

© Коллектив авторов, 2016
УДК 616-092.18, 4+576-53,54

Кошелева Н.В.^{1,3}, Сабурина И.Н.^{1,2}, Зурина И.М.¹, Горкун А.А.¹, Борзенко С.А.⁴,
Никишин Д.А.^{3,5}, Колокольцова Т.Д.^{1,2}, Устинова Е.Е.¹, Репин В.С.^{1,2,4}

Технология создания мультипотентных сфероидов из мезенхимных стромальных клеток лимба для репарации поврежденных тканей глаза

¹ — ФГБНУ «НИИ Общей патологии и патофизиологии», 1253158, Москва, Балтийская ул., д. 8

² — ГБОУ ДПО «Российская медицинская академия последипломного образования» Минздрава России, 123995, Москва, Баррикадная ул., д. 2/1, стр. 1

³ — Биологический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова, Россия, 119234, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12

⁴ — ФГБУ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России, 127486, Москва, Бескудниковский бульвар, д. 59-а

⁵ — ФГБУН «Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова» РАН, Россия, 119334, Москва, Вавилова ул., д. 26

На сегодняшний день показано, что стволовые и прогениторные клетки открывают новые возможности для восстановления поврежденных тканей глаза. Основным источником стволовых клеток для регенерации является сформированная в большей степени производными нервного гребня лимбальная зона глаза. Данное исследование посвящено разработке инновационной технологии создания 3D сфероидов из мультипотентных мезенхимных стромальных клеток лимба (ММСК-Л). Показано, что в 3D условиях культивирования ММСК-Л за счет компактизации и мезенхимо-эпителиального перехода самоорганизуются в клеточные репаративные модули. Сформированные сфероиды ММСК-Л сохраняют и поддерживают недифференцированную популяцию стволовых и прогениторных клеток лимба, что подтверждает экспрессия таких факторов плюрипотентности, как Oct4, Sox2 и Nanog. Синтезируемый клетками сфероидов внеклеточный матрикс позволяет поддерживать функциональный потенциал ММСК-Л, участвующих в регенерации как переднего, так, вероятно, и заднего отрезков глаза.

Ключевые слова: 3D культура, клеточные сфероиды; технология создания сфероидов; мультипотентные мезенхимные стромальные клетки лимба (ММСК-Л).

Для цитирования: Кошелева Н.В., Сабурина И.Н., Зурина И.М., Горкун А.А., Борзенко С.А., Никишин Д.А., Колокольцова Т.Д., Устинова Е.Е., Репин В.С. Технология создания мультипотентных сфероидов из мезенхимных стромальных клеток лимба для репарации поврежденных тканей глаза. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2016; 60(4): 160–167.

Для корреспонденции: Кошелева Настасья Владимировна, канд. биол. наук, вед. науч. сотр. лаб. клеточной биологии и патологии развития ФГБНУ НИИОПП; ст. науч. сотр. каф. эмбриологии биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова, e-mail: n_kosheleva@mail.ru

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Правительства РФ отделениям РАН (IV.12.1). Анализ экспрессии проведен при финансовой поддержке РФФИ (грант 14-50-00029).

Благодарность. Авторы благодарят Кремнёва С.В. за помощь в подготовке проб для проведения полимеразной цепной реакции в реальном времени.

Поступила 05.07.2016

Kosheleva N.V.^{1,3}, Saburina I.N.^{1,2}, Zurina I.M.¹, Gorkun A.A.¹, Borzenok S.A.⁴,
Nikishin D.A.^{3,5}, Kolokoltsova T.D.^{1,2}, Ustinova E.E.¹, Repin V.S.^{1,2,4}

The technology of obtaining multipotent spheroids from limbal mesenchymal stromal cells for reparation of injured eye tissues

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

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

³ — Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, 1, pp. 12, Leninskiye gory, Moscow, Russian Federation, 119234

⁴ — Fyodorov Eye Microsurgery Complex FSBI, 59a, Beskudnikovsky boulevard, Moscow, Russian Federation, 127486

⁵ — FSBSI «Koltzov Institute of Developmental Biology of Russian Academy of Sciences», 26, Vavilova st., Moscow, Russian Federation, 119334

It is known that stem and progenitor cells open new possibilities for restoring injured eye tissues. Limbal eye zone, formed mainly by derivatives of neural crest, is the main source of stem cells for regeneration. The current study considers development of innovative technology for obtaining 3D spheroids from L-MMSC. It was shown that under 3D conditions L-MMSC due

to compactization and mesenchymal-epithelial transition self-organize into cellular reparative modules. Formed L-MMSC spheroids retain and promote undifferentiated population of stem and progenitor limbal cells, as supported by expression of pluripotency markers — Oct4, Sox2, Nanog. Extracellular matrix synthesized by cells in spheroids allows retaining the functional potential of L-MMSC that are involved in regeneration of both anterior and, probably, posterior eye segment.

Keywords: 3D culture, cell spheroids, technology of obtaining spheroids, limbal multipotent mesenchymal stem cells (L-MMSC).

For citation: Kosheleva N.V., Saburina I.N., Zurina I.M., Gorkun A.A., Borzenok S.A., Nikishin D.A., Kolokoltsova T.D., Ustinova E.E., Repin V.S. The technology of obtaining multipotent spheroids from limbal mesenchymal stromal cells for reparation of injured eye tissues. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya Terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2016; 60 (4): 160–167. (in Russ.)

For correspondence: Nastasia V. Kosheleva, PhD of Biological Sciences, Leading Researcher work Federal State Budgetary Scientific Institution «Institute of General Pathology and Pathophysiology»; 8, Baltiyskaya st., Moscow, Russian Federation, 125315. E-mail: n_kosheleva@mail.ru

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Funding. This study was financially supported by the Government of Russian Federation to the State Academy of Sciences (IV.12.1). Molecular analysis of expression was financially supported by the Russian Science Foundation (project 14-50-00029)

Acknowledgments. The authors are grateful to Kremnyov S.V. for his valuable help with the preparation of samples for Real-time PCR study.

Information about authors:

Kosheleva N.V., <http://orcid.org/0000-0002-2665-4972>

Saburina I.N., <http://orcid.org/0000-0003-2014-2535>

Zurina I.M., <http://orcid.org/0000-0002-3275-0215>

Gorkun A.A., <http://orcid.org/0000-0001-5859-812X>

Nikishin D.A., <http://orcid.org/0000-0002-9238-9206>

Введение

На сегодняшний день во всех областях медицины, в том числе и в офтальмологии стволовые и прогениторные клетки представляют потенциальный интерес, как для фундаментальных исследований, так и для клинического применения в регенеративной медицине, открывая новые возможности восстановления поврежденных органов и тканей или регуляции их функциональной активности. Исследования последних лет показали, что зона лимба глаза является основным источником стволовых клеток для регенерации роговицы в норме и патологии, и потенциальным источником для восстановления тканей заднего отрезка глаза.

Зона лимба глаза находится на границе конъюнктивы и роговицы и является уникальной нишей региональных эпителиальных и мезенхимных стволовых клеток глаза, окруженных внеклеточным матриксом, стромальными компонентами, кровеносными сосудами и меланоцитами. Фибробластоподобные мезенхимные клетки лимба, являющиеся производными нервного гребня — это основной регенерационный резерв глаза, именно они восстанавливают эпителиальные популяции роговицы и лимба после повреждающих воздействий [1, 2].

Первым зону лимба как железу, вырабатывающую жидкость для смачивания роговицы, описал Манц (Manz) в середине XIX века в опубликованной в 1859 году работе «Железы на границе роговицы». В 1971 г. Давангер (Davanger) и Эвенсен

(Evensen) выявили, что лимб служит источником обновления клеток роговицы. А в 1978 году Шофилд (Schofield) предположил, что микроокружение палисад Фогта поддерживает нишу стволовых клеток лимба, регулируя их функциональный, пролиферативный и дифференцировочный потенциал. В настоящее время ведутся поиски других источников стволовых клеток роговицы, но общепризнано, что поддержание гомеостаза и обновление эпителия роговицы происходит именно за счет стволовых клеток лимба через несколько транзиторных популяций [3].

Популяция клеток зоны лимба глаза — кольца толщиной 1,5–2 мкм, разграничивающего прозрачную роговицу и непрозрачную склеру, поддерживает нормальную структуру и функции роговицы [4]. Многочисленные врожденные и приобретенные заболевания, травмы, могут повредить лимбальные стволовые клетки и их нишу, что морфологически проявляется в патологическом разрастании конъюнктивы по роговице, поражении эпителия роговицы, развитии хронического воспаления и неоваскуляризации роговицы, что приводит к ее помутнению и потере зрения [5]. В таких ситуациях трансплантация роговицы не эффективна, желателно обеспечить восстановление самой лимбальной зоны.

Часто для восстановления резерва стволовых клеток лимбальной зоны используют HLA-совместимую трансплантацию фрагментов лимба от живого донора или из постмортального материала [5]. Другим подходом, экономичным донорский материал, позволяющим

стандартизовать образец и контролировать контаминацию, является трансплантация культуры клеток лимба в суспензии или на носителе. Аутологичный материал можно применять при односторонних нарушениях в отсутствии врожденных или приобретенных системных поражений. В настоящее время идет разработка методов терапии с использованием аутологичных клеток букального эпителия, пульпы зуба, ММСК из различных источников. Применение более доступного аллогенного материала является перспективным и успешно развивается, но возможные иммунологические реакции реципиента требуют обязательного проведения курсов иммуносупрессорной терапии [6, 7].

В Европе аутологичные ММСК-Л с 2015 г. разрешены для клинического применения при лечении ожогов глаз. Продукт на основе культивированных аутологичных ММСК-Л *Holoclar* получил разрешение для клинического применения Европейского агентства лекарственных средств и Европейской комиссии. ММСК-Л успешно применяют в Канаде и Новой Зеландии при лечении острой реакции «трансплантат против хозяина» у детей [7].

В настоящее время активно разрабатываются и создаются новые технологии для поддержания и стимуляции регенерации пула стволовых клеток, локализованных преимущественно именно в лимбальной зоне глаза [3].

Цель исследования — представить технологию создания сфероидов из ММСК-Л направленную на разработку уникальных репаративных клеточных модулей и микротканей для лечения различных патологий как переднего, так и заднего отрезков глаза.

Методика

2D и 3D культуры ММСК-Л. Первичную культуру ММСК-Л выделяли методом эксплантационного культивирования из фрагмента ткани зоны лимба постмортального глаза человека [8, 9]. Выделенные клетки до 4-го пассажа культивировали в стандартных 2D 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). ММСК-Л 4-го пассажа использовали для получения в агарозных планшетах (MicrotissuesTM, США) 3D культуры — клеточных сфероидов, посевная концентрация 250 тыс. кл./мл. Формирование сфероидов изучали методом прижизненной цейтраферной фазово-контрастной микроскопии с использованием прибора Cell-IQ (CM Technologies, Финляндия).

Имунофенотипирование клеток 2D культуры 4-го пассажа и 14-суточных сфероидов проводили по следующему профилю поверхностных маркеров: CD29, CD90, CD105, CD44, CD49e, HLA-ABC, CD45, CD34, CD14, CD11b, CD19. Пробы инкубировали в темноте (15 мин, 25°C) с антителами (10 мкл антител на 1 млн клеток), конъюгированными с флуоресцентными красителями (FITC — fluorescein isothiocyanate, PE — phycoerythrin, PC5 Phycocyanin-Cyanin 5.1). Анализ проводили на проточном цитофлуориметре Cytomics FC-500 (Beckman Coulter, Inc, США).

Для изучения структуры сфероидов были выбраны методы *просвечивающей и растровой электронной микроскопии*. Материал фиксировали в глutarовом альдегиде (1,5%, 1—2 ч), дофиксировали OsO₄ (1%, 1—2 ч), обезвоживали в спиртах восходящей концентрации, ацетоне и заключали в смесь эпоксидных смол Araldite M и Araldite Hardener (Sigma, США), с добавлением катализатора DMP30 и пластификатора дибутилфталата (+60°C, 3—5 сут.). Ультратонкие срезы контрастировали по стандартной методике [10] и изучали с использованием микроскопа JEM-1011. Для растровой электронной микроскопии сфероиды, после фиксации и обезвоживания высушивали в критической точке, напыляли в вакууме золотом, полученную реплику сканировали с использованием микроскопа CamScan.

Эта часть работы выполнена на оборудовании лаборатории электронной микроскопии ЦКП МГУ им. М.В. Ломоносова при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ.

Для *иммуноцитохимического окрашивания* сфероиды фиксировали в 4% параформальдегиде (20 мин, +4°C), инкубировали с первичными антителами к E- и N-кадгеринам, ламинину и фибронектину (1:100; Thermo Scientific, США), затем со вторичными антителами, конъюгированными с флуорохромами FITC или DyLight594 (0,1 мк/мл; Thermo Scientific, США), анализировали с использованием лазерного сканирующего конфокального микроскопа FluoView FV10i (Olympus, Япония).

Для изучения изменения в сфероидах уровня экспрессии генов плюрипотентности (Oct4, Nanog, Sox2) и регулирующего эпителио-мезенхимный переход (ЭМП) транскрипционного фактора Zeb1 использовали метод *полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени*. Тотальную РНК выделяли, используя TRIReagent (Sigma, США) и ДНКазу I типа (Fermentas, Германия), осаждали в 4M LiCl, её концентрацию измеряли на спектрофотометре Nanod-

гор 8000 (Thermo Scientific, США). С использованием обратной транскриптазы M-MLV (Евроген, Россия) и рандомных гексануклеотидов (Силекс, Россия) проводили синтез кДНК. Анализ проводили на автоматическом амплификаторе 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, США) с использованием смеси qPCRmix-HSSYBR+ROX (Евроген, Россия). Расчет относительной экспрессии гена выполняли методом $\Delta\Delta Ct$ с учетом эффективности реакции, определенной методом построения стандартных кривых [11].

Результаты и обсуждение

Выселение ММСК-Л из эксплантатов ткани лимба постмортального материала происходило через 10—14 сут. культивирования. Выселившиеся клетки имели характерную веретеновидную форму, формировали монослой за 3—5 сут. и сохраняли высокий пролиферативный потенциал на протяжении всего периода 2D культивирования. На 4-м пассаже ММСК-Л экспрессировали характерные для ММСК маркеры (CD105, CD90 и CD29), практически не экспрессировали маркеры гемопоэтического и лимфоцитарного ряда CD45, CD34, CD14, CD11b, CD19. ММСК-Л экспрессировали рецепторы к внеклеточному матриксу CD44 и CD49e, обеспечивающие клеточную адгезию. Выявлялась экспрессия поверхностных пептидов молекул главного комплекса гистосовместимости I класса — HLA-ABC, характерных для всех соматических клеток. Сведения об иммунофенотипическом профиле культуры приведены в таблице. Полученная и охарактеризованная культура

ММСК-Л соответствовала результатам предыдущих исследований мезенхимной популяции лимба глаза человека [9, 12, 13] и имела свойства, характерные для ММСК из костного мозга [2].

В эмбриогенезе ММСК-Л берут начало от клеток нервного гребня, хорошо дифференцируются в производные эктодермы, обладают выраженными иммуносупрессивным и нейропротекторным действиями [14, 15]. Дефицит популяции стволовых клеток глаза и прежде всего его лимбальной зоны вызывает многочисленные нарушения зрительного аппарата и приводит к органическим нарушениям структуры анализатора и необратимой потере зрения. Для восполнения дефицита стволовых клеток лимба глаза применяют консервативные и хирургические, основанные на трансплантации аутологичных или аллогенных эксплантатов лимба или культивированных лимбальных клеток, методы лечения [16]. Выделение аутологичных эксплантатов травматично, такой материал плохо поддается стандартизации. Клетки в монослойной культуре лишены трехмерного микроокружения (ниши). Предлагаемая нами новая технология создания уникального потенциального материала для терапии дефицита стволовых клеток лимба основана на 3D культивировании аутологичных или аллогенных ММСК-Л. В 3D условиях за счет адгезионных взаимодействий между клетками получают самоорганизующиеся стандартные легко масштабируемые трехмерные структуры — клеточные сфероиды [17].

Технология культивирования в агарозных планшетах позволила масштабировать процесс получения стандартных сфероидов, каждый сфероид формировался в своей лунке из заданного количества клеток.

Таблица

Иммунофенотипический анализ экспрессии поверхностных маркеров ММСК-Л на 4-м пассаже 2D и 3D культуры. Сфероиды проанализированы на 14-е сут. 3D культивирования (среднее значение \pm стандартное отклонение)

Анализируемые маркеры	2D культура ММСК-Л (%)	3D культура ММСК-Л, 14 сут. (%)
CD105 (эндоглин, компонент рецептора к TGFbeta)	88,2 \pm 8,6	56 \pm 9,1
CD90 (Thy-1, гликопротеин суперсемейства иммуноглобулинов, обеспечивает взаимодействия клеток между собой и с внеклеточным матриксом)	99,5 \pm 0,3	92,3 \pm 6,3
CD29 (рецептор фибронектина, субъединица $\beta 1$ -интегрина)	79 \pm 21	65,2 \pm 10
CD44 (рецептор для гиалуроновой кислоты)	100	100
CD49e (интегриновый рецептор для фибронектина и фибриногена)	99,5 \pm 0,6	100
HLA-ABC (молекулы главного комплекса гистосовместимости I класса)	100	98,2 \pm 0,5
CD45 (LCA, общий антиген лейкоцитов)	10,1 \pm 2,7	15 \pm 2,1
CD34 (поверхностный антиген предшественников гемопоэза)	10 \pm 6,5	1,3 \pm 0,3
CD14 (активирующий макрофаги рецептор липополисахаридов и эндотоксинов)	4,9 \pm 1,4	4,1 \pm 0,7
CD11b (интегрин α -M, участвующий во взаимодействии лимфоцитов)	9 \pm 2,8	2,5 \pm 0,4
CD19 (B-лимфоцитарный антиген, трансмембранный гликопротеин, способствует проведению сигнала)	6,4 \pm 1,8	54,8 \pm 8,7

Процесс компактизации сфероидов начинался уже в первые часы 3D культивирования и продолжался до 7-х сут. (рис. 1). На 3-и сут. размер сфероидов приближался к диаметру сформированного компактного 7-дневного сфероидов, и составлял 150 мкм. Сфероиды поддерживали в 3D условиях в течение 14 сут., после 7-х сут. их диаметр и морфология практически не изменялись.

Клетки 14-суточных сфероидов сохраняли высокий уровень экспрессии характерных для ММСК маркеров, практически не экспрессировали маркеры гемопоэтического и лимфоцитарного ряда CD34, CD14, CD11b и CD45. В отличие от 2D культуры, в сфероидах почти на 50% возрастал уровень экспрессии В-лимфоцитарного антигена CD19 (таблица). Согласно данным литературы, повышение уровня экспрессии CD19 в культурах ММСК из различных источников связано с межклеточной сигнализацией в популяции ММСК [18].

Проведенный иммуноцитохимический анализ показал накопление компонентов внеклеточного матрикса (фибронектина и ламинина) во внутренней зоне сфероидов к 7-м сут. и, особенно к 14-м сут. Накопление компонентов внеклеточного матрикса в сфероидах клеток лимба было отмечено и в совместной работе индийских и американских ученых [12]. Можно предположить, что накопление внеклеточного матрикса и его распределение именно во внутренней зоне сфероидов является ключевым показателем реконструкции сложной ниши, поддерживающей структурно-функциональный потенциал ММСК-Л. Возмож-

но, высокий уровень экспрессии молекул адгезии и взаимодействия с внеклеточным матриксом в сочетании с описанным повышением уровня синтеза сигнальной молекулы CD19 обеспечивает сфероидам эффективную организацию уникальной трехмерной структуры.

Характерный для эпителиального фенотипа клеток маркер межклеточных контактов E-кадгерин накапливался в поверхностных клетках сфероидов и, начиная с 7-х сут. его выявляли в зонах межклеточных контактов. Экспрессию характерного для мезенхимных клеток N-кадгерина в первые сутки 3D культивирования наблюдали в ядрах, по мере формирования и компактизации сфероидов уровень экспрессии падал, а локализация перемещалась в цитоплазму.

Компоненты ниши стволовых клеток лимба, сами стволовые клетки и их производные могут гармонично сосуществовать и функционировать только в сложной сбалансированной системе. Предлагаемая технология получения сфероидов позволяет легко и эффективно реконструировать 3D межклеточные взаимодействия, поддерживающие функциональный потенциал уникальных клеток лимба.

Ранее нами показано, что сфероиды из различных клеточных популяций состоят из поверхностной и внутренней зон, отличающихся морфологией и иммунофенотипом клеток [19, 20]. Анализ строения поверхностной зоны сфероидов ММСК-Л методами электронной микроскопии подтвердил и дополнил наблюдения, полученные методом прижизненной цейтраферной микроскопии. Клетки 4–5 наружных

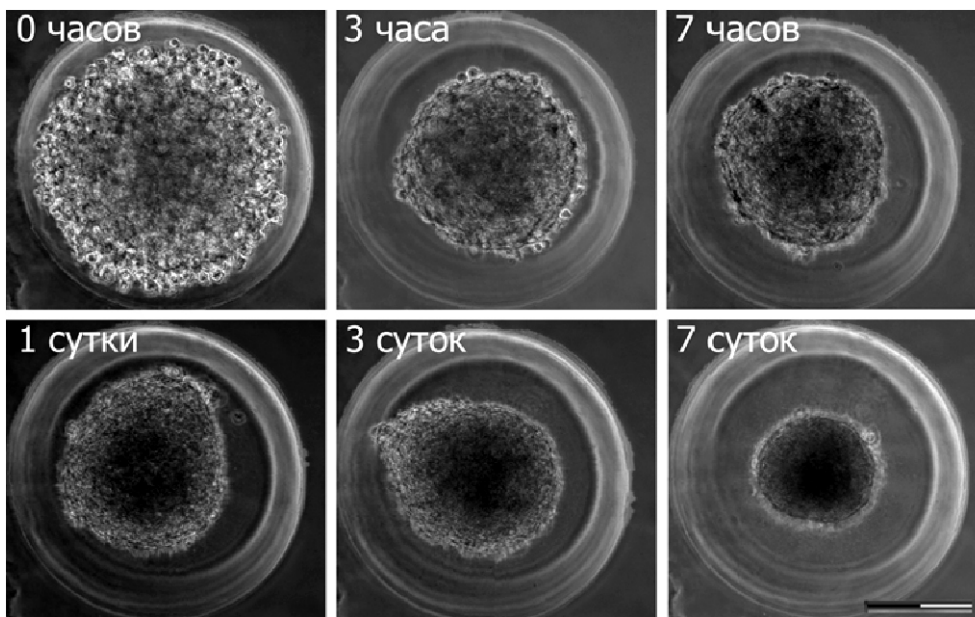


Рис. 1. Динамика формирования сфероидов из мультипотентных мезенхимных стромальных клеток лимба (ММСК-Л) в 3D культуре. Прижизненная цейтраферная световая микроскопия с фазовым контрастом. Измерительный отрезок 100 мкм.

слоев сфероидов уплощались, располагались черепицеобразно, обеспечивая постепенное уплотнение поверхностной зоны и компактизацию в 3D культуре (рис. 2А-Г). Во внутренней зоне клетки располагались рыхло, между ними присутствовали многочисленные компоненты внеклеточного матрикса (рис. 2В, Д).

Интересные результаты были получены при количественном исследовании, проведенном методом ПЦР в реальном времени, был проанализирован относительный уровень экспрессии (RQ) транскрипционных факторов *Ost4*, *Sox2*, *Nanog* и *Zeb1*. В сфероидах на 7-е сут. была отмечена тенденция увеличения экспрессии *Sox2* и *Nanog* при значимом понижении уровня экспрессии *Zeb1* относительно 2D культуры (рис. 3).

Экспрессия транскрипционных факторов *Ost4* и *Nanog* является необходимым условием для поддержания плюрипотентности клеток внутриклеточной массы бластоцисты. *Ost4* блокирует дифференцировку клеток в трофэктодермальном направлении, позже *Nanog* дополнительно блокирует превращение клеток внутренней клеточной массы в гипобласт (примитивную энтодерму) и стимулирует самообновление эпибласта. При гастрюляции экспрессия этих транскрипционных факторов постепенно снижается и исчезает. Транскрипционный фактор *Sox2* в клетках внутриклеточной массы бластоцисты формирует комплекс с *Ost4* и контролирует соотношение клеток эпибласта и гипобласта [21, 22]. Высокий уровень экспрессии *Sox2* в дальнейшем характерен для дифференцирующихся производных эктодермы [23]. *Zeb1* — один из ключевых регуляторов эпителио-мезенхимного потенциала (ЭМП),

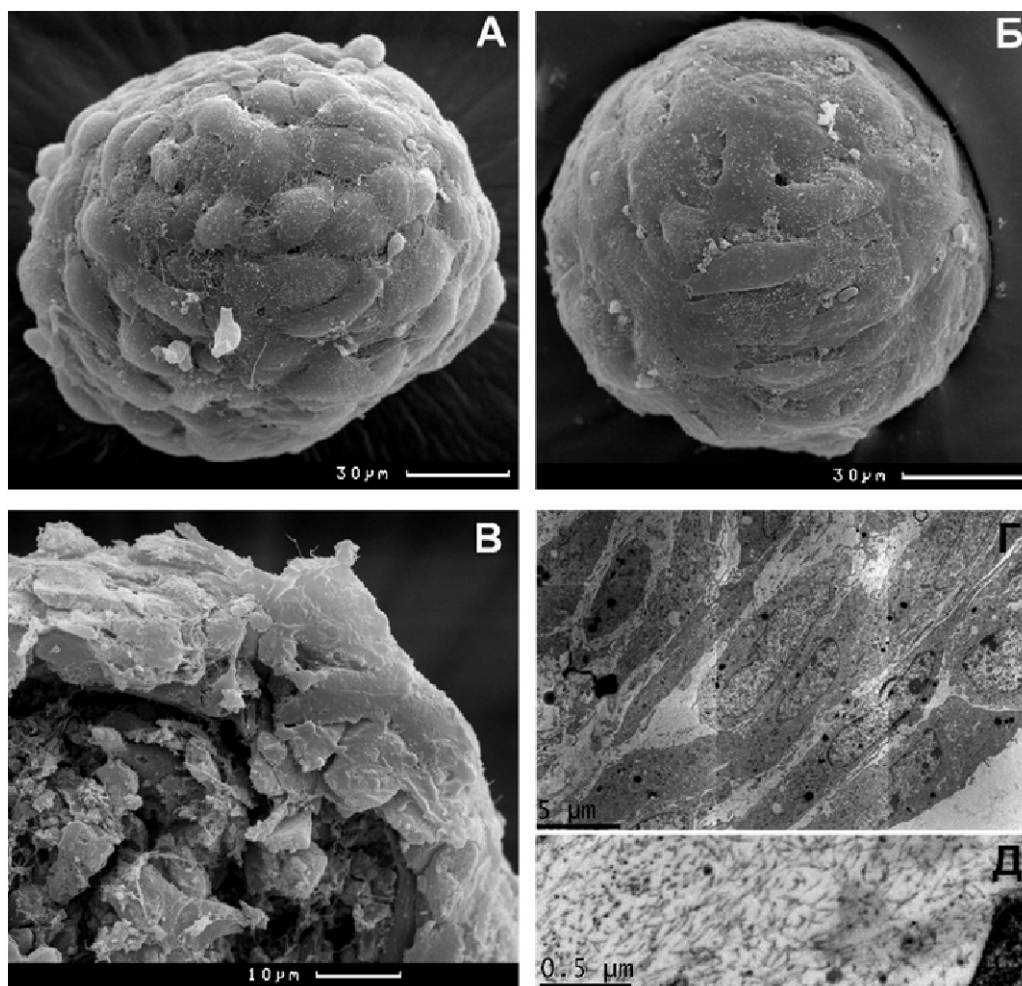


Рис. 2. Строение 7 сут. (А, В) и 14 сут. (Б, Г, Д) сфероидов из ММСК-Л. А, Б — общий вид поверхности сфероидов. В — скол сфероида, видны слои уплощенных клеток поверхностной зоны и округлые клетки внутренней зоны, разделенные волокнами внеклеточного матрикса. Г — 4–5 слоев уплощенных клеток поверхностной зоны с высоким ядерно-плазменным отношением, внутренняя зона расположена слева. Д — волокна внеклеточного матрикса во внутренней зоне сфероида. А–В — растровая электронная микроскопия; Г–Д — трансмиссионная электронная микроскопия.

RQ, относит единицы

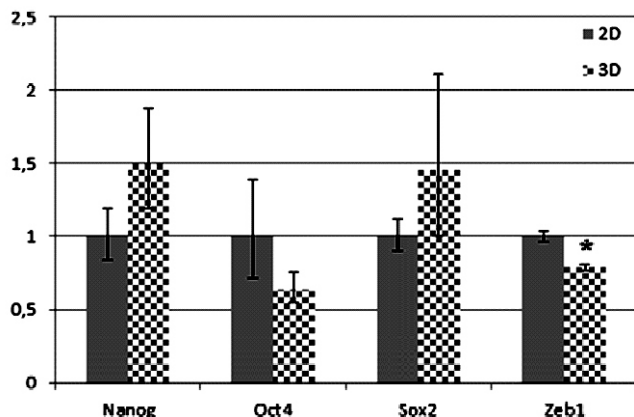


Рис. 3. Экспрессия генов Nanog, Oct4, Sox2 и Zeb1 в 2D и 3D культурах ММСК-Л. Сфероиды после 7 сут. 3D культивирования. Приведены средние значения ± стандартное отклонение. Звездочкой обозначено статистически значимое отличие значения в 3D культуре относительно 2D культуры (p<0,05).

Метод ПЦР в реальном времени, RQ – относительные единицы, данные нормализовали по репортерному гену ODC и пробам 2D культуры.

он блокирует экспрессию белка адгезивных контактов эпителиальных клеток E-кадгерина [24, 25]. В свою очередь, повышение экспрессии E-кадгерина и мезенхимо-эпителиальный переход (МЭП) являются необходимым условием для получения индуцированных плюрипотентных клеток *in vitro* и тесно связаны с появлением эндогенной экспрессии Oct4 и Sox2 при репрограммировании клеток [26].

Полученные данные по экспрессии кадгеринов и снижению уровня экспрессии Zeb1 при формировании сфероидов ММСК-Л свидетельствуют о МЭП, сопровождающем сфероидообразование. Выявленная тенденция к повышению уровня экспрессии Nanog и Sox2 в сфероиде ММСК-Л указывает на репрограммирование клеток при образовании сфероидов. По данным проведенных ранее исследований в сфероиде мезенхимный фенотип сохраняется в основном у клеток внутренней зоны, поверхностная зона, как правило, сформирована уплощенными клетками эпителиального фенотипа с характерным комплексом межклеточных контактов [9, 20, 27—29].

Заключение

Проведенные исследования показали, что клеточные сфероиды из суспензионной культуры ММСК-Л имеют преимущества перед уже разрешенной к клиническому применению монослойной 2D клеточной культурой лимба. Сформированные сфероиды ММСК-Л сохраняют и поддерживают недифференцированную популяцию функциональных стволовых и прогениторных клеток лимба,

что подтверждает экспрессия таких факторов плюрипотентности, как Oct4, Sox2 и Nanog. Уникальное сочетание эпителио-мезенхимного потенциала и особенности анатомического расположения на границе прозрачной роговицы и непрозрачной склеры позволяют ММСК-Л участвовать в регенерации как переднего, так, вероятно, и заднего отрезков глаза. Предлагаемая нами технология получения сфероидов позволяет легко и эффективно реконструировать функциональные 3D межклеточные взаимодействия, поддерживающие функциональный потенциал уникальных клеток лимба.

References

1. 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; 138: 70-9.
2. Nakatsu M.N., Gonzalez S., Mei H., Deng S.X. Human Limbal Mesenchymal Cells Support the Growth of Human Corneal Epithelial Stem/Progenitor Cells Limbal Mesenchymal Cells for Stem Cell Expansion. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2014; 55(10): 6953-9.
3. Khan-Farooqi H., Chodosh J. *Autologous Limbal Stem Cell Transplantation: The Progression of Diagnosis and Treatment. Seminars in ophthalmology*: Taylor & Francis; 2016: 91-8.
4. Singh V., Shukla S., Ramachandran C., Mishra D.K., Katikireddy K.R., Lal I., et al. Chapter Two-Science and Art of Cell-Based Ocular Surface Regeneration. *International Review of Cell and Molecular Biology*. 2015; 319: 45-106.
5. Queiroz A.G., Barbosa M.M.O., Santos M.S., Barreiro T.P., Gomes J.A.P. Assessment of surgical outcomes of limbal transplantation using simple limbal epithelial transplantation technique in patients with total unilateral limbal deficiency. *Arquivos brasileiros de oftalmologia*. 2016; 79(2): 116-8.
6. Atallah M.R., Palioura S., Perez V.L., Amescua G. Limbal stem cell transplantation: current perspectives. *Clinical ophthalmology (Auckland, NZ)* 2016; 10: 593.
7. Trounson A., McDonald C. Stem cell therapies in clinical trials: progress and challenges. *Cell Stem Cell*. 2015; 17(1): 11-22.
8. Borzenok S., Saburina I., Repin V., Kosheleva N., Gorkun A., Komakh Y., et al. Methodological and technological problems of artificial cornea engineering based on 3D cellular cultivation. *Oftal'mokhirurgiya*. 2012; (4): 12.
9. Kosheleva N.V., Zurina I.M., Saburina I.N., Gorkun A.A., Kolokoltsova T.D., Borzenok S.A., et al. The impact of fetal bovine serum on formation of spheroids from eye stromal limbal cells. *Patogenez*. 2015; 13(2): 4-11. (in Russian)
10. Reynolds E.S. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *The Journal of cell biology*. 1963; 17(1): 208-12.
11. Bookout A.L., Cummins C.L., Mangelsdorf D.J., Pesola J.M., Kramer M.F. High-throughput real-time quantitative reverse transcription PCR. *Current protocols in molecular biology*. 2006; 15. 8. 1-8. 28. DOI: 10.1002/0471142727.mb1508s73
12. 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; sctm. 2014-0120.
13. Xie H-T., Chen S-Y., Li G-G., Tseng S.C. Isolation and expansion of human limbal stromal niche cells. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2012; 53(1): 279-86.

14. Katikireddy K.R., Dana R., Jurkunas U.V. Differentiation potential of limbal fibroblasts and bone marrow mesenchymal stem cells to corneal epithelial cells. *Stem Cells*. 2014; 32(3): 717-29.
15. Liang C-M., Weng S-J., Tsai T-H., Li I-H., Lu P-H., Ma K-H., et al. Neurotrophic and neuroprotective potential of human limbus-derived mesenchymal stromal cells. *Cytotherapy*. 2014; 16(10): 1371-83.
16. Haagdoorens M., Van Acker S.I., Van Gerwen V., Ni Dhubghaill S., Koppen C., Tassignon M-J., et al. Limbal Stem Cell Deficiency: Current Treatment Options and Emerging Therapies. *Stem Cells International*. 2016; 2016: 22.
17. Saburina I.N., Repin V.S. 3D culturing: from individual cells to blastemic tissue (Revisited the phenomenon of epithelial-mesenchymal plasticity). *Geny i Kletki*. 2010; 5(2). (in Russian)
18. Maleki M., Ghanbarvand F., Reza Behvarz M., Ejtemaei M., Ghadirkhomi E. Comparison of Mesenchymal Stem Cell Markers in Multiple Human Adult Stem Cells. *International Journal of Stem Cells*. 2014; 7(2): 118-26.
19. Kosheleva N.V., Ilina I.V., Zurina I.M., Roskova A.E., Gorkun A.A., Ovchinnikov A.V., et al. Laser-based technique for controlled damage of mesenchymal cell spheroids: a first step in studying reparation in vitro. *Biology Open*. 2016. DOI: 10.1242/bio.017145
20. 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. *Bull Exp Biol Med*. 2014; 158(1): 137-44.
21. Carlson B.M. *Human embryology and developmental biology*. Elsevier Health Sciences; 2013.
22. Krawchuk D., Honma-Yamanaka N., Anani S., Yamanaka Y. FGF4 is a limiting factor controlling the proportions of primitive endoderm and epiblast in the ICM of the mouse blastocyst. *Developmental biology*. 2013; 384(1): 65-71.
23. Warmflash A., Sorre B., Etoc F., Siggia E.D., Brivanlou A.H. A method to recapitulate early embryonic spatial patterning in human embryonic stem cells. *Nature methods*. 2014; 11(8): 847-54.
24. Nishimoto M., Fukushima A., Okuda A., Muramatsu M. The gene for the embryonic stem cell coactivator UTF1 carries a regulatory element which selectively interacts with a complex composed of Oct-3/4 and Sox-2. *Molecular and cellular biology*. 1999; 19: 5453-65.
25. Lamouille S., Xu J., Derynck R. Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2014; 15(3): 178.
26. Redmer T., Diecke S., Grigoryan T., Quiroga-Negreira A., Birchmeier W., Besser D. E-cadherin is crucial for embryonic stem cell pluripotency and can replace OCT4 during somatic cell reprogramming. *EMBO reports*. 2011; 12(7): 720-6.
27. Saburina I., Gorkun A., Kosheleva N., Semenova M., Pulin A., Repin V. Collation of the Conduct of Stromal Cells of Umbilical Funiculus and Multipotential of Stromal Cells of the Adult Marrow in 2-D and 3-D-Culture: Modeling of Stromal Regenerations. *Vestnik novykh meditsinskikh tekhnologiy*. 2009; 16(4): 9-11. (in Russian)
28. Kubatiev A., Zurina I., Kosheleva N., Gorkun A., Saburina I., Repin V. From 2D Cell Phenotypes to 3D Live High-content Imaging: New Ways to Windows. *Journal of Cytology & Histology*. 2015; 6(6): 378.
29. Gorkun A., Saburina I., Kosheleva N., Zurina I., Pulin A., Shagidulin M. et al. Endothelial progenitor cells in umbilical cord-derived mesenchymal spheroids and their participation in the process of angiogenesis and vasculogenesis in acute liver failure. *Patologicheskaya fiziologiya i eksperimental'naya terapiya*. 2012; (4): 50-3. (in Russian)

Сведения об авторах:

Сабурина Ирина Николаевна, доктор биол. наук, проф., зав. лаб. клеточной биологии и патологии развития ФГБНУ НИИОПП; профессор каф. общей патологии и патофизиологии ГБОУ ДПО РМАПО Минздрава России

Зурина Ирина Михайловна, мл. науч. сотр. лаб. клеточной биологии и патологии развития ФГБНУ НИИ ОПП

Горкун Анастасия Алексеевна, канд. биол. наук, вед. науч. сотр. лаб. клеточной биологии и патологии развития ФГБНУ НИИОПП

Борзенко Сергей Анатольевич, доктор мед. наук, проф., акад. РАЕН, руководитель центра фундаментальных и прикладных медико-биологических проблем ФГБУ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова»

Никишин Денис Александрович, канд. биол. наук, науч. сотр. группы эмбриофизиологии ФГБУН «Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова» РАН; вед. инженер каф. эмбриологии биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова

Колокольцова Тамара Дмитриевна, доктор биол. наук, вед. науч. сотр. лаб. клеточной биологии и патологии развития ФГБНУ НИИОПП; проф. каф. общей патологии и патофизиологии ГБОУ ДПО РМАПО Минздрава России

Устинова Екатерина Евгеньевна, мл. науч. сотр. лаб. клеточной биологии и патологии развития; ФГБНУ НИИОПП

Репин Вадим Сергеевич, доктор мед. наук, проф., член-корр. РАН, гл. науч. сотр. лаб. клеточной биологии и патологии развития; ФГБНУ НИИОПП, проф. каф. общей патологии и патофизиологии ГБОУ ДПО РМАПО Минздрава России; гл. науч. сотр. лаборатории трансплантологии и клеточной биологии Центра фундаментальных и прикладных медико-биологических проблем ФГБУ МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России