



УДК 576.3; 57.04; 57.086; 57.086,083; 602.9.

## СПОНТАННЕ УТВОРЕННЯ СФЕРОЇДІВ У КУЛЬТУРАХ КЛІТИН МАТРИКСУ ПУПОВИНИ ЛЮДИНИ

**О. О. Маслоva<sup>1,2</sup>, С. П. Шпильова<sup>3</sup>, Н. С. Шувалова<sup>1,3</sup>,  
О. Г. Дерябіна<sup>1</sup>, В. А. Кордюм<sup>1,3</sup>**

<sup>1</sup>ДУ „Інститут генетичної та регенеративної медицини  
Національної академії медичних наук України”, вул. Вишгородська, 67, Київ 04114, Україна

<sup>2</sup>ННЦ „Інститут біології” Київського національного університету імені Тараса Шевченка  
вул. Володимирська, 64, Київ МСП, 01601, Україна

<sup>3</sup>Інститут молекулярної біології та генетики Національної академії наук України  
вул. ак. Заболотного, 150, Київ-143, 03680, Україна  
e-mail: [rotiferko@gmail.com](mailto:rotiferko@gmail.com)

У роботі продемонстровано можливість спонтанного (за стандартних умов культивування) утворення сфероїдів („мезенсфер”) у деяких зразках культур мезенхімальних клітин матриксу пуповини людини. Проаналізовано клітинний склад даних утворень і деякі їхні властивості. Показано, що сфероїди зберігають у своєму складі недиференційовані клітини та, ймовірно, є одним із функціональних станів культури клітин.

**Ключові слова:** мезенхімальні стовбурові клітини, сфероїди, культура клітин, матрикс пуповини

### ВСТУП

Мезенхімальні стовбурові/стромальні клітини (МСК) заслужили статус одного з найприйнятніших інструментів для регенеративної медицини [4, 14, 15]. Вони можуть використовуватися для ремоделювання тканин (шляхом диференціювання у клітини потрібного типу), як джерело цитокінів і факторів росту (з метою приваблення до місця ураження власних стовбурових клітин), як імуномодулятори, а також (після певних генетичних модифікацій) як носії певних субстанцій [4, 6, 14, 15]. Матрикс пуповини, у свою чергу, є одним із найперспективніших джерел МСК [5, 9, 17]. Пуповина (funiculus umbilicalis) – доступний матеріал, що не викликає дискусій з приводу етичності роботи. Уже давно популярним стало запасання кордової крові, проте сьогодні дедалі частіше з’являються й пропозиції кріоконсервації усєї пуповини або її матриксу, адже він містить унікальну популяцію клітин, що мають онтогенетично раннє походження (займають проміжну сходинку між плюри- та мультипотентними клітинами) і специфічний імунофенотип, що дає змогу застосовувати їх при алотрансплантаціях [5, 9, 17, 18].

Питання підбору оптимальних умов культивування МСК досі не є вирішеним повністю [1, 10]. У тканинах організму МСК містяться у багаторівневій тривимірній системі, що підлягає нервово-гуморально-імунній регуляції. Натомість, під час культивування у моношарі клітини позбуваються такої регуляції й адаптуються до штучних умов: субстрату, середовища тощо. Саме тому одним із сучасних напрямів є тривимірне культивування та створення біореакторів, які допомагають частково імітувати умови організму [1, 10, 12, 13, 16, 19]. Одним із запропонованих способів є культивування так званих „мезенсфер” – сфероїдів, що складаються з МСК [2, 3]. Для отримання „мезенсфер” з МСК із різних джерел (жирова тканина, кордова кров тощо) пропонують застосовувати спеціальні методичні підходи, зокрема неадгезивні (наприклад, тефлонові) покриття для культурального посуду, безсироваткові середовища, додатки до середовищ, особливу техніку висівання великої кількості клітин на невелику площу поверхні та інші [2, 3]. У подальшому такі клітинні утворення можуть застосовуватися для безпосереднього введення у місце ураження. У зв'язку з тим, що вони самі забезпечують себе позаклітинним матриксом, з'являється можливість відмовитись від штучних матеріалів для утримання введених клітин у певній ділянці (для цього на сьогодні застосовуються різні типи колагенів, альгінат, гідрогель тощо) [8, 11, 20].

Метою даної роботи є демонстрація спонтанного утворення „мезенсфер” за стандартних умов культивування МСК, отриманих із матриксу пуповини людини. Нашу увагу привернули сфероїди, які відповідають характеристикам описаних „мезенсфер”, що утворювались у культурах МСК з матриксу пуповини за стандартних умов культивування клітин на ранніх (0–2) пасажах. Ми припускаємо, що цей факт може слугувати одним із доказів на користь існування гетерогенності популяції клітин, що можуть бути отримані з матриксу пуповини людини.

## МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Пуповини були отримані від здорових породіль під час нормальних пологів. Жінки підписали інформаційний лист про згоду надати матеріал для наукових досліджень. Роботу з людським біоматеріалом виконували, дотримуючись положень Гельсінської декларації Всесвітньої медичної асоціації.

Клітини ізолювали за індивідуалізованою комбінованою методикою (авторами подана заявка на отримання патенту на корисну модель № u 2012 01939), використовуючи ферментативний і механічний способи обробки. Для отримання клітин використовували колагеназу (Sigma, Німеччина) та гіалуронідазу (Sigma, Німеччина) і набір стерилізованих хірургічних інструментів (пінцети, ножиці).

МСК культивувались у середовищі DMEM (PAA, Австрія) із низьким вмістом глюкози, 10% ембріональної телячої сироватки (PAA, Австрія), 2 мМ L-глутаміну та 10 нМ фактора росту фібробластів (FGF) (Інтерфарм Біотек, Україна). Заміна середовища відбувалася двічі на тиждень. Культивування проводилось у CO<sub>2</sub> інкубаторі (37°C, 5% CO<sub>2</sub>). Використовували культуральні флакони (PAA, Австрія) 75 см<sup>2</sup> та 25 см<sup>2</sup>. Для оцінки стану культур клітин використовували інвертований мікроскоп Leica DMIL (Leica Microsystems Німеччина), знімки отримували за допомогою фотоапарата Canon PowerShot 640A. Життєздатність клітин оцінювали за класичною методикою забарвлення трипановим синім.

Було проаналізовано як загальну будову конгломератів, так і їх клітинний склад за допомогою забарвлення цитологічними барвниками (гематоксиліном, еозином,

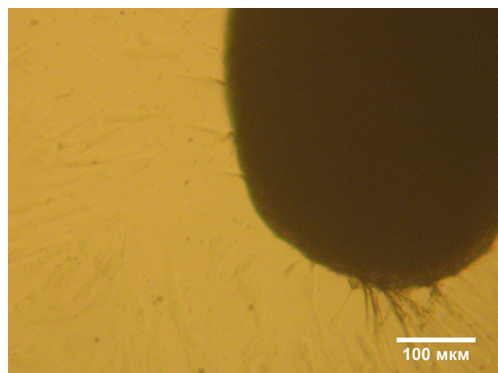
Суданом чорним, альцановим синім – PAA, Австрія) кріотомних зрізів і цілих сфероїдів, та забарвлення флуоресцентними барвниками з подальшою конфокальною мікроскопією. Для візуалізації білків цитоплазми використовували флуоресцентний барвник Тіазин червоний (Sigma, Німеччина), що належить до групи основних анілінових барвників. Жовтувато-оранжеву флуоресценцію спостерігали при застосуванні випромінювання з довжиною хвилі 514 нм. Робоча концентрація барвника – 0,001%. Для забарвлення ядерного матеріалу використовували барвник DAPI, що має високу афінність до А-Т нуклеотидних пар ДНК при збудженні 350 нм та емісії 470 нм. Для роботи використовували конфокальний мікроскоп AXIOSKOP – 2 ZEISS із лазерною програмою LSM 5 PASCAL (Zeiss, Jena, Німеччина) Інституту ботаніки НАН України. Гістологічне дослідження зрізів проводили після нарізання на кріотомі та забарвлення гематоксилін-еозином. Використовували світловий мікроскоп ЛОМО-2 (ЛОМО, Російська Федерація).

Склад хондрогенного середовища: DMEM (PAA, Австрія) без сироватки та з високим вмістом глюкози, з додаванням 100 нМ дексаметазону (KRKA, Словенія), 50 мкг/мл фосфату аскорбінової кислоти (Sigma, Німеччина), основного фактора росту фібробластів (FGF) (Інтерфарм Біотек, Україна), 100 мкг/мл пірувату натрію (PAA, Австрія), 1,25 мкг/мл бичачого сироваткового альбуміну, BSA (Sigma), та 1% суміші ITS (інсулін, трансферин і селен) (PAA, Австрія). Безпосередньо перед використанням до середовища додавали трансформуючий фактор росту (TGF- $\beta$ ) (Sigma, Німеччина) з розрахунку 10 нг/мл.

Експресію поверхневих маркерів вимірювали за допомогою методу проточної цитометрії (FACS) на сортері BD FACSAria cell sorter із застосуванням програмного забезпечення BD FACSDiva software. Для аналізу було обрано стандартні позитивні маркери МСК: CD105, CD90, CD73 (Beckton Dickinson). Аналіз проводили згідно з класичними протоколами, у відділі клітинних і тканинних технологій Інституту генетичної та регенеративної медицини НАМН України.

## РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ І ЇХНЕ ОБГОВОРЕННЯ

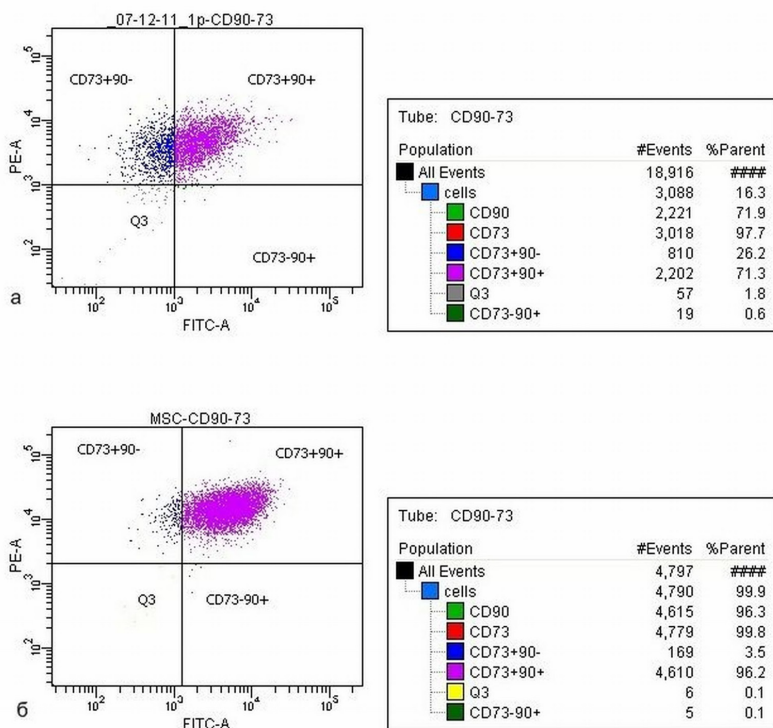
Протягом більш ніж 3-х років роботи з клітинами матриксу пуповини в різних аспектах, від процесу отримання клітин до їхньої поведінки у культурі, ми спостерігали виражену гетерогенність клітинного матеріалу. Зокрема, увагу привертало деякі зразки культур, отриманих у різний час із матриксу пуповини людини, в яких за стандартних умов культивування, на 0-му, 1-му та 2-му пасажах (при конфлюентності культури 30–70%) спостерігали спонтанне утворення сфероїдів, що за морфологічними характеристиками відповідали описаним у літературі „мезенсферам” [2]. Клітини у складі таких утворень були живі, недиференційовані, розміри сфероїдів варіювали від 0,25 мм до 1,2 мм у діаметрі. Клітини у складі сфероїдів здатні до проліферації. Про це свідчить можливість таких утворень збільшуватись у розмірах, а також давати початок адгезованій культурі клітин. Проте через наростання об'єму сфероїдів клітини, що містяться у найглибших шарах великих сфероїдів, можуть гинути від нестачі поживних речовин. Однак у проаналізованих нами зразках таке явище не спостерігалось. Імовірно, є певні межі оптимальних розмірів клітинних конгломератів. Сфероїди, які ми спостерігали, мали досить щільну консистенцію, у більшості випадків – сферичну форму, інколи – овальну або брунькоподібну (рис. 1).



**Рис. 1.** Утворення конгломерату у моношаровій культурі МСК (прижиттєва, незабарвлена культура, об'єктив  $\times 10$ )

**Fig. 1.** Spheroid formation in monolayer culture of MSC (vital, unstained culture, lens  $\times 10$ )

Як і автори попередніх досліджень, ми вважаємо, що утворюючи конгломерати, клітини імітують умови, які більш наближені до фізіологічного стану, аніж перебування у моношарі на пластиковому субстраті. Показано, що такі утворення не втрачають типових ознак МСК [7]: клітини, які входять до їх складу, здатні до клонотипного росту й індукованої хондрогенної диференціації. У складі сфероїдів зберігаються клітини (60–70% популяції), що експресують характерні позитивні маркери МСК: CD105, CD73, CD90. Клітини, що „виходять” зі сфероїдів при вміщенні у новий посуд зі свіжим середовищем, експресують ці маркери ще інтенсивніше (близько 90% популяції). Нижчі показники експресії поверхневих маркерів у сфероїдах, порівняно з прикріпленими клітинами, можна пояснити ймовірною втратою деяких клітин під час жорсткої дезагрегації конгломератів і властивістю FACS-сортера враховувати здвоєні клітини як мертві. Приклад експресії двох позитивних маркерів подано на рис. 2.



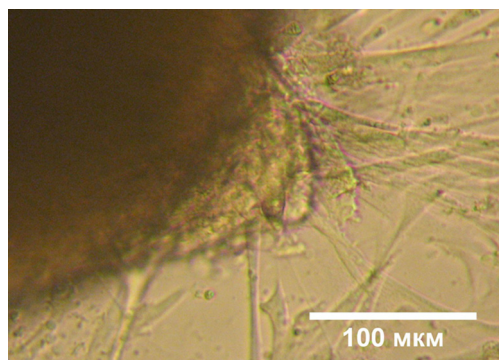
**Рис. 2.** Експресія CD90 та CD73 клітинами у сфероїдах (а) та у моношарі (б)

**Fig. 2.** CD90 and CD73 expression in spheroids (a) and in monolayer cell culture (b)

При переносі неадгезованих сфероїдів у новий культуральний посуд зі свіжим середовищем вони через 24–72 год здатні прикріпитися до поверхні та дати початок новому поколінню культури (рис. 3), таким чином підтримуючи її на рівні того пасажу, на якому клітинні конгломерати утворились. Наприклад, якщо на 2-му пасажі спонтанно утворився сфероїд, то при внесенні його у новий посуд зі середовищем, де він зможе прикріпитись і дати початок новій культурі, клітини, що прикріпились, будуть вважатися також 2-м пасажем, на відміну від тих, що були пересіяні стандартними методами. Ця властивість може бути використана для тривалого підтримання культури без шкідливих впливів, що є обов'язковим побічним ефектом пасажування. Зазвичай для відкріплення клітин застосовуються ферментативні або жорсткі механічні підходи, що пошкоджують поверхневий апарат клітин. У випадку МСК такий ефект може зумовлювати негативні наслідки, у тому числі – зниження здатності клітин до міграції до місця ураження в організмі (хоумінгу) [9, 16].

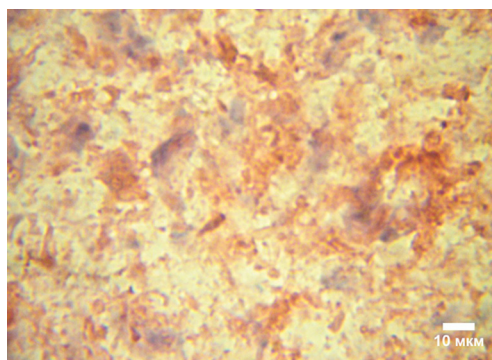
Привертає увагу і факт збереження життєздатності сфероїдів за відсутності зміни середовища протягом тривалішого періоду часу (14–21-й день), аніж це властиво клітинам у моношарі, більша частина яких гине при культивуванні у незмінному середовищі вже на 8–12-й день. Те, що клітини у складі сфероїдів є живими, було підтверджено відсутністю забарвлення трипановим синім.

Гістологічний аналіз зрізів показав наявність клітин типової для мезенхімальних тканин морфології (рис. 4). Було видно бузкові ядра та рожевий вміст цитоплазми і позаклітинний матрикс. Загальна гістологічна будова новоутворених конгломератів відображає будову мукозної тканини пуповини. Це може слугувати доказом потреби клітин до формування природного оточення.



**Рис. 3.** Вихід клітин із конгломерату при вміщенні у новий культуральний посуд (прижиттєва, незабарвлена культура, об'єктив  $\times 20$ )

**Fig. 3.** Cells' release from the conglomerate in the new culture flask (vital, unstained culture, lens  $\times 20$ )

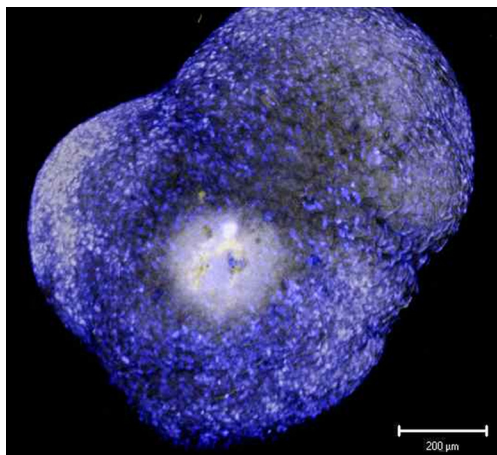


**Рис. 4.** Кріотомний поперечний переріз конгломерату (забарвлення гематоксиліном та еозинном, об'єктив  $\times 40$ )

**Fig. 4.** Cryotomic cross-sectional slice of the conglomerate (H&E staining, lens  $\times 40$ )

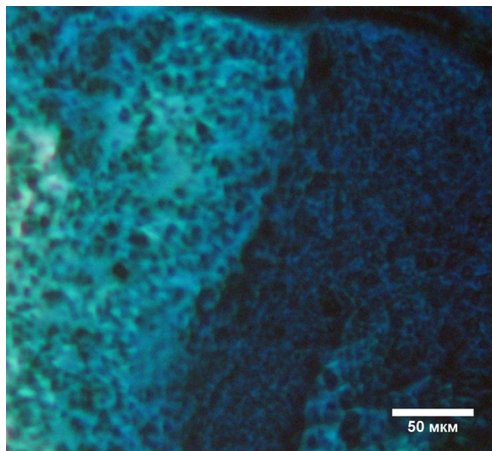
За допомогою конфокальної мікроскопії було показано, що клітини у сфероїдах розподілені досить рівномірно. Тривимірне зображення, утворене шляхом нашарування зображень, отриманих з використанням конфокального мікроскопа, показане на рис. 5. Яскраве (блакитне) забарвлення ядер свідчить про їхню високу функціональну активність. Основу об'ємного зображення сфероїда становить позаклітинний матрикс (жовтий), у якому розміщені клітини. У зв'язку з накладанням шарів зображень виникає ефект збільшення густоти клітин усередині сфероїда, однак це особливість такого типу зображень.





**Рис. 5.** Об'ємне зображення, отримане за допомогою конфокальної мікроскопії (забарвлення DAPI та тіазином)

**Fig. 5.** Three-dimensional Confocal image (DAPI and thiazine staining)



**Рис. 6.** Сфероїд, що культивувався у хондрогенному середовищі (забарвлення альціановим синім, об'єктив  $\times 20$ )

**Fig. 6.** Spheroid that was cultured in chondrogenic medium (Alcian Blue staining,  $\times 20$ )

Відсутність забарвлення альціановим синім і Суданом чорним доводить, що сфероїди не є етапом диференціювання клітин в адипо- чи хондроцити. Натомість альціановий синій інтенсивно забарвлював сфероїди, що протягом 3-х тижнів культивувались у хондрогенному середовищі. Це свідчить про збереження клітинами здатності до індукованого диференціювання (рис. 6).

## ВИСНОВКИ

Дана робота містить феноменологічний матеріал, що має на меті привернути увагу спеціалістів до описаного явища, адже можливість появи нетипових сферичних утворень при культивуванні МСК за стандартних умов є малодослідженою проблемою. Згідно з отриманими нами даними, такі утворення можуть бути одним із функціональних станів культури. Показано, що описані клітинні утворення зберігають характеристики МСК (експресію характерних маркерів, морфологічні ознаки, здатність до індукованого диференціювання). Проте подальшого детального дослідження потребують причини утворення сфероїдів, саме у певних зразках культур МСК, та їхні функціональні особливості. Ми припускаємо, що індивідуальні характеристики тканини пуповини, що є джерелом МСК, можуть впливати на схильність наявних там клітин до утворення сфероїдів.

Можливість спрогнозувати потенціал до спонтанного утворення «мезенсфер» могла б бути корисною при підборі донорських зразків пуповини для одержання культур МСК з метою подальшого введення піддослідним тваринам або пацієнтам.

## ПОДЯКА

Автори висловлюють подяку адміністрації та співробітникам пологового будинку № 5 м. Києва за надання зразків пуповини, а також лабораторії патоморфологічних досліджень ДУ «Інститут педіатрії, акушерства та гінекології НАМН України» за використання кріотому та допомогу у проведенні гістологічного аналізу.

1. *Augello A., Kurth T. B., De Bari C.* Mesenchymal stem cells: a perspective from *in vitro* cultures to *in vivo* migration and niche. **Eur. Cell Mater**, 2010; 1(20): 121–133.
2. *Baraniak P. R., McDevitt T. C.* Scaffold-free culture of mesenchymal stem cell spheroids in suspension preserves multilineage potential. **Cell Tissue Res**, 2012; 347(3): 701–11.
3. *Baraniak P. R., Cooke M. T., Saeed R.* et al. Stiffening of Human Mesenchymal Stem Cell Spheroid Microenvironments Induced by Incorporation of Gelatin Microparticles **J. of the Mechanical Behavior of Biomed. Mat**, 2012; 11: 63–71
4. *Bernardo M., Pagliara D., Locatelli F.* Mesenchymal stromal cell therapy: a revolution in Regenerative Medicine? **Bone Marrow Transplantation**, 2012; 47: 164–171.
5. *Bieback K., Brinkmann I.* Mesenchymal stromal cells from human perinatal tissues: From biology to cell therapy. **World J. Stem Cells**, 2010; 2(4): 81–92.
6. *Bourin P., Luc S., Valérie P.* et al. Culture and Use of Mesenchymal Stromal Cells in Phase I and II Clinical Trials. **Stem Cells International**, 2010; 9: 1–8.
7. *Dominici M., Le Blanc K., Mueller I.* et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. **Cytotherapy**, 2006; 8(4): 315–317.
8. *Jäger M., Urselmann F., Witte F.* Osteoblast differentiation onto different biomaterials with an endoprosthetic surface topography *in vitro*. **J. of Biomed. Materials Research, Part A.**, 2008; 86(1): 61–75.
9. *Nekant, U., Mohanty L., Venugopal P.* et al. Optimization and scale-up of Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells for clinical applications **Stem Cell Research**, 2010; 5(3): 244–254.
10. *Osipova E. Y., Shamanskaya T. V., Kurakina O. A.* et al. Biological Characteristics of Mesenchymal Stem Cells during *Ex Vivo* Expansion. **British Journ. of Medicine & Medical Research**, 2011; 1(3): 85–95.
11. *Park K. H., Kim H., Moon S., Na K.* Bone morphogenetic protein-2 (BMP-2) loaded nanoparticles mixed with human mesenchymal stem cell in fibrin hydrogel for bone tissue engineering. **J. of Biosc. and Bioeng**, 2009; 108(6): 530–537.
12. *Reilly G., Engler A.* Intrinsic extracellular matrix properties regulate stem cell differentiation. **Journ. of Biomechanics**, 2010; 43(1): 55–62.
13. *Sarkar D., Spencer J. A., Phillips J. A.* et al. Engineered cell homing. **Blood**, 2011; 118(25): 184–191.
14. *Sensebe L., Bourin P., Tarte K.* Good manufacturing practices production of mesenchymal stem/stromal cells. **Hum. Gene Ther**, 2011; 22(1): 19–26.
15. *Si Y.L., Zhao Y.L., Hao H.J.* et al. MSCs: Biological characteristics, clinical applications and their outstanding concerns. **Ageing Res. Rev**, 2011; 10(1): 93–103.
16. *Stephens J., Cooper J., Phelan F., Dunkers J.* Perfusion flow bioreactor for 3D in situ imaging: Investigating cell/biomaterials interactions. **Biotechnol. Bioeng**, 2007; 97: 952–961.
17. *Taghizadeh R.R., Cetrulo K.J., Cetrulo C.L.* Wharton's Jelly stem cells: Future clinical applications. **Placenta**, 2011; 32(S4): 311–315.
18. *Tong C. K., Vellasamy S., Tan B. C.* Generation of mesenchymal stem cell from human umbilical cord tissue using a combination enzymatic and mechanical disassociation method **Cell Biology International**, 2011; 35: 221–226.
19. *Toyoda M., Takahashi H., Umezawa A.* Ways for a mesenchymal stem cell to live on its own: maintaining an undifferentiated state *ex vivo*. **Int. J. Hematol**, 2007; 86(1): 1–4.
20. *Valarmathi M. T., Yost M. J., Goodwin R. L., Potts J. D.*, The influence of proepicardial cells on the osteogenic potential of marrow stromal cells in a three-dimensional tubular scaffold, **Biomaterials**, 2008; 29(14): 2203–2216.

## SPONTANEOUS FORMATION OF SPHEROIDS IN HUMAN UMBILICAL CORD MATRIX DERIVED CELLS CULTURE

**O. O. Maslova<sup>1,2</sup>, S. P. Shpilova<sup>3</sup>, N. S. Shuvalova<sup>1,3</sup>,  
O. G. Deryabina<sup>1</sup>, V. A. Kordium<sup>1,3</sup>**

<sup>1</sup>*Institute of Genetic and Regenerative Medicine, NAMS of Ukraine  
67, Vyshgorodska St., Kyiv 04114, Ukraine*

<sup>2</sup>*Taras Shevchenko National University of Kyiv, 64, Volodymyrska St., Kyiv 01601, Ukraine*

<sup>3</sup>*Institute of Molecular Biology and Genetics National Academy of Science of Ukraine  
150, Zabolotnyi St., Kyiv-143, 03680, Ukraine  
e-mail: rotiferko@gmail.com*

The possibility of formation of spontaneous spheroids („mesenspheres”) in some samples of human umbilical cord matrix mesenchymal cell cultures are shown. The cellular composition of these formations and some of their properties are analyzed. Presence of undifferentiated cells in the spheroids is shown. Apparently, spheroids are the kind of cell state in culture.

**Keywords:** mesenchymal stem cells, spheroids, cell culture, umbilical cord matrix.

## СПОНТАННОЕ ОБРАЗОВАНИЕ СФЕРОИДОВ В КУЛЬТУРАХ КЛЕТОК МАТРИКСА ПУПОЧНОГО КАНАТИКА ЧЕЛОВЕКА

**О. А. Маслова<sup>1,2</sup>, С. П. Шпилевая<sup>3</sup>, Н. С. Шувалова<sup>1,3</sup>,  
Е. Г. Дерябина<sup>1</sup>, В. А. Кордюм<sup>1,3</sup>**

<sup>1</sup>*ГУ «Институт генетической и регенеративной медицины Национальной академии  
медицинских наук Украины», ул. Вышгородская, 67, Киев 04114, Украина*

<sup>2</sup>*УНЦ «Институт биологии» Киевского национального университета им. Тараса Шевченка  
ул. Владимирская, 64, Киев МСП, 01601, Украина*

<sup>3</sup>*Институт молекулярной биологии и генетики Национальной академии наук Украины  
ул. ак. Заболотного, 150, Киев-143, 03680, Украина  
e-mail: rotiferko@gmail.com*

В работе продемонстрирована возможность спонтанного (в стандартных условиях) образования сфероидов („мезенсфер”) в некоторых образцах культур мезенхимальных клеток матрикса пупочного канатика человека. Проанализирован клеточный состав данных образований и некоторые их свойства. Показано, что сфероиды сохраняют в своём составе недифференцированные клетки и, вероятно, являются одним из функциональных состояний клеточной культуры.

**Ключевые слова:** мезенхимальные стволовые клетки, сфероиды, культура клеток, матрикс пуповины.

Одержано: 1.06.2012