

## ИЗМЕНЕНИЕ УЛЬТРАСТРУКТУРЫ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК В ЦИКЛЕ МОНОСЛОЙ—СФЕРЫ—МОНОСЛОЙ

© М. Г. Мартынова,<sup>1</sup> Т. А. Крылова, О. А. Быстрова

*Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, 194064;*

<sup>1</sup>*электронный адрес: tgmart14@mail.ru*

Сферообразование стволовых клеток (СК) может использоваться для их подготовки к трансплантации. Методом электронной микроскопии исследованы СК, изолированные из субэпикардальной жировой ткани человека, на последовательных стадиях цикла монослой—сферы—монослой. При индуцировании сферообразования с использованием методов «неадгезивной поверхности» и «висячей капли» были получены сходные результаты. На первых 2—3 пассажах ультраструктура изолированных СК была сходна с ультраструктурой эмбриональных клеток (стадия 1). При дальнейшем пассировании (стадия 2) СК становились более электронно-плотными с лобчатым ядром, развитым шероховатым эндоплазматическим ретикуломом (ШЭР), выраженным аппаратом Гольджи и многочисленными вакуолями. Через 2 ч от момента инициации сферообразования (стадия 3) СК собирались в кластеры с формированием десмосомоподобных межклеточных контактов. Ядра СК содержали большие ядрышки с рыхлой фибро-гранулярной организацией, цитоплазма была заполнена разрушающимися канальцами ШЭР, аппарат Гольджи не обнаружен. Через 24 ч (стадия 4) СК в хорошо сформированных сферах имели большие плотные ядрышки и слабо развитые аппарат Гольджи и ШЭР. В течение 1-х сут после диссоциации сфер (стадия 5) ультраструктура СК становилась подобной ультраструктуре эмбриональных клеток и СК первых пассажей, за исключением наличия большого ядрышка и нескольких комплексов Гольджи. Еще через 1 сут (стадия 6) СК напоминали электронно-плотные СК второй стадии — они содержали неправильной формы ядро и цитоплазму, заполненную канальцами ШЭР. Полученные результаты мы интерпретируем как омоложение СК сразу после диссоциации сфер и старение СК по мере пассирования после изоляции из ткани и через 1 сут после диссоциации сфер. Необходимы дальнейшие исследования для выявления генетических, биохимических и физиологических параметров СК на установленных морфологически различимых стадиях сферообразования в целях получения высококачественного материала для клеточной терапии.

**Ключевые слова:** стволовые клетки, субэпикардальная жировая ткань, сферообразование, ультраструктура.

**Принятые сокращения:** СК — стволовые клетки, СЭЖТ — субэпикардальная жировая ткань, ШЭР — шероховатый эндоплазматический ретикулум.

Использование СК в терапевтических целях показало свою перспективность при многих заболеваниях. В процессе наращивания клеточной массы *in vitro* культуральные условия оказывают сильное влияние на свойства клеток, и лечебный эффект СК может быть усилен особыми методами их предтрансплантационной подготовки. Тестируют разные методы подготовки СК перед трансплантацией, в том числе сферообразование. При переходе из стадии монослоя в стадию сферы СК подвергаются существенным изменениям. Так, показано различие протеомного портрета СК, культивируемых в форме монослоя и в форме сфер (см. обзор: Kawaguchi et al., 2013). Различия касаются и таких характеристик, как экспрессия поверхностных маркеров и ядерных белков (Uchida et al., 2010). Сферообразование привлекает внимание исследователей в связи с двумя основными аспектами. Первый связан с разработкой методов улучшения терапевтического потенциала СК. Показано, что в ходе формирования сфер СК могут приобретать более выраженные противовоспалитель-

ные, иммунные свойства (Bartosh et al., 2010; Bartosh, Ylostalo, 2014), а также повышенный миогенный потенциал (Hosoyama et al., 2014). Второй аспект связан с обнаружением в составе СК повышенного количества раковых СК (Liao et al., 2014). Способность СК к сферообразованию сопоставляют с их способностью образовывать опухоли и давать метастазы. Обоснованием для таких сопоставлений служит то, что в обоих процессах (сферообразования и метастазирования) происходит эпителиально-мезенхимная трансформация клеток. В ряде работ делаются попытки использовать метод сферообразования для выделения субпопуляции раковых СК из общей популяции СК (Fujii et al., 2009; Zhong et al., 2010; Cao et al., 2011). Однако имеются и работы, показывающие неэффективность этого метода для обогащения культуры раковыми СК (Wu et al., 2014).

Сферообразование является обратимым процессом, и клетки сфер могут быть снова переведены в монослой изменением условий культивирования. Неизвестно, возвра-

щаются ли при этом свойства СК к первоначальному состоянию или при прохождении стадии сфер СК приобретают и стабильно сохраняют какие-то новые свойства, отличные от первоначальных.

Свойства СК, в частности способность дифференцироваться в клетки того или иного типа, различаются в зависимости от их тканевого происхождения. Особой популярностью пользуются СК мезенхимной природы, локализованные в подкожной жировой ткани, ввиду легкой доступности и возможности получения их в больших количествах. Недавно было показано, что субэпикардальная жировая ткань (СЭЖТ) человека подобно подкожной жировой ткани содержит СК мезенхимной природы (Bayes-Genis et al., 2010, 2013; Krylova et al., 2011). По своим морфологическим, биохимическим и физиологическим свойствам СЭЖТ отличается от жировой ткани других локализаций. Различия касаются размеров адипоцитов, содержания жирных кислот и белков, скорости метаболизма и др. (Rabkin, 2006). Таким образом, СЭЖТ в качестве ниши для СК создает особые условия, определяющие специфические свойства резидентных СК. Нами были выявлены пониженный эпителиогенный и остеогенный потенциал и повышенный кардиогенный потенциал СК, изолированных из СЭЖТ, по сравнению с СК, изолированными из подкожной жировой ткани (Крылова и др., 2014). Локализация в сердечной ткани и некоторые уже выявленные характеристики СК из СЭЖТ человека позволяют предположить перспективность их использования в качестве материала для регенеративной терапии сердечных заболеваний.

Феномен приобретения культивируемыми СК новых свойств при образовании сфер изучен недостаточно для осознанного и целенаправленного применения метода сферообразования в целях улучшения качества трансплантируемого материала. Несмотря на наличие значительного количества работ, посвященных этому процессу, сколько-нибудь полные исследования ультраструктурных преобразований клеток в ходе сферообразования отсутствуют. В качестве начального этапа изучения этого процесса в настоящей работе мы поставили задачу проанализировать ультраструктурные изменения СК, изолированных из СЭЖТ человека, в цикле преобразования популяции монослой—сферы—монослой.

## Материал и методика

Получение и ведение культур СК. Клетки получали из субэпикардальной жировой ткани человека (СЭЖТ). Образцы ткани брали в области атриовентрикулярной борозды левого сердца во время хирургической операции коронарного шунтирования от пациентов 40—50 лет в Федеральном центре сердца, крови и эндокринологии им. В. А. Алмазова МЗ РФ (Санкт-Петербург). Процедуру проводили в соответствии с Хельсинкской декларацией при разрешении госпитальной комиссии по этике. После многократной промывки в растворе PBS, не содержащем кальция и магния, ткань механически измельчали и диссоциировали в растворе 0.1%-ной коллагеназы I (GIBCO, США) при 37 °C в течение 40 мин с использованием шейкера. Активность фермента затем нейтрализовали фетальной бычьей сывороткой (FBS) (HyClone, США). Клеточную суспензию центрифугировали при 900 g в течение 7 мин, полученный сгусток ресуспендировали в ростовой среде  $\alpha$ -MEM (Sigma,

США), содержащей 10 % FBS, 100 ед./мл пенициллина, 100 ед./мл стрептомицина и 2 мМ глутамин (все от GIBCO, США), фильтровали через нейлоновый фильтр с порами 100 мкм и центрифугировали еще раз. Клетки высеивали при плотности  $3\text{—}10^4$  кл./см<sup>2</sup> и культивировали в чашках Петри или культуральных флаконах при 37 °C во влажной атмосфере, содержащей 5 % CO<sub>2</sub>. Через 48 ч клетки начинали прикрепляться ко дну культуральных сосудов. Среда меняли дважды в неделю.

Сферы получали двумя методами: 1) методом «висячая капля» и 2) посевом на неадгезивную поверхность, в качестве которой использовали пластик фирмы Thermo Scientific (США). При использовании первого метода клеточную суспензию, приготовленную из монослойной культуры (4—5-го пассажа), нанесли на крышку чашки Петри в виде капель, содержащих 2000—2500 клеток, объемом 25 мкл. Для предотвращения испарения в чашку добавляли 7—8 мл ростовой среды. Культивирование сфер проводили в стандартных условиях при 37 °C и 5 % CO<sub>2</sub> в среде  $\alpha$ -MEM, содержащей 10 % FBS. При использовании второго метода клеточную суспензию вносили непосредственно в чашки Петри. Условия культивирования были те же, что в первом методе. Для перевода клеток снова в монослой сферы собирали пипеткой в центрифужную пробирку, промывали PBS и диссоциировали ферментативным способом с помощью 0.25%-ной смеси трипсина с ЭДТА (GIBCO) или раствором Tryp-LE Express (Invitrogen, США) при 37 °C в течение 20—30 мин. Время экспозиции зависело от размера и возраста сфероидов. Диссоциированные сфериды промывали в PBS и помещали в чашки Петри для распластывания и дальнейшего исследования. Культуры фотографировали с помощью микроскопа Nikon Eclipse TS 100 (Япония).

Электронная микроскопия. Клетки фиксировали 2.5%-ным глутаральдегидом на 0.1 М какодилатном буфере, содержащем 0.15 М сахарозы, pH 7.4, в течение 1 ч, постфиксировали в 1%-ном OsO<sub>4</sub>, обезвоживали в спиртах восходящей концентрации и заливали в смесь Эпона и Аралдита по стандартным протоколам. Ультратонкие срезы изготавливали с помощью алмазного ножа на ультратоме ЛКВ и контрастировали растворами уранил-ацетата и цитрата свинца. Материал просматривали и фотографировали на электронном микроскопе Zeiss Libra 120 при 80 кВ. Клетки на стадиях монослоя после предварительной 15-минутной фиксации снимали со стекла с помощью скребка и полученную таким образом суспензию осаждали центрифугированием при 1000 об/мин на каждом этапе проводки. Сферы в фиксирующих растворах оседали под собственной тяжестью. Полутонкие срезы (1 мкм) окрашивали толудиновым синим и фотографировали с помощью цифровой камеры Leica DFC420 (Leica Microsystems, Германия) микроскопа AXIOVERT 200M (Carl Zeiss, Германия).

## Результаты

Изменения морфологии клетки прослеживали на последовательных стадиях цикла монослой—сферы—монослой от первых пассажей СК, изолированных из СЭЖТ, до нескольких часов после перевода культуры из сфер в монослой. При применении двух разных способов инициации сферообразования (метода «неадгезивной поверхности» и метода «висячей капли») получены сход-



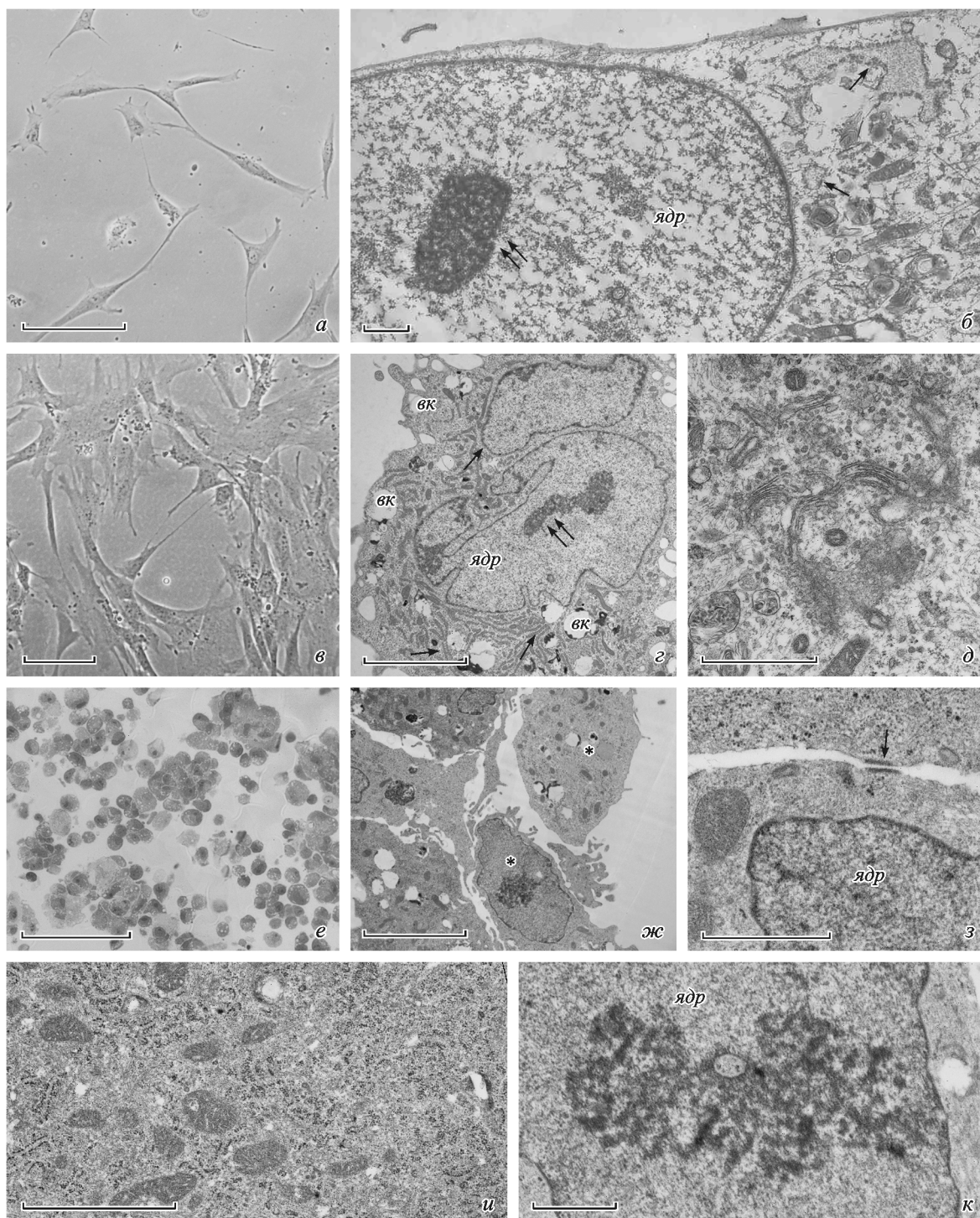


Рис. 1. Культура стволовых клеток (СК), изолированных из субэпикардиальной жировой ткани (СЭЖТ) человека, в разные сроки после посева (а–д) и инициации сферообразования (е–к).

а, б — СК на 3-м пассаже после посева: вид культуры (а) и ее ультраструктура (б) — электронно-светлые ядро (ядр) и цитоплазма, маленькие плотные ядрышки (двойная стрелка) и короткие расширенные каналцы ШЭР (стрелки). в–д — СК на 5-м пассаже после посева: вид культуры (в) и ее ультраструктура (д) — электронно-плотное, лопастное ядро, электронно-плотные цитоплазма и ядрышко (двойная стрелка), многочисленные вакуоли (вк) и длинные узкие каналцы ШЭР (стрелки), развитый аппарат Гольджи, представленный цистернами и пузырьками (д). е–к — СК через 2 ч после инициации сферообразования: е — поперечный срез образующихся кластеров клеток (окраска толуидиновым синим), жс — СК на поверхности (звездочки) и внутри кластеров, не различающиеся по форме и ультраструктуре, з — десмосомоподобный контакт (стрелка) между СК, и — цитоплазма СК, заполненная распадающимися каналцами ШЭР, к — ядрышко с рыхлой фиброгранулярной организацией. Масштабные отрезки: а, в, е — 100, б, д, з, к — 1, г, ж, и — 5 мкм.



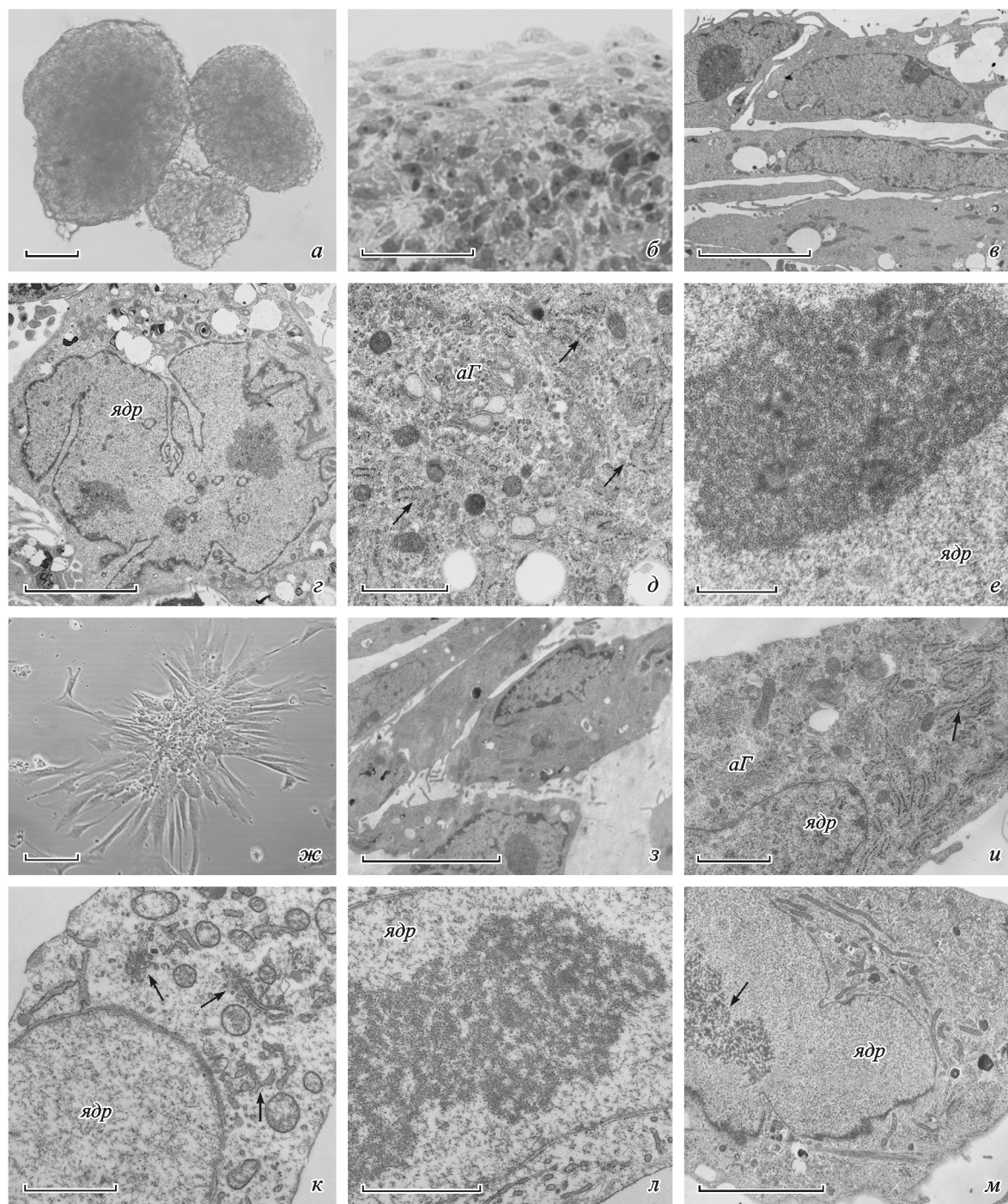


Рис. 2. Культура стволовых клеток (СК), изолированных из СЭЖТ человека в разные сроки после начала сферообразования (а—е) и диссоциации сфер (ж—м).

а—е — СК через 24 ч после инициации сферообразования: а — плавающие сферические колонии (фазово-контрастная микроскопия), б — фрагмент полутонкого среза сферы (окраска толуидиновым синим), в — распластанные СК на поверхности сферы, г — СК неправильной формы с лопастным ядром внутри сферы, д — фрагмент цитоплазмы СК с короткими канальцами ШЭР (стрелки) и зоной многочисленных пузырьков аппарата Гольджи (аГ), е — плотное ядрышко СК. ж—и — СК, мигрирующие из сфер после их диссоциации: ж — распадающаяся сфера, з — СК, сходные по ультраструктуре с клетками 24-часовых сфер (ср. с фрагментом в), и — СК с более электронно-светлым ядром и цитоплазмой и длинными узкими канальцами ШЭР (стрелка) и выраженным аппаратом Гольджи (аГ). к, л — СК через 1 сут после диссоциации сфер: к — электронно-светлая СК, содержащая ядро (ядр) с гладкой мембраной и несколько небольших комплексов Гольджи (стрелки), л — крупное ядрышко (ядр) с рыхлой фиброгранулярной организацией, м — электронно-плотная СК через 2 сут после диссоциации сфер содержит лопастное ядро (ядр) с рыхлым ядрышком (стрелка). Масштабные отрезки: а, ж — 100, б — 50, в, г, з, л — 5, д, е, и — 1 мкм.

ные результаты. Заметным различием являлась большая вариабельность размеров сфер в первом случае.

Изолированные из СЭЖТ СК оседали и прикреплялись ко дну культурального сосуда. Прикрепившиеся клетки приобретали веретеновидную форму (рис. 1, а).

Стадия 1. На первых пассажах (1—4) клетки имели ультраструктуру, характерную для эмбриональных недифференцированных клеток (рис. 1, б). Округлое ядро с гладкими очертаниями содержало разреженный эухроматин и небольшое плотное ядрышко. В электронно-светлой цитоплазме находились мелкие митохондрии, вакуоли, короткие расширенные каналцы ШЭР и умеренное количество свободных рибосом. На поверхности клеток были расположены отдельные микроворсинки.

Стадия 2. Через 5—6 пассажей культура была представлена монослоем, образованным многоотростчатыми клетками более крупных размеров (рис. 1, в). Лопастные ядра кроме плотно упакованного эухроматина содержали небольшие глыбки субмембранного гетерохроматина и более крупные, чем на предыдущей стадии, плотные ядрышки (рис. 1, г). В цитоплазме обнаруживались пучки микрофибрилл и многочисленные хорошо сформированные узкие каналцы ШЭР. Свободные рибосомы густо заполняли цитоплазму. В околядерной зоне появились цистерны и пузырьки хорошо развитого аппарата Гольджи (рис. 1, д). Обращало на себя внимание присутствие большого количества вакуолей. Поверхность клеток несла многочисленные микроворсинки.

Стадия 3. Уже через 2 ч после инициации сферообразования СК объединялись в небольшие кластеры размером 20—40 мкм (рис. 1, е). Клетки, расположенные внутри и на поверхности кластера, имели схожую ультраструктуру (рис. 1, ж), во многом аналогичную ультраструктуре клеток предыдущей стадии. Между клетками образовывались немногочисленные контакты, схожие с десмосомами (рис. 1, з). Элементов аппарата Гольджи обнаружить не удалось. Канальцы ШЭР потеряли четкие очертания и имели признаки деструкции (рис. 1, и). Ядра содержали крупное рыхлое ядрышко (рис. 1, к). Через 4 ч размеры клеточных кластеров значительно увеличивались, достигая 50—80 мкм.

Стадия 4. Через 1 сут после инициации сферообразования культура трансформировалась в полностью сформированные плотные сферы диаметром 100—300 мкм (рис. 2, а). На поверхности сфер располагалось несколько рядов уплощенных клеток (рис. 2, б), имеющих ядро с гладкой поверхностью и несущих на поверхности многочисленные микроворсинки (рис. 2, в). Клетки внутри сфер имели неправильную форму и содержали лопастное ядро. Микроворсинки на поверхности внутренних клеток были короче и реже расположены, чем у внешних клеток. Цитоплазма тех и других клеток содержала вакуоли и короткие каналцы ШЭР. Редко наблюдали скопления пузырьков, представляющих собой элементы аппарата Гольджи (рис. 2, д). В ядрах появлялся субмембранный гетерохроматин, и ядрышки становились компактнее (рис. 2, е).

Сразу после переноса сфер в чашки Петри для диссоциации клетки начинали активно мигрировать по поверхности стекла (рис. 2, ж). Популяция клеток на этой стадии была представлена смесью клеток с ультраструктурой, присущей клеткам сформированных сфер (рис. 2, з), и клеток, демонстрирующих параметры, переходные между параметрами СК сфер и СК следующей стадии (рис. 2, и).

Стадия 5. Через 1 сут после диссоциации сфер клетки по морфологии становились похожими на эмбриональные и имели электронно-светлые ядро и цитоплазму, содержащую мелкие митохондрии, и короткие каналцы ШЭР. Ядра округлые и с гладкой поверхностью заполнены неплотным эухроматином и не содержали гетерохроматина. Однако от культуры СК первой стадии они отличались наличием многочисленных небольших по размеру комплексов Гольджи (рис. 2, к) и крупных хорошо развитых ядрышек, в которых были хорошо различимы фибриллярный и гранулярный компоненты (рис. 2, л).

Стадия 6. Через 2 сут СК, вторично образовавшие монослой, демонстрировали ультраструктуру клеток второй стадии; ядро и цитоплазма становились электронно-плотными, ядро приобретало лопастную форму и субмембранный гетерохроматин, в цитоплазме появлялись длинные узкие каналцы ШЭР, пучки тонких филаментов и вакуоли (рис. 2, м).

## Обсуждение

Наши исследования показали, что СК в цикле монослой—сферы—монослой проходят по крайней мере шесть морфологически различимых стадий: изолированные из ткани СК на ранних пассажах (стадия 1), СК на поздних пассажах (стадия 2), СК, образующие кластеры (стадия 3), СК, образующие плотные сферы (стадия 4), СК после диссоциации сфер в 1-е (стадия 5) и 2-е (стадия 6) сут. Особенно заметные изменения ультраструктуры СК в цикле монослой—сферы—монослой касаются таких структур, как ядрышко, аппарат Гольджи, ШЭР. Поэтому можно заключить, что значительные преобразования претерпевает белоксинтезирующий аппарат клеток.

При переходе СК из стадии 1 к стадии 2 и из стадии 5 к стадии 6 происходят сходные изменения ультраструктуры. Они заключаются в повышении электронной плотности ядра и цитоплазмы, появлении развитой системы канальцев ШЭР, аппарата Гольджи, накоплении свободных рибосом. При этом не заметно выраженных признаков дифференциации в каком-либо определенном направлении, таких как, например, появление миофибрилл и специфических межклеточных контактов, что характерно для мышечной дифференцировки, или липидных капель, свойственных адипоцитам, и т. п. Изменения морфологии СК при пассировании описаны в ряде работ, их связывают со старением клеток в результате клеточных делений в ходе культивирования (Zhuang et al., 2015). При этом у клеток наблюдаются множественные дисфункции и нарушения метаболизма. Следует учитывать, что клеточное старение СК при пассировании может ухудшать их регенеративный потенциал и, следовательно, делать клетки менее пригодными к трансплантации.

Выраженными характеристиками СК на начальных стадиях образования сфер являлись разрушение канальцев ШЭР и если не полное исчезновение, то, судя по трудности обнаружения, значительная деградация компонентов аппарата Гольджи. На этапе формирования «зрелых» сфер эти структуры вновь появляются. Дальнейшие исследования помогут определить функциональную основу таких изменений ультраструктурных параметров СК. Можно предположить, что они связаны с перепрограммированием клеток в связи с резким изменением пространственной организации культуры.



При переходе СК из стадии 4 к стадии 5 (диссоциация сфер) мы наблюдаем их омоложение, которое выражается в приобретении морфологического сходства с эмбриональными клетками и СК стадии 1. Следует, однако, заметить, что полного уподобления, т. е. возвращения к исходному состоянию только что изолированных из ткани СК, не происходит. В отличие от СК стадии 1 СК стадии 5 обладают крупным хорошо развитым ядрышком и множеством комплексов Гольджи. Такое состояние длится недолго, и на 2-е сут после диссоциации сфер СК вновь приобретают признаки старения (стадия 6).

На кратком этапе омоложения СК можно ожидать повышения плюрипотентности, дифференцировочного потенциала и других свойств, характеризующих клеточную стволовость. С другой стороны, омоложение клеток может приводить к возрастанию их онкогенности. Было показано, что сферообразование повышает плюрипотентность СК, происходящих из жировой ткани человека (Cheng et al., 2012), индуцирует репрограммирование мышечных фибробластов в клетки, подобные нейрональным предшественникам (Su et al., 2013), и что сам процесс формирования клетками сфер без воздействия экзогенных индукторов ведет к их перепрограммированию (Su et al., 2013; Te Riele, 2009). Повышение плюрипотентности СК связывают с тем, что сферы рекапитулируют микроокружение, подобное нишам СК в тканях (Li et al., 2010).

Обнаружение нескольких морфологически различных стадий СК в их цикле монослой—сферы—монослой важно для дальнейшего активного изучения свойств СК, проходящих цикл сферообразования. Оно указывает на поворотные критические моменты в состоянии клеток, на периоды некоего морфологического ремоделирования, которые, как можно предполагать, связаны с перепрограммированием и коррелируют с определенными генетическими, биохимическими и физиологическими процессами в клетке. Дальнейшие исследования должны охарактеризовать выявленные стадии по таким параметрам, как плюрипотентность, дифференцировочный потенциал, онкогенность и др. На конечном этапе мы предполагаем разработать рекомендации по отбору СК на стадиях, когда они в наибольшей степени пригодны для клеточной терапии.

Следует отметить, что решение задач, поставленных в настоящем исследовании, позволит лучше понять целый ряд общебиологических проблем, выходящих за рамки изучения поведения СК в культуре. Образование сфер культивируемыми клетками является по существу эпителиально-мезенхимной трансформацией клеток, идущей *in vivo* при органогенезе у эмбрионов, при регенерации тканей и других процессах. Можно полагать, что клеточные и молекулярные механизмы, задействованные во всех этих процессах, окажутся сходными.

Работа выполнена при частичной поддержке Российского научного фонда (проект 14-50-00068) и ФАНО России.

### Список литературы

Крылова Т. А., Быстрова О. А., Худяков А. А., Малашичева А. Б., Моисеева О. М., Зенин В. В., Мартынова М. Г. 2014. Сравнительные характеристики стволовых клеток, изолированных из подкожной и субэпикардальной жировой ткани. Цитология. 56 (3): 212—217. (Krylova T. A., Bystrova O. A.,

Khudyakov A. A., Malashicheva A. B., Moiseeva O. M., Zenin V. V., Martynova M. G. 2014. Properties of stem cells isolated from subcutaneous and subepicardial adipose tissues. Cell Tissue Biol. 8: 277—282.)

Bartosh T. J., Ylöstalo J. H. 2014. Preparation of anti-inflammatory mesenchymal Stem/precursor cells (MSCs) through sphere formation using hanging-drop culture technique. Curr. Protoc. Stem Cell Biol. 28: 2B.6.1—2B.6.23.

Bartosh T. J., Ylöstalo J. H., Mohammadipour A., Bazhanov N., Coble K., Claypool K., Lee R. H., Choi H., Prockop D. J. 2010. Aggregation of human mesenchymal stromal cells (MSCs) into 3D spheroids enhances their antiinflammatory properties. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 107: 13 724—13 729.

Bayes-Genis A., Gálvez-Montón C., Prat-Vidal C., Soler-Botija C. 2013. Cardiac adipose tissue: a new frontier for cardiac regeneration? Int. J. Cardiol. 167: 22—25.

Bayes-Genis A., Soler-Botija C., Farré J., Sepúlveda P., Raya A., Roura S., Prat-Vidal C., Gálvez-Montón C., Montero J. A., Büscher D., Belmonte J. C. 2010. Human progenitor cells derived from cardiac adipose tissue ameliorate myocardial infarction in rodents. J. Mol. Cell Cardiol. 49: 771—780.

Cao L., Zhou Y., Zhai B., Liao J., Xu W., Zhang R., Li J., Zhang Y., Chen L., Qian H., Wu M., Yin Z. 2011. Sphere-forming cell subpopulations with cancer stem cell properties in human hepatoma cell lines. BMC Gastroenterol. 11: 71.

Cheng N. C., Wang S., Young T. H. 2012. The influence of spheroid formation of human adipose-derived stem cells on chitosan films on stemness and differentiation capabilities. Biomaterials. 33: 1748—1758.

Fujii H., Honoki K., Tsujiuchi T., Kido A., Yoshitani K., Takakura Y. 2009. Sphere-forming stem-like cell populations with drug resistance in human sarcoma cell lines. Int. J. Oncol. 34: 1381—1386.

Hosoyama T., McGivern J. V., Van Dyke J. M., Ebert A. D., Suzuki M. 2014. Derivation of myogenic progenitors directly from human pluripotent stem cells using a sphere-based culture. Stem Cells Transl. Med. 3: 564—574.

Kawaguchi N., Machida M., Hatta K., Nakanishi T., Takagaki Y. 2013. Cell shape and cardiosphere differentiation: a revelation by proteomic profiling. Biochem. Res. Int. 2013: 730874.

Krylova T. A., Bystrova O. A., Jakovleva T. K., Zenin V. V., Moiseeva O. M., Parfenov V. N., Martynova M. G. 2011. Characteristics of human subepicardial adipose tissue-derived stem cells. Stem Cell Studies. 1. e18: 115—122.

Li T. S., Cheng K., Lee S. T., Matsushita S., Davis D., Malliaras K., Zhang Y., Matsushita N., Smith R. R., Marban E. 2010. Cardiospheres recapitulate a niche-like microenvironment rich in stemness and cell-matrix interactions, rationalizing their enhanced functional potency for myocardial repair. Stem Cells. 28: 2088—2098.

Liao J., Qian F., Tchabo N., Mhawech-Fauceglia P., Beck A., Qian Z., Wang X., Huss W. J., Lele S. B., Morrison C. D., Odunsi K. 2014. Ovarian cancer spheroid cells with stem cell-like properties contribute to tumor generation, metastasis and chemotherapy resistance through hypoxia-resistant metabolism. PLoS ONE 9: e84941.

Rabkin S. W. 2006. Epicardial fat: properties, function and relationship to obesity. Obes. Rev. 8: 253—261.

Su G., Zhao Y., Wei J., Xiao Z., Chen B., Han J., Chen L., Guan J., Wang R., Dong Q., Dai J. 2013. Direct conversion of fibroblasts into neural progenitor-like cells by forced growth into 3D spheres on low attachment surfaces. Biomaterials. 34: 5897—5906.

Te Riele H. 2009. Recreating stem cells: a novel entrance to the fountain of youth. Cell Stem Cell. 4: 279—280.

Uchida Y., Tanaka S., Aihara A., Adikrisna R., Yoshitake K., Matsumura S., Mitsunori Y., Murakata A., Noguchi N., Irie T., Kudo A., Nakamura N., Lai P. B., Arai S. 2010. Analogy between sphere forming ability and stemness of human hepatoma cells. Oncol. Rep. 24: 1147—1151.

Wu H., Zhang H., Hu Y., Xia Q., Liu C., Li Y., Yu B., Gu T., Zhang X., Yu X., Kong W. 2014. Sphere formation assay is not an effective method for cancer stem cell derivation and characteriza-

tion from the Caco—2 colorectal cell line. *Curr. Stem Cell Res. Ther.* 9 : 82—88.

Zhong Y., Guan K., Guo S., Zhou C., Wang D., Ma W., Zhang Y., Li C., Zhang S. 2010. Spheres derived from the human SK-RC-42 renal cell carcinoma cell line are enriched in cancer stem cells. *Cancer Lett.* 299 : 150—160.

Zhuang Y., Li D., Fu J., Shi Q., Lu Y., Ju X. 2015. Comparison of biological properties of umbilical cord-derived mesenchymal stem cells from early and late passages: immunomodulatory ability is enhanced in aged cells. *Mol. Med. Rep.* 11 : 166—174.

Поступила 1 X 2015

#### ULTRASTRUCTURAL CHANGES OF THE STEM CELLS IN THE CYCLE MONOLAYER—SPHERES—MONOLAYER

M. G. Martynova,<sup>1</sup> T. A. Krylova, O. A. Bystrova

Institute of Cytology RAS, St. Petersburg, 194064;

<sup>1</sup> e-mail: mgmart14@mail.ru

Sphere formation can be used to prepare stem cells (SCs) prior to transplantation. Here SCs isolated from human subepicardial adipose tissue were analyzed at different stages of the monolayer—spheres—monolayer cycle by transmission electron microscopy. The results obtained with both adherent-induced and hanging-drop induced spheres were similar. At first 2—3 passages (stage 1), isolated SCs displayed embryonal cell-like ultrastructure. With increasing passage times (stage 2), SCs became bigger and more electron-dark with a multi-lobed nucleus, well-developed rough endoplasmic reticulum (RER), prominent Golgi apparatus and numerous vacuoles. After 2 h from the initiation of the formation of spheres (stage 3), SCs gathered into clusters and formed desmosome-like intercellular contacts. Their nucleus possessed a large loose fibrillo-granular nucleoli, the cytoplasm was densely packed with disintegrated cisternae of RER, Golgi apparatus was not detected. After 24 h from the initiation of spheres (stage 4), SCs in well-formed spheres exhibited large dense nucleoli and poorly developed Golgi apparatus and RER. One day after sphere dissociating (stage 5), SCs were embryonal cell-like and morphologically similar to the cells of the first stage except for the presence of a large nucleolus and numerous Golgi complexes. After 48 h from sphere dissociating (stage 6), SCs became electron-dark and resembled the SCs of the second stage by the presence of irregularly shaped nuclei and the cytoplasm filled with RER. We interpreted the results as senescence of the SCs with the number of passages after isolation from tissue and a day after dissociation of the spheres and as rejuvenation of the SCs just after sphere dissociation. Further research is needed to reveal the genetic, biochemical and physiological parameters of the SCs on established morphologically distinct stages in order to provide higher-quality cellular material for disease cell therapy.

**Key words:** stem cell, subepicardial adipose tissue, sphere formation, ultrastructure.