

DOI: 10.7868/S0041377118100065

СВОЙСТВА ЭНДОМЕТРИАЛЬНЫХ МЕЗЕНХИМНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ПОСЛЕ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ В СФЕРОИДАХ

© А. П. Домнина,* Ю. В. Обидина, Н. Н. Никольский

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, 194064;

* электронный адрес: aldomnina@mail.ru

Эндометриальные мезенхимные стволовые клетки (эМСК) человека культивировали в 3-мерной (3D) модели (в сферах). Свойства эМСК в сферах оценивали в сравнении с эМСК в монослое (2D) по экспрессии поверхностных маркеров, способности к дифференцировке в остеобласти, адипоциты и децидуальные клетки, по пролиферативной активности, репликативному старению и по экспрессии противовоспалительных генов (TSG-6, HGF и EP2). На модели синдрома Ашермана у крыс, характеризующегося замещением нормального эндометрия соединительной тканью и нарушением fertильности, был опробован метод восстановления функциональности эндометрия с помощью трансплантации эМСК в виде сфероидов. Трансплантация эМСК в сферах оказала больший терапевтический эффект, чем трансплантация эМСК при культивировании в монослое, по частоте наступления беременностей и количеству потомства у экспериментальных животных.

Ключевые слова: эндометриальные мезенхимные стволовые клетки, клеточные сферахи, синдром Ашермана

Принятые сокращения: МСК — мезенхимные стволовые клетки, эМСК — эндометриальные МСК и EP2 — рецептор простагландинов Е, HGF — гепатоцитарный фактор роста, IGFBP-1 — протеин-1, связывающий инсулиноподобный фактор роста, TSG-6 — белок 6, стимулирующий фактор некроза опухолей (TNF).

Культивируемые мезенхимные стволовые клетки человека (МСК) были одобрены для клинических испытаний лечения многих заболеваний из-за легкого получения их от доноров, простоты культивирования и потенциала для аллогенных трансплантаций благодаря отсутствию иммуногенной реакции. Однако при клеточной терапии трансплантируемые клетки, как правило, переносятся в поврежденную ткань и часто становятся мало жизнеспособными, поскольку оказываются в стрессовых условиях. Для повышения выживаемости и пластичности трансплантируемых клеток разрабатываются различные методы предварительной обработки клеток. Одним из вариантов предобработки является культивирование клеток в сферах.

В настоящей работе МСК, выделенные из менструальной крови человека (эМСК), культивировали в сферах и исследовали их свойства *in vitro* и терапевтический потенциал *in vivo* на модели синдрома Ашермана у крыс. Синдром Ашермана развивается у женщин в результате повреждения эндометрия при внутриматочных вмешательствах с последующим образованием сращений в полости матки. Это приводит к гипо- или аменорее, невынашиванию беременности и является одной из причин женского бесплодия. Поскольку для многих больных существующие методы лечения этого заболевания неэффективны, так как не приводят к последующей регенера-

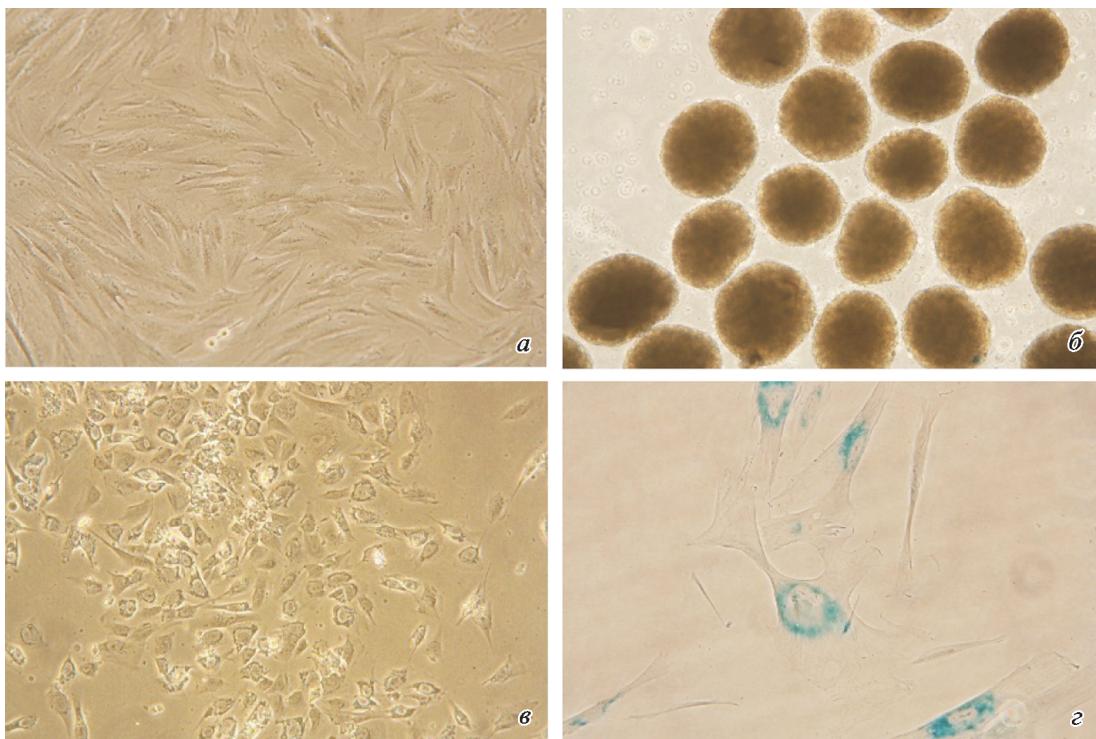
ции эндометрия и восстановлению его функций, разрабатываются новые методы лечения с помощью трансплантации стволовых клеток.

Материал и методика

Клетки эМСК, выделенные из фрагментов эндометрия, содержащихся в менструальной крови (Земелько и др., 2011), культивировали в среде DMEM/F12, содержащей 10 % коровьей эмбриональной сыворотки, 1 % глутамина и 1 % смеси антибиотиков. Клетки пересевали с помощью 0.05%-ного раствора трипсина и EDTA (Invitrogen, США) в соотношении 1 : 3.

Формирование сфер в МСК проводили на 4—6-м пассажах методом висячей капли (объем капли 35 мкл) по 5—7 тыс. клеток в сфере в течение 48 ч в висячей капле, затем переносили на чашки Петри, покрытые 2-гидроксиэтилметакрилатом (HEMA; Sigma, США), на 24 ч.

Иммунофенотипический анализ поверхностных CD-маркеров эМСК проводили с использованием проточного цитофлуориметра Epics XL (Beckman Coulter, США). Единичную клеточную суспензию получали при помощи 0.05%-ного трипсина и EDTA. Клетки (1 млн/мл) ресусPENDировали в растворе PBS, содержащем 5 % эмб-



Морфология эндометриальных мезенхимных стволовых клеток (эМСК) при разных условиях культивирования.

a — при культивировании в монослое; *б* — сформированные в сфероидах; *в* — эМСК в монослое после культивирования в сфероидах; *г* — окраска эМСК после культивирования в сфероидах в течение 15 пассажей на активность β -галактозидазы (маркер старения). Прижизненные фотографии, фазовый контраст, об. 10 \times .

риональной коровьей сыворотки. Для анализа использовали антитела, конъюгированные с FITC или фикоэртирином, — CD34, CD45, CD73, CD90, CD105 и HLA-DR тип II.

Синдром Ашермана моделировали на пологородных самках крыс линии Вистар массой 200—220 г. При работе с животными соблюдали принципы, изложенные в Декларации прав животных (World Medical Association Declaration of Helsinki), а также принятые Европейской конвенцией по защите прав позвоночных животных (Страсбург, 18.03.1986). Под общей анестезией в стерильных условиях животным проводили лапаротомию и в полости обоих рогов матки вводили по 0.3 мл 95%-ного этанола на 3 мин, затем полости рогов матки несколько раз промывали раствором PBS. После этого рану ушивали послойно и животным предоставляли покой. Через 15 дней проводили гистологическое исследование рогов матки у крыс. При анализе гистологических срезов было обнаружено разрушение эндометрия и образование соединительной ткани в полости матки крыс, моделирующих синдром Ашермана. У животных, не использованных для гистологического исследования, обнаружено нарушение fertильности при спаривании с самцами.

Трансплантацию эМСК в сфероидах животным с синдромом Ашермана проводили через 72 ч после проведения операции по повреждению эндометрия. Животным внутриматочно вводили суспензию эМСК или эМСК в сфероидах по $1 \cdot 10^6$ клеток в 0.3 мл раствора PBS. Через три половых цикла животных помещали совместно с самцами на 3 мес. За это время считали возникшие беременности и количество рожденного потомства. В качестве контрольных животных использова-

ли крыс, которым вместо эМСК вводили раствор PBS. Терапевтический эффект трансплантации эМСК оценивали по количеству потомства.

Результаты и обсуждение

В результате культивирования эМСК в сфероидах было обнаружено, что размер эМСК изменяется и фибробластоподобная форма становится более округлой (см. рисунок). Оценка свойств эМСК в сфероидах по экспрессии поверхностных маркеров показала, что экспрессия основных маркеров, характерных для эМСК, сохраняется. ЭМСК после культивирования в сфероидах имеют положительную экспрессию CD44, CD73, CD90, CD105, но не несут маркеров CD34 и CD45, характеризующих гемопоэтические стволовые клетки (табл. 1). Однако было обнаружено, что у эМСК после культивирования в сфероидах значительно снижается экспрессия CD146. По способности к дифференцировке в остеобласты адипоциты и дедибулярные клетки эМСК после культивирования в сфероидах существенно не отличаются от эМСК при культивировании в монослое. При длительном культивировании (более 15 пассажей) после формирования монослоя из эМСК после культивирования в сфероидах они переходят к пролиферации и вступают в фазу репликативного старения, выражаясь в положительной окраске на β -галактозидазу (см. рисунок, *г*).

Методом количественной ПЦР в реальном времени было обнаружено, что при культивировании эМСК в сфероидах в несколько раз повышается уровень экспрессии противовоспалительных генов (TSG-6, HGF и EP2) (даные не представлены). В последние годы проводится все

больше исследований, направленных на разработку наиболее эффективных способов трансплантации МСК. При применении методов клеточной терапии трансплантируемые клетки, как правило, переносятся в поврежденную ткань и часто становятся мало жизнеспособными, поскольку оказываются в стрессовых условиях. Микроокружение в поврежденных тканях изменить трудно и поэтому необходимо искать другой подход для повышения жизнеспособности трансплантируемых клеток. Проводятся многочисленные исследования по усилению выживаемости и пластичности трансплантируемых клеток за счет предварительной обработки. Одним из вариантов предобработки является культивирование клеток в сферах. Было показано, что культивирование в сферах повышает жизнеспособность клеток (Ho et al., 2016) и секрецию противовоспалительных факторов PGE2 и VEGF (Murphy et al., 2017).

Терапевтический потенциал эМСК в сферах *in vivo* мы исследовали на модели синдрома Ашермана на крысах. При внутриматочной трансплантации эМСК в сферах крысам с синдромом Ашермана наблюдали увеличение частоты наступления беременностей у крыс и увеличение количества потомства по сравнению с трансплантацией эМСК в суспензии (табл. 2).

Клеточная терапия, основанная на регенеративном потенциале МСК, является новым перспективным подходом для лечения различных заболеваний, в том числе бесплодия, вызванного нарушением функций эндометрия. МСК получают из разных тканевых источников, однако наиболее доступным источником МСК является менструальная кровь. Клетки, изолированные из фрагментов эндометрия, содержащихся в менструальной крови, обладают всеми свойствами МСК: имеют фибробластоподобную морфологию, высокую клоногенность, экспрессируют специфические маркеры мультипотентности (Земелько и др., 2011; Домнина и др., 2013). Показано, что эМСК *in vitro* способны дифференцироваться в клетки децидуальной ткани, которая является компонентом эндометрия и необходима для имплантации и нормального развития эмбриона (Домнина и др., 2015). Имеются сообщения о применении эМСК в клеточной терапии. Стволовые клетки, выделенные из менструальной крови здоровых дононров, были введены в организм 4 пациенток, страдающих рассеянным склерозом. Наблюдения за больными в течение 1 года показали отсутствие иммунологических реакций и побочного эффекта (Zhong et al., 2009).

Трансплантация эМСК успешно применена для лечения 17 пациентов с сердечной недостаточностью (Boskeria et al., 2013). Данные о применении клеточной терапии для лечения гинекологических заболеваний малочисленны. К настоящему времени имеется всего несколько публикаций, в которых сообщалось об успешном преодолении бесплодия в результате вылеченного синдрома Ашермана с помощью трансплантации клеток (Nagori et al., 2011; Singh et al., 2014; Santamaria et al., 2016). Больным вводили клетки костного мозга. Данные о возможности использования эМСК для лечения женских болезней, связанных с нарушением функций эндометрия, в литературе так же скучны (Tan et al., 2016).

На модели псевдобеременности крыс мы показали, что трансплантация эМСК стимулирует развитие децидуальной ткани (Domnina et al., 2013). Согласно современным представлениям, терапевтический эффект трансплантации МСК обусловливается не встраиванием кле-

Таблица 1
Поверхностные CD-маркеры эМСК
при разных условиях культивирования

Маркер	Экспрессия, %	
	монослои	сфераиды
CD34	0	0
CD44	93.3	91.4
CD45	1.4	1.1
CD73	97.0	96.3
CD90	92.0	91.2
CD105	95.4	81.2
CD146	60.6	0.5

Таблица 2
Результаты трансплантации эМСК крысам
с синдромом Ашермана

Внутриматочное введение	Число крыс	Доля беременностей, %	Число плодов на 1 беременную крысу
PBS	10	0	0.00
Суспензия из монослоя	30	50	2.93 ± 1.20
Сфераиды	10	60	4.50 ± 1.10

ток в поврежденную ткань, а паракринным действием, т. е. секрецией биоактивных молекул, таких как цитокины, ростовые факторы, компоненты экстраклеточного матрикса и др. (Prockop, 2010). Ранее нами было показано, что эМСК способствуют развитию событий, сопровождающих начальные этапы эмбрионального развития млекопитающих (Domnina et al., 2013), в том числе и при использовании клеток с остановленной пролиферацией (Domnina et al., 2016). Культивирование МСК в 3D-модели активно исследуется, разрабатываются способы использования таких моделей для ткане- и органозаместительной терапии. Полученные данные о свойствах эМСК в сферах свидетельствуют о перспективности применения эМСК для лечения бесплодия, связанного с нарушением функций эндометрия, и дальнейшей разработки тканезаместительной 3D-модели для лечения гинекологических заболеваний.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект 14-50-00068) и программы президиума РАН «Фундаментальные исследования для разработки биомедицинских технологий» (обеспечение базовых условий культивирования).

Список литературы

- Домнина А. П., Новикова П. В., Фридлянская И. И., Шилина М. А., Зенин Н. Н., Никольский Н. Н. 2015. Индукция децидуальной дифференцировки в эндометриальных мезенхимных стволовых клетках. Цитология. 57 (12): 880—884. (Domnina A. P., Novikova P. V., Fridlyanskaya I. I., Shilina M. A., Zinin N. V., Nikolsky N. N. 2016. Induction of decidual differentiation in endometrial mesenchymal stem cells Cell Tissue Biol. (Tsitolgiya). 10 : 95. Doi: 10.1134/S1990519X16020048)

Домнина А. П., Фридлянская И. И., Земелько В. И., Пуговкина Н. А., Ковалева З. В., Зенин В. В., Гринчук Т. М., Никольский Н. Н. 2013. Мезенхимные стволовые клетки эндометрия человека при длительном культивировании не подвергаются спонтанной трансформации. Цитология. 55 (1) : 69—74. (Domnina A. P., Fridlianskaia I. I., Zemelko V. I., Pugovkina N. A., Kovaleva Z. V., Zenin V. V., Grinchuk T. M., Nikolsky N. N. 2013. Mesenchymal stem cells of human endometrium do not undergo spontaneous transformation during long-term cultivation. Cell Tissue Biol. (Tsitologiya). 55 : 69—74.)

Земелько В. И., Гринчук Т. М., Домнина А. П., Арцыбашева И. В., Зенин В. В., Кирсанов А. А., Бичевая Н. К., Корсак В. С., Никольский Н. Н. 2011. Мультипотентные мезенхимные стволовые клетки десквамированного эндометрия. Выделение, характеристика и использование в качестве фидерного слоя для культивирования эмбриональных стволовых линий человека. Цитология. 53 (12) : 919—929 (Zemelko V. I., Grinchuk T. M., Domnina A. P., Artzibasheva I. V., Zenin V. V., Kirsanov A. A., Bichevaya N. K., Korsak V. S., Nikolsky N. N. 2011. Multipotent mesenchymal stem cells of desquamated endometrium: isolation, characterization and use as feeder layer for maintenance of human embryonic stem cell lines. Cell Tissue Biol. (Tsitologiya). 53 : 919—929.)

Bockera L., Bogin V., Bockera1 O., Le T., Alekyan B., Woods E. J., Brown A. A., Ichim T. E., Pate A. N. 2013. Endometrial regenerative cells for treatment of heart failure: a new stem cell enters the clinic. J. Transl. Med. 56 : 507—527.

Dominina A. P., Novikova P. V., Lyublinskaya O. G., Zenin V. V., Fridlyanskaya I. I., Mikhailov V. M., Nikolsky N. N. 2016. Mesenchymal stem cells with irreversibly arrested proliferation stimulate decidua development in rats. Exp. Ther. Med. 12 : 2447—2454.

Domnina A. P., Zemelko V. I., Mikhailov V. M., Nikolsky N. N. 2013. Stimulation of decidua development by transplantation of endometrial stem cells. J. Biomed. Sci. Eng. 6 : 59—65.

Ho S. S., Murphy K. C., Binder B. Y., Vissers C. B., Leach J. K. 2016. Increased survival and function of mesenchymal stem cell spheroids entrapped in instructive alginate hydrogels. Stem Cells Transl. Med. 5 : 773—781.

Murphy K. C., Whitehead J., Falahee P. C., Zhou D., Simon S. I., Leach J. K. 2017. Multifactorial experimental design to optimize the anti-inflammatory and proangiogenic potential of mesenchymal stem cell spheroids. Stem Cells. 35 : 1493—1504.

Nagori C. B., Panchal S. Y., Patel H. 2011. Endometrial regeneration using autologous adult stem cells followed by conception by *in vitro* fertilization in a patient of severe Asherman's syndrome. J. Hum. Reprod. Sci. 4 : 43—48.

Prockop D. J. 2009. Repair of tissues by adult stem/progenitor cells (MSCs): controversies, myths, and changing paradigms. Mol. Ther. 17 : 939—946.

Santamaría X., Cabanilla S., Cervello I., Arbona C., Raga F., Ferro J., Palmero J., Remohí J., Pellicer A., Simón C. 2016. Autologous cell therapy with CD133+ bone marrow-derived stem cells for refractory Asherman's syndrome and endometrial atrophy: a pilot cohort study. Hum. Reprod. 31 : 1087—1096.

Singh N., Mohanty S., Seth T., Shankar M., Bhaskaran S., Dharmendra S. 2014. Autologous stem cell transplantation in refractory Asherman's syndrome: a novel cell based therapy. J. Hum. Reprod. Sci. 7 : 93—98.

Tan J., Li P., Wang Q., Li Y., Li X., Zhao D., Xu X., Kong L. 2016. Autologous menstrual blood-derived stromal cells transplantation for severe Asherman's syndrome. Hum. Reprod. 31 : 2723—2729.

Zhong Z., Patel A. N., Ichim T. E., Riordan N. H., Wang H., Min W. P., Woods E. J., Reid M., Mansilla E., Marin G. H., Drago H., Murphy M. P., Minev B. 2009. Feasibility investigation of allogeneic endometrial regenerative cells. J. Transl. Med. 7 : 15—21.

Поступила 4 VII 2018

PROPERTIES OF ENDOMETRIAL MESENCHYMAL STEM CELLS AFTER CULTIVATION IN SPHEROIDS

A. P. Domnina,* Yu. V. Obidina, N. N. Nikolsky

Institute of Cytology RAS, St. Petersburg, 194064;
* e-mail: aldomnina@mail.ru

Human endometrial mesenchymal stem cells (eMSC) were cultivated in 3-D (3D) culture (in spheroids). The properties of eMSC in spheroids evaluated in comparison with eMSC cultured in a monolayer (2D) by the expression of CD markers, the ability to differentiate into osteoblasts, adipocytes and decidual cells, by proliferative activity, replicative senescence and expression of anti-inflammatory genes (TSG-6, HGF, EP2). For restoration of endometrium function, eMSC in spheroids were transplanted into rats with Asherman's syndrome that is characterized by replacement of normal endometrium by connective tissue and decrease in fertility. Transplantation of eMSC in spheroids showed a greater therapeutic effect than transplantation of eMSC after cultivation in a monolayer by the frequency of pregnancy and the number of offspring in experimental animals.

Key words: endometrial mesenchymal stem cells, cell spheroids, Asherman's syndrome