

УДК 611.664.085.2:611.013.395

А.В. Злацкая^{1,2*}, А.Е. Родниченко^{1,2}, О.С. Губарь^{2,3}, Д.А. Зубов^{1,2},
Л.С. Литвинова⁴, Н.М. Тодосенко⁴, С.Н. Новикова¹, Р.Г. Васильев^{1,2}

Формирование 3D-сфероидов мультипотентными мезенхимальными стромальными клетками эндометрия человека *in vitro*

UDC 611.664.085.2:611.013.395

O.V. Zlatska^{1,2*}, A.E. Rodnichenko^{1,2}, O.S. Gubar^{2,3}, D.A. Zubov^{1,2},
L.S. Litvinova⁴, N.M. Todosenko⁴, S.N. Novikova¹, R.G. Vasiliev^{1,2}

In Vitro Formation of 3D-Spheroids by Human Endometrial Multipotent Mesenchymal Stromal Cells

Ключевые слова: мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки, эндометрий человека, сфероиды.

Ключові слова: мультипотентні мезенхімальні стромальні клітини, ендометрій людини, сфероїди.

Key words: multipotent mesenchymal stromal cells, human endometrium, spheroids.

Эндометрий представляет собой структуру, которая имеет значительный потенциал к регенерации и реорганизации [2]. Реализация данных процессов обеспечивается пулом различных типов стволовых и прогениторных клеток – мезенхимальных, эндотелиальных и эпителиальных [3, 4].

Интерес к мультипотентным мезенхимальным стромальным клеткам (ММСК) из эндометрия человека (ММСК-эн) обусловлен относительной безопасностью, легкостью получения биоптата, их высокой пролиферативной активностью, широким дифференцировочным потенциалом и стабильностью кариотипа [8].

Возможность получения клеточных культур из биоптатов эндометрия открывает новые перспективы в моделировании патологий эндометрия, тестировании фармакологических препаратов и создании инновационных биомедицинских клеточных продуктов на их основе.

В регенеративной медицине все чаще используют не только суспензию клеток, но и различные 3D-конструкции. В качестве одного из подходов для повышения эффективности клеточной терапии на основе ММСК рассматривается возможность использования 3D-сфероидов. Это позволяет улучшить

The endometrium is a structure that has a significant capacity to regenerate and re-arrange [2]. The implementation of these processes is provided by a pool of different types of stem and progenitor cell, *i. e.* mesenchymal, endothelial and epithelial cells [3, 4].

Interest in multipotent mesenchymal stromal cells (MMSCs) derived from human endometrium (MMSC-en) is explained by a relative safety, easily accessible biopate, their high proliferative activity, wide differentiation potential and karyotype stability [8].

The possibility of obtaining the cell cultures from endometrial biopsy opens new perspectives in simulating the endometrial pathologies, testing pharmacological preparations and creating innovative biomedical cell products based on them.

Various 3D constructs, as well as cell suspensions are used widely in regenerative medicine. As one of the approaches to enhance the effectiveness of cell therapy based on MMSCs, the possibility of using 3D spheroids is being considered. This allows the improved viability and survival of cells during transplantation, change of the spectrum of secreted cytokines, chemokines and growth factors, and also their increased production [7]. Formation of 3D spheroids from MMSCs utilizes various techniques, varying by expenses,

¹ДУ «Інститут генетичної та регенеративної медицини НАМН України», м. Київ, Україна

²Біотехнологічна лабораторія ilaya.regeneration медичної компанії ilaya, м. Київ, Україна

³Інститут молекулярної біології та генетики НАН України, м. Київ, Україна

⁴Лабораторія імунології і клітинних біотехнологій Балтійського федерального університету імені І. Канта, м. Калінінград, Росія

¹State Institute of Genetic and Regenerative Medicine of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine, Kyiv, Ukraine

²Biotechnological Laboratory ilaya.regeneration, Medical Company ilaya, Kyiv, Ukraine

³Institute of Molecular Biology and Genetics of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, Ukraine

⁴Laboratory of Immunology and Cell Biotechnology, Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russia

*Автор, якому необхідно надсилати кореспонденцію:
вул. Вишгородська, 67, м. Київ, Україна 04114;
тел.: (+38 044) 468-75-50; факс: (+38 044) 468-75-41
електронна пошта: alenazlacka@gmail.com

*To whom correspondence should be addressed:
67, Vyshgorodskaya str., Kyiv, Ukraine 04114;
tel.: +380 44 468 7550; fax: +380 44 468 7541
e-mail: alenazlacka@gmail.com

Надійшла 26.01.2018

Прийнята до друку 19.02.2018

Received January, 26, 2018

Accepted February, 19, 2018

© 2018 O.V. Zlatska et al. Published by the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>), which permits unrestricted reuse, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

жизнеспособность и приживаемость клеток при трансплантации, изменить спектр секретируемых цитокинов, хемокинов и факторов роста, а также повысить их продукцию [7]. Для формирования 3D-сфероидов из ММСК используют различные техники, отличающиеся стоимостью, воспроизводимостью, возможностью автоматизации и масштабирования [7]. Необходимо отметить, что механизм формирования 3D-сфероидов из ММСК имеет общие черты с мезенхимально-эпителиальным переходом (например, экспрессия E-кадгерина ММСК из пуповинной крови при формировании сфероидов) [6], который наблюдается во время эмбрионального развития в ходе гаструляции и органогенеза, а также на различных этапах канцерогенеза [9]. При этом молекулярные механизмы формирования 3D-сфероидов отличаются у популяций клеток с характеристиками ММСК, полученными из разных тканевых источников [7].

Целью данной работы было получение культуры мезенхимальных стромальных клеток из эндометрия человека и исследование их способности к формированию 3D-сфероидов.

Образцы эндометрия получали путем биопсии в ходе лечебно-диагностической гистероскопии в пролиферативную фазу менструального цикла. Возраст пациенток составлял $(34 \pm 3,3)$ года. Во всех случаях были подписаны добровольные информированные согласия на забор биоматериала, выделение клеток и проведение экспериментов. В работе были получены культуры ММСК-эн от пяти доноров. Биоптаты эндометрия диссоциировали путем ферментативной обработки в течение часа в растворе 0,1% коллагеназы IA и 0,1% проназы с добавлением 2% эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС). Полученную суспензию клеток культивировали в среде DMEM/F12 с добавлением 10% ЭТС, 2 мМ глутамин и 1 нг/мл FGF-2 (все «Sigma», США) в мультигазовых инкубаторах при 37°C, насыщающей влажности, 5% CO₂ и 5% O₂. Для исследования были отобраны ММСК-эн как фракция клеток, которая адгезировала к пластику через 24 ч после посева суспензии первично выделенных клеток. Смену среды проводили каждые 48 ч. Клетки пассировали с использованием 0,05%-го раствора трипсина, пересевали с плотностью посева 1 000 кл/см² и культивировали до образования монослоя.

Направленную адипо-, остео- и хондрогенную дифференцировку проводили по общепринятым методикам [5].

Иммунофенотип ММСК-эн определяли с помощью проточного цитофлуориметра-сортера «BD FACSAria» («Becton Dickinson», США) с использованием флуорохром-конъюгированных моноклональных антител к CD73, CD90, CD105, CD34, CD45,

reproducibility, possible automation and scale-up [7]. It should be noted that the mechanism for the formation of 3D spheroids from MMSCs is similar to the one for mesenchymal-epithelial transition (for example, the expression of E-cadherins in MMSCs from umbilical cord blood during the formation of spheroids) [6], which is observed when embryo develops during gastrulation and organogenesis, as well as at various stages of carcinogenesis [9]. At the same time, the molecular mechanisms for the formation of 3D-spheroids differ in the cell populations possessing the characteristics of MMSCs derived from various tissue sources [7].

The aim of this research was to obtain a culture of mesenchymal stromal cells from the human endometrium and to study their ability to form 3D spheroids.

Endometrial specimens were obtained by biopsy during therapeutic diagnostic hysteroscopy in the menstrual cycle proliferative phase. The age of patients was 34 ± 3.3 years. In all the cases, voluntary informed consent was signed for the collection of biomaterial, isolation of cells and conducting the experiments. In the research the cultures of MMSCs-en from five donors were obtained. Endometrial biopsies were dissociated by enzymatic treatment for an hour in a solution of 0.1% collagenase IA and 0.1% pronase supplemented with 2% fetal bovine serum (FBS). The resulted cell suspension was cultured in DMEM/F12 supplemented with 10% FBS, 2 mM glutamine and 1 ng/ml FGF-2 (all reagents of Sigma, USA) in multigas incubators at 37°C, saturated humidity, 5% CO₂ and 5% O₂. To investigate the MMSCs-en, we have selected a fraction of cells which adhered to the plastic 24 hrs after seeding the primary isolated cells. The medium was changed every 48 hrs. The cells were passaged using a 0.05% trypsin solution, reseeded at a seed density of 1,000 cells/cm², and cultured until a monolayer was formed.

Directed adipo-, osteo- and chondrogenic differentiation was carried out according to the traditional methods [5].

Immunophenotype MMSCs-en was determined using a flow cytometer-sorter BD FACSAria (Becton Dickinson, USA) using fluorochrom-conjugated monoclonal antibodies to CD73, CD90, CD105, CD34, CD45, HLA-DR according to the manufacturer's instructions. The analysis was carried out using the software 'BD FACS Diva 6.1' (Becton Dickinson).

For the targeted formation of 3D spheroids, MMSCs-en were seeded at a concentration of 200,000 cells per well into low-adhesive 24-well plates (Nunc, USA) in a serum-free culture medium (DMEM / F12, 2 mM glutamine, 1% ITS nutritional supplement; 0.01% bovine albumin.



HLA-DR в соответствии с инструкцией производителя. Анализ проводили с помощью программного обеспечения «BD FACS Diva 6.1» («Becton Dickinson»).

Для направленного формирования 3D-сфероидов ММСК-эн в концентрации 200 000 клеток засевали на лунку в низкоадгезивные 24-луночные планшеты («Nunc», США) в бессывороточной питательной среде (DMEM/F12; 2 мМ глутамин; 1% питательной добавки ITS; 0,01% бычьего альбумина).

В экспериментах исследовали клеточные культуры третьего пассажа.

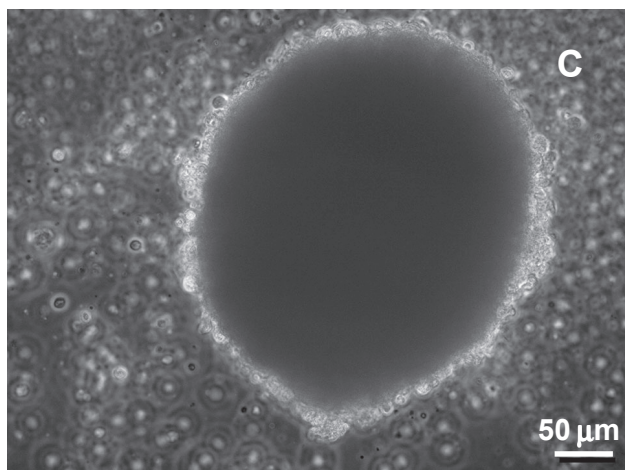
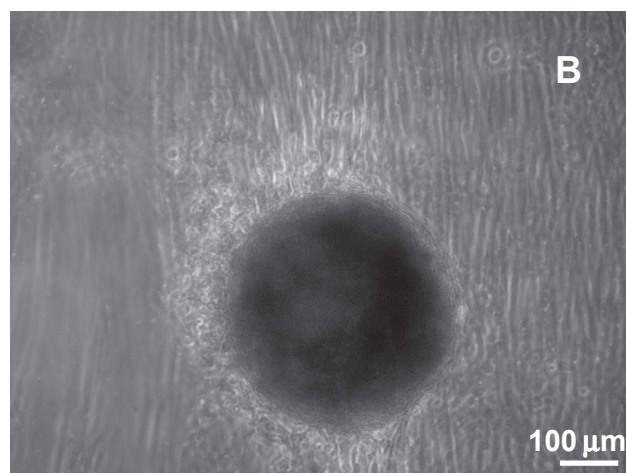
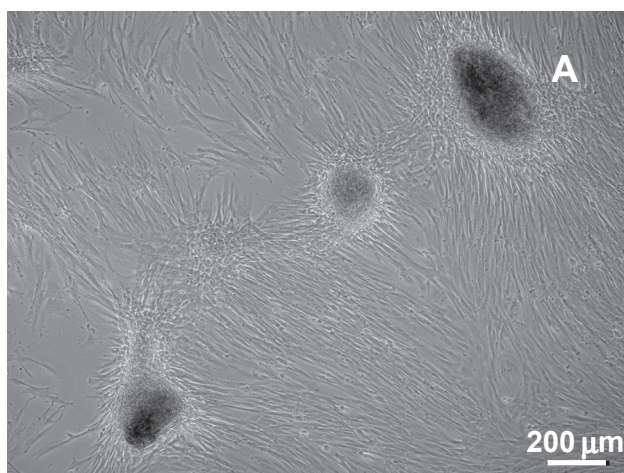
Для фотодокументирования использовали инвертированный микроскоп «Axio Observer A1», оборудованный цифровой видеокамерой «AxioCam ERc 5s»

In the experiments, the third passage cell culture was used.

Imaging was performed by inverted microscope 'Axio Observer A1' was used, equipped with a digital video camera 'AxioCam ERc 5s' and software 'ZEN 2012 (all equipment of Carl Zeiss, Germany).

All numerical data were represented as the mean and standard deviation ($M \pm s$).

Five cultures of the human endometrial MMSCs were obtained. Cells in culture had a fibroblast-like morphology. Immunophenotype study results showed a positive expression: CD90 – ($95.44 \pm 3.3\%$); CD105 – ($96.3 \pm 2.7\%$); CD73 – ($97.6 \pm 1.9\%$), and also insignificant expression of hemopoietic markers: CD34 –



Спонтанное и направленное формирование 3D-сфероидов ММСК-эн человека: **A** – начальные этапы спонтанного сферогенеза (формирование валиков и полусфер), 7-е сутки культивирования в стандартных условиях; **B** – открепление сформировавшегося 3D-сфероида с переходом во флотирующее состояние, 14-е сутки культивирования в стандартных условиях; **C** – направленное формирование 3D-сфероидов, 24 ч культивирования в низкоадгезивной культуральной посуде и бессывороточной питательной среде. Фазово-контрастная микроскопия.

Spontaneous and directed formation of 3D-spheroids of human MMSCs-en: **A** – initial stages of spontaneous spherogenesis (formation of rollers and semispheres), culturing day 7 under standard conditions; **B** – detachment of formed 3D-spheroid with transition to floating state, culturing day 14 under standard; **C** – directed formation of 3D-spheroids, 24 hrs culturing in low adhesive medium culturing dishes and serum-free medium. Phase contrast microscopy.



и программным обеспечением «ZEN 2012» (все «Carl Zeiss», Германия).

Все числовые данные представляли в виде среднего значения и стандартного отклонения ($M \pm s$).

Было получено пять культур ММСК эндометрия человека. Клетки в культуре имели фибробластоподобную морфологию. Результаты изучения иммунофенотипа показали положительную экспрессию: CD90 – (95,44 ± 3,3)%; CD105 – (96,3 ± 2,7)%; CD73 – (97,6 ± 1,9)%, а также незначительную экспрессию гемопоэтических маркеров: CD34 – (0,92 ± 0,4)%; CD45 – (0,36 ± 0,3)%; HLA-DR – (0,76 ± 0,2)%. При культивировании в адипо-, остео- и хондроиндуктивных средах ММСК-эн дифференцировались в соответствующих направлениях (данные не представлены).

Показано, что все клеточные культуры соответствовали минимальным критериям, предъявляемым к ММСК: адгезия к пластику в стандартных условиях культивирования, иммунофенотип и способность к направленной трехлинейной дифференцировке [1].

На 6–7-е сутки культивирования ММСК-эн в стандартных условиях наблюдалось неожиданное образование трехмерных клеточных структур (валиков и полусфер) (рисунок, А). В дальнейшем образованные трехмерные структуры продолжали расти, а через некоторое время происходило открепление 3D-сфероидов (рисунок, В). При переносе полученных флолирующих сфероидов в адгезивную посуду и ростовую среду с ЭТС наблюдали их адгезию к пластику, активную эмиграцию клеток из сфероидов с последующим ростом в виде монослойной культуры.

При засеивании в низкоадгезивную культуральную посуду с бессывороточной питательной средой ММСК-эн формировали в течение 24 ч 3D-сфероиды (рисунок, С), которые могли быть культивированы в течение 2–3 недель с сохранением жизнеспособности. Данный факт подтверждается эмиграцией и пролиферацией клеток при переводе сфероидов в адгезивное состояние в стандартных условиях культивирования.

Таким образом, в настоящей работе был описан феномен спонтанного сферогенеза в культуре ММСК-эн человека, а также показана возможность формирования 3D-сфероидов данным типом клеток с применением одного из стандартных подходов. Полученные результаты перспективны для сравнительного изучения молекулярных механизмов исследуемых процессов. Полученные при этом данные могут быть в дальнейшем использованы для совершенствования технологии направленного формирования 3D-сфероидов.

(0.92 ± 0.4)%; CD45 – (0.36 ± 0.3)%; HLA-DR – (0.76 ± 0.2)%. When culturing in adipo-, osteo- and chondroinductive media, the MMSCs-en were differentiated in the corresponding directions (no data presented).

It was found that all the cell cultures met the minimum criteria for MMSCs: adhesion to plastic under standard culture conditions, immunophenotype and ability to direct three-line differentiation [1].

To days 6-7 of MMSC-en cultivation under standard conditions, unexpected formation of three-dimensional cell structures (rollers and hemispheres) were observed (Figure, A). Later the formed three-dimensional structures continued their growth, and after a while the 3D-spheroids were detached (Figure, B). When the obtained floating spheroids were transferred into adhesive dishes and growth medium with FBS, their adhesion to plastic was observed, active emigration of the cells from the spheroids followed by growth as a monolayer culture.

When seeded in low-adhesive culture dishes with serum-free nutrient medium the MMSCs-en formed 3D spheroids (Figure, C) within 24 hrs, which could be cultured for 2 to 3 weeks while maintaining the viability of the cells. This fact is confirmed by the emigration and proliferation of cells when transferring spheroids into adhesive state under standard culture conditions.

Thus, in the present work, the phenomenon of spontaneous spherogenesis in human MMSCs-en culture was described, and the possibility of forming 3D-spheroids by this type of cells was demonstrated using one of the standard approaches. The obtained results are promising for a comparative study of molecular mechanisms of the processes under study. The data obtained in this case can be further used to improve the technology of directed formation of 3D-spheroids.

References

1. Dominici M.I., Le Blanc K., Mueller I. et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytherapy* 2006; 8(4): 315–317.
2. Gargett C.E. Stem cells in gynaecology. *Aust N Z J Obstet Gynaecol* 2004; 44(5): 380–386.
3. Gargett C.E. Identification and characterization of human endometrial stem/progenitor cells. *Aust N Z J Obstet Gynaecol* 2006; 46(3): 250–253.
4. Kasius A., Smit J.G., Torrance H.L. et al. Endometrial thickness and pregnancy rates after IVF: a systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod Update* 2014; 20(4): 530–541.
5. Lee E.J., Park S.J., Kang S.K. et al. Spherical bullet formation via E-cadherin promotes therapeutic potency of mesenchymal



Література

1. Dominici M.I., Le Blanc K., Mueller I. et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytherapy* 2006; 8(4): 315–317.
2. Gargett C.E. Stem cells in gynaecology. *Aust N Z J Obstet Gynaecol* 2004; 44(5): 380–386.
3. Gargett C.E. Identification and characterization of human endometrial stem/progenitor cells. *Aust N Z J Obstet Gynaecol* 2006; 46(3): 250–253.
4. Kasius A., Smit J.G., Torrance H.L. et al. Endometrial thickness and pregnancy rates after IVF: a systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod Update* 2014; 20(4): 530–541.
5. Lee E.J., Park S.J., Kang S.K. et al. Spherical bullet formation via E-cadherin promotes therapeutic potency of mesenchymal stem cells derived from human umbilical cord blood for myocardial infarction. *Mol Ther* 2012; 20(7): 1424–1433.
6. Meng X. Endometrial regenerative cells: A novel stem cell population. *J Transl Med* 2007; 5: 57.
7. Petrenko Y., Sykova E., Kubinova S. The therapeutic potential of three-dimensional multipotent mesenchymal stromal cell spheroids. *Stem Cell Res Ther* 2017; 8(1): 94.
8. Prockop D.J., Phinney D.G., Bunnell B.A., editors. *Mesenchymal stem cells: methods and protocols*. Totowa, NJ: Humana Press; 2008.
9. Yao D., Dai C., Peng S. Mechanism of the mesenchymal-epithelial transition and its relationship with metastatic tumor formation. *Mol Cancer Res* 2011; 9(12): 1608–1620.

