i vaskulogeneza pri ostroj pechenochnoj nedostatochnosti // *Patologicheskaja fiziologija*. — 2012. — №4. — С. 50–43.

2. Zurina I.M., Kosheleva N.V., Gorkun A.A., Saburina I.N. Izuchenie formirovaniya mezenosferoidov iz somaticheskikh kletok che-loveka // *Ontogenez*. — 2013. — Т. 44, №4. — С. 226–227.

3. Kolokol'cova T.D., Saburina I.N., Rybakov A.S. Kul'tura kletok kak unikal'naja model' dlja issledovanija v sovremennoj biologii i medicine // *Patogenez*. — 2013. — Т. 11, №2. — С. 17–25.

4. Maljugin B.Je., Borzenok S.A., Komah Ju.A., Arbuhanova P.M., Zheltonozhko A.A., Saburina I.N., Kolokol'cova T.D., Zurina I.M., Agapov I.I., Bogush V.G., Davydova L.I. Sovremennye voz-mozhnosti kletocnyh tehnologij v konstruirovanii biologicheskogo jekvivallenta iskusstvennoj rogovicy // *Bjulleten' SO RAMN*. — 2014. — Т. 34, №5. — С. 43–47.

5. Maljugin B.Je., Borzenok S.A., Saburina I.N., Repin V.S., Kosheleva N.V., Kolokol'cova T.D., Zurina I.M., Komah Ju.A., Zheltonozhko A.A., Popov I.A., Davydova L.I., Bogush V.G., Agapov I.I. Razrabotka bioinzhenernoj konstrukcii iskusstvennoj rogovicy na os-nove plenuochnogo matriksa iz spidroina i kul'tivirovannyh kletok lim-bal'noj zony glaznogo jablaka // *Oftalmohirurgija*. — 2013. — №4. — С. 89–97.

6. Saburina I.N., Gorkun A.A., Kosheleva N.V., Semenova M.L., Pulina A.A., Repin V.S. Sopostavlenie povedeniya stromal'nyh kletok pupochnogo kanatika i mul'tipotentnyh stromal'nyh kletok vzroslogo kostnogo mozga v 2-D- i 3-D-kul'ture: modelirovanie stromal'noj re-generacii // *Vestnik novyh medicinskih tehnologij*. — 2009. — Т. 16, №4. — С. 9–11.

7. Saburina I.N., Repin V.S. 3D-kul'tivirovanie: ot otdel'nyh kletok k regeneracionnoj tkani (k voprosu o fenomene jepitelio-mezenhimal'noj plastichnosti) // *Kletocnaja transplantologija i tkanevaja inzhene-rija*. — 2010. — Т. 5, №2. — С. 75–86.8. Agata H., Watanabe N., Ishii Y., Kubo N., Ohshima S., Yamazaki M., Tojo A., Kagami H. Fea-sibility and efficacy of bone tissue engineering using human bone mar-row stromal cells cultivated in serum-free conditions // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. — 2009. — Vol. 382, №2. — P. 353–358.

9. Ahmed N., Iu J., Brown C.E., Taylor D.W., Kandel R.A. Serum- and growth-factor-free three-dimensional culture system sup-ports cartilage tissue formation by promoting collagen synthesis via Sox9-Col2a1 interaction // *Tissue Engineering Part A*. — 2014. — Vol. 20, №15–16. — P. 2224–2233.

10. Antoni D., Burckel H., Josset E., Noel G. Three-dimensional cell culture: a breakthrough in vivo // *Int. J. Mol. Sci.* — 2015. — Vol. 16. — P. 5517–5527.

11. Barnes D., Sato G. Serum-free cell culture: a unifying approach // *Cell*. — 1980. — Vol. 22. — P. 649–655.

12. Cardoso T.C., Ferrari H.F., Garcia A.F., Novais J.B., Sil-va-Frade C., Ferrarezi M.C., Andrade A.L., Gameiro R. Isolation and characterization of Wharton's jelly-derived multipotent mesenchymal stromal cells obtained from bovine umbilical cord and maintained in a defined serum-free three-dimensional system // *BMC biotechnology*. — 2012. — Vol. 12, №1. — P. 18.

13. Chen H.F., Kuo H.C., Chien C.L., Shun C.T., Yao Y.L., Ip P.L., Chuang C.Y., Wang C.C., Yang Y.S., Ho, H.N. Derivation, characterization and differentiation of human embryonic stem cells: comparing serum-containing versus serum-free media and evidence of germ cell differentiation // *Human Reproduction*. — 2007. — Vol. 22, №2. — С. 567–577.

14. Dromard C., Bourin P., Andre M., De Barros S., Casteilla L., Planat-Benard V. Human adipose derived stroma/stem cells grow in serum-free medium as floating spheres // *Experimental cell research*. — 2011. — Vol. 317, №6. — P. 770–780.

15. Dziasko M.A., Tuft S.J., Daniels J.T. Limbal melanocytes sup-port limbal epithelial stem cells in 2D and 3D microenvironments // *Experimental eye research*. — 2015. — Vol. 138. — P. 70–79.

16. Grinnell F., Feld M.K. Initial adhesion of human fibroblasts in serum-free medium: possible role of secreted fibronectin // *Cell*. — 1979. — Vol. 17, №1. — P. 117–129.

17. Jung K.M., Lee S.H., Ryu Y.H., Jang W.H., Jung H.S., Han J.H., Seok S.H., Park J.H., Son Y., Park Y.H., Lim K.M. A new 3D reconstituted human corneal epithelium model as an alternative

method for the eye irritation test // *Toxicology in Vitro*. — 2011. — Vol. 25, №1. — P. 403–410.

18. Okere B., Alviano F., Cost, R., Quaglini D., Ricci F., Domini M., Paulucci P., Bonis L., Iughetti L. In vitro differentiation of human amniotic epithelial cells into insulin-producing 3D spheroids // *International Journal of Immunopathology and Pharmacology*. — 2015. — P. 0394632015588439.

19. Koller M.R., Maher R.J., Manchel L., Oxender M., Smith A.K. Alternatives to animal sera for human bone marrow cell expansion: human serum and serum-free media // *Journal of hematotherapy*. — 1998. — Vol. 7, №5. — P. 413–423.

20. Malpeli M., Randazzo N., Cancedda R., Dozin B. Serum-free growth medium sustains commitment of human articular chondrocyte through maintenance of Sox9 expression // *Tissue engineering*. — 2004. — Vol. 10, №1–2. — P. 145–155.

21. Mariappan I., Kacham S., Purushotham J., Maddileti S., Siamwala J., Sangwan V.S. Spatial Distribution of Niche and Stem Cells in Ex Vivo Human Limbal Cultures // *Stem cells translational medicine*. — 2014. — P. sctm. 2014–0120.

22. Massie I., Kureshi A.K., Schrade S., Shortt A.J., Daniels J.T. Optimization of optical and mechanical properties of Real Architecture for 3-Dimensional Tissue equivalents: Towards treatment of limbal epithelial stem cell deficiency // *Acta biomaterialia*. — 2015.

23. Mei H., Gonzalez S., Nakatsu M.N., Baclagon E.R., Lopes V.S., Williams D.S., Deng S.X. A three-dimensional culture method to expand limbal stem/progenitor cells // *Tissue Engineering Part C: Methods*. — 2013. — Vol. 20, №5. — P. 393–400.

24. Nakatsu M.N., Gonzalez S., Mei H., Deng S.X. Human Limbal Mesenchymal Cells Support the Growth of Human Corneal Epithelial Stem/Progenitor Cells // *Investigative ophthalmology & visual science*. — 2014. — Vol. 55, №10. — P. 6953.

25. Repin V.S., Saburina I.N., Kosheleva N.V., Gorkun A.A., Zurina I.M., Kubatiev A.A. 3D-technology of the formation and maintenance of single dormant microspheres from 2000 human somatic cells and their reactivation in vitro // *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. — 2014. — Vol. 158, №1. — P. 137–144.

26. Sato J.D., Kan M. Media for culture of mammalian cells // *Current Protocols in Cell Biology*. — 2001. — P. 1.2. 1–1.2. 15.

27. Van der Valk J., Brunner D., De Smet K., Svenningsen E.F., Honegger P., Knudsen L.E., Lindl T., Norberg J., Price A., Scarni M.L., Gstraunthaler G. Optimization of chemically defined cell culture media-replacing fetal bovine serum in mammalian in vitro methods // *Toxicology in vitro*. — 2010. — Vol. 24, №4. — P. 1053–1063.

28. Westerman K.A., Penrose A., Yang Z., Allen P.D., Vacanti C.A. Adult muscle 'stem' cells can be sustained in culture as free-floating myospheres // *Experimental cell research*. — 2010. — Vol. 316, №12. — P. 1966–1976.

29. Yoshida S., Shimmura S., Shimazaki J., Shinozaki N., Tsubota K. Serum-free spheroid culture of mouse corneal keratocytes // *Investigative ophthalmology & visual science*. — 2005. — Vol. 46, №5. — P. 1653–1658.

30. Zheng X., Baker H., Hancock W.S., Fawaz F., McCaman M., Pungor E. Proteomic analysis for the assessment of different lots of fetal bovine serum as a raw material for cell culture. Part IV. Application of proteomics to the manufacture of biological drugs // *Biotechnology progress*. — 2006. — Vol. 22, №5. — P. 1294–1300.

Получено 06.03.2015

The impact of fetal bovine serum on formation of spheroids from eye stromal limbal cells

**Kosheleva N.V.^{1,3}, Zurina I.M.¹, Saburina I.N.^{1,2}, Gorkun A.A.¹,
Kolokoltsova T.D.^{1,2}, Borzenok S.A.⁴, Repin V.S.^{1,2,4}**

¹ — FSBSI «Institute of general pathology and pathophysiology», 8, Baltiyskaya st., 125315, Moscow, Russia

² — Russian Medical Academy of Postgraduate Education, 2/1, Barrikadnaya st., 123995, Moscow, Russia

³ — Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, 119234, 1, pp. 12, Leninskiye gori, Moscow, Russia

⁴ — Fyodorov Eye Microsurgery Complex FSBI, 59a, Beskudnikovskiy boulevard, 127486, Moscow, Russia

E-mail: n_kosheleva@mail.ru

Widely used 3D culture technique, which allows obtaining cellular spheroids, opens up new opportunities for modelling and studying pathological conditions, including ophthalmological ones, studying cellular characteristics and behavior in environment close to in vivo conditions. Limbal zone is considered to be the main source of eye stem cells for cornea regeneration under both normal and pathological conditions. Limbal multipotent mesenchymal stromal cells that are the derivative of neural crest have a wide potential for differentiation and regeneration. One of the up-to-date requirements for cell cultures, especially in clinical practice, is the use of serum-free media. The current article is concerned with studying formation of cellular spheroids from primary L-MMSC cell culture in growth media containing different concentrations of fetal bovine serum (FBS). We showed that both in serum-free and serum-containing (1% and 10%) media cells formed viable spheroids by the 7th day. In serum-free medium spheroids' surface was performed with round cells, whereas addition of different concentrations of serum resulted in formation of tegular surface layer. In the media containing serum the inner cells of spheroids synthesized intercellular matrix, with the greater amount of matrix after culturing in medium with 10% of FBS.

Key words: 3D culture, cellular spheroids, limbal multipotent mesenchymal stromal cells, fetal bovine serum, serum-free medium