

UDC 57.086.833.6

Возможность поддержания культуры мезенхимальных стволовых клеток за счет клеток со сниженной степенью адгезии

Н. С. Шувалова, О. А. Маслова, Е. М. Сухорада, О. Г. Дерябина, В. А. Кордюм

Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины
Ул. Академика Заболотного, 150, Киев, Украина, 03680

tiyena@yandex.ru

Цель. Использование классических методик для открепления мезенхимальных стволовых клеток (МСК) от субстрата приводит к изменению их свойств. В данном сообщении предложен простой и доступный способ сохранения популяции клеток, избежавших влияния на поверхностный аппарат. *Материалы и методы.* МСК из матрикса пупочного канатика человека получали и культивировали по стандартной методике. При замене культуральной среды на свежую порцию кондиционированную среду, в которой культура находилась в течение трех дней, предположительно содержащую спонтанно открепившиеся клетки, переносили в другой культуральный сосуд, добавляя сыворотку и ростовые факторы. *Результаты.* Через сутки после переноса кондиционированной среды на дне сосуда можно было обнаружить прикрепленные клетки типичной для МСК морфологии, имеющие степень экспрессии поверхностных маркеров и клоногенный потенциал, аналогичные таким культур, пересейанных по стандартной методике. *Выводы.* Дочерняя культура, полученная в результате сохранения клеток, спонтанно открепившихся в процессе замены культуральной среды, фактически, сохраняет свойства клеток исходного пассажа. Метод целесообразно применять дополнительно к стандартной методике пассирования. Это позволит постоянно иметь пул клеток, избежавших влияния классической процедуры пассирования на белки и гликопротеины поверхности клетки.

Ключевые слова: МСК, культивирование, клетки со сниженной степенью адгезии.

Введение. Мезенхимальные стволовые клетки (МСК) считают одним из самых перспективных инструментов для клеточной терапии. Однако их культивирование связано с еще не до конца преодоленными трудностями. Поэтому активно разрабатываются и совершенствуются способы их выделения из тканей, культивирования и пассирования, способствующие сохранению мультипотентности [1–3].

В тканях организма МСК находятся в сложной трехмерной системе, где их поверхностный аппарат приспособлен для получения и обработки сигналов извне. Внеклеточный матрикс и окружающие клетки создают уникальные физико-химические условия, определяющие поведение МСК [4, 5].

При культивировании в монослой клетки адаптируются к специфическим условиям, избавляются от централизованной регуляции со стороны нейро-иммуно-гуморальных факторов [6]. При пассировании культуры клетки принудительно открепляются от поверхности субстрата, на котором они росли. Для этого применяют растворы, содержащие протеолитические ферменты, бесферментные растворы и специальные механические приемы [2]. Среди ферментативных средств открепления клеток от субстрата наиболее распространенными и достаточно эффективными считаются растворы трипсина (0,25 %) и версена (0,02 %) [2]. Но во время такой процедуры белки и гликопротеины поверхности клеток неизбежно повреждаются. Использование же протеолитических ферментов и влияние меха-

нических манипуляций при пассировании приводит к потере клетками важных рецепторов хоуминга и молекул адгезии. Это, как известно, негативно сказывается на стволовом потенциале МСК [3–8]. С каждым пассажем клетки изменяют свои свойства, снижает степень мультипотентности и способность к эффективному хоумингу [9]. Поэтому предлагают различные варианты выращивания МСК без принудительного открепления, для чего применяют культуральные сосуды специальной формы, которые могут растягиваться и увеличивать площадь поверхности при разрастании клеточной массы [10, 11], а также культивирование в трехмерных условиях на различных носителях [12]. Такие способы эффективны, но требуют привлечения дополнительных технических возможностей, усложняющих работу и являющихся достаточно дорогими.

Цель данной работы состояла в оптимизации условий культивирования МСК для сохранения клеток, имеющих неповрежденный поверхностный аппарат и, соответственно, более близких по свойствам к клеткам первых пассажей, чем клетки, многократно прошедшие процедуру пассирования.

Материалы и методы. *Выделение клеток.* Пуповины, полученные при нормальных родах, представлены роддомом № 5 г. Киева. Клетки изолировали по комбинированной методике [13]. Пуповину выдерживали в растворе антибиотиков (смесь пенициллина («Артериум», Украина) и стрептомицина («Артериум») по 1 мг/мл) в течение 20 мин и промывали в PBS. Затем ее резали на фрагменты, из которых удаляли сосуды для избежания потенциальной контаминации популяции МСК клетками эндотелия. Полученные фрагменты промывали, механически измельчали и погружали в раствор ферментов (коллагеназа I типа («Sigma», США), 200 ед/мл, гиалуронидаза IV типа («Sigma»), 400 ед/мл) на 20–60 мин при температуре 37° С в зависимости от плотности матрикса. После инкубации фрагменты ткани переносили во флаконы с культуральной средой (DMEM с низким содержанием глюкозы («РАА», Австрия) и с добавлением пенициллина («Артериум») и стрептомицина («Артериум») по 100 мкг/мл, 2 мМ L-глутамин («Sigma»), 10 нМ FGF2 (Рефиброл, «ФармБиотек», США) и 10 %-й раствор эмбриональной телячьей сыворотки («РАА»)).

Раствор ферментов собирали и центрифугировали в течение 7 мин при 1000 об/мин. К полученному осадку добавляли PBS и снова центрифугировали в том же режиме. Полученный осадок вносили во флаконы с культуральной средой, описанной выше.

Через 1–3 сут на дне культурального сосуда можно было наблюдать прикрепленные фибробластоподобные клетки – единичные и клоны из 2–6 клеток. Через 2 дня после обнаружения клеток среду заменяли на свежую.

Культивирование. Культивирование проводили в CO₂-инкубаторе (37° С, 5 % CO₂). МСК культивировали в среде, описанной выше, в пластиковых флаконах площадью 25 и 75 см² («РАА»). На всех пассажах культивирования замену культуральной среды на свежую порцию производили каждые 3 дня.

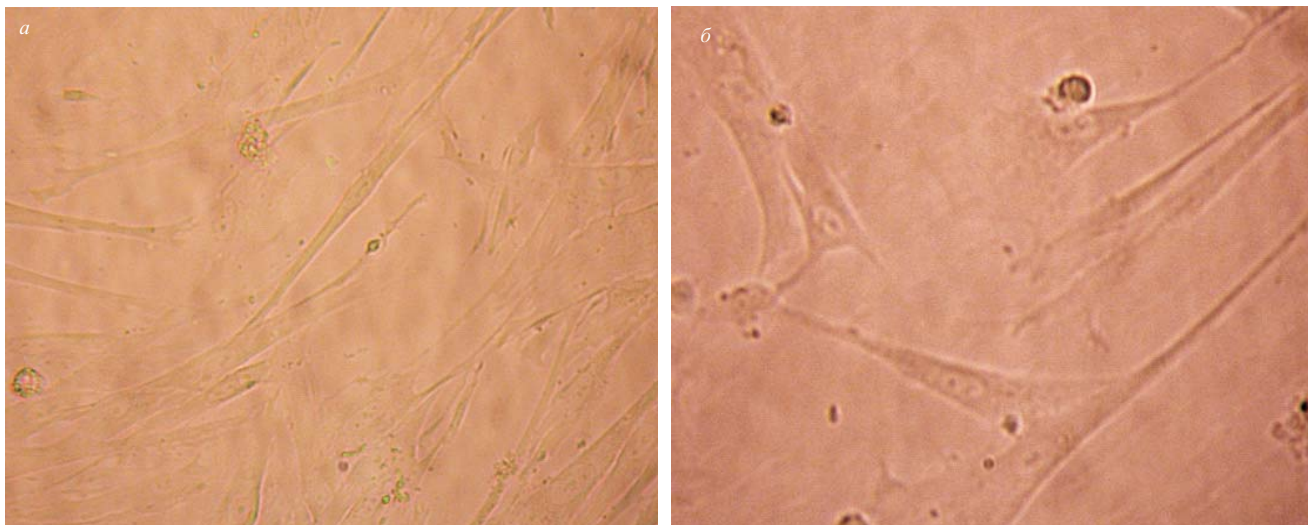
Клетки пассировали в присутствии смеси трипсина (0, 25 %) («РАА») и версена (0,02 %) в соотношении 1:1 до достижения культурой монослоя 70 % конfluenceности.

Оптимизация культивирования. При замене культуральной среды на свежую порцию кондиционированную среду собирали, переносили в другой флакон и добавляли эмбриональную телячью сыворотку (1 мл на 10 мл полученной среды) и FGF2 (из расчета 0,0025 мкг/мл).

Оценка состояния культуры. Морфологию клеток оценивали с использованием инвертированного микроскопа Leica DMIL. Снимки получены с помощью фотоаппарата Cannon PowerShot 640A.

Результаты и обсуждение. Известно, что в определенной фазу клеточного цикла, например, перед делением снижается степень адгезии клетки к субстрату [14].

Культура МСК (при обычном культивировании) является несинхронизированной. Соответственно фазы клеточного цикла проходят неодновременно, что приводит к риску потери части клеток при стандартном пассировании, когда среду, в которой клетки культивировали, удаляют из культурального сосуда. Согласно предложенной методике, при процедуре смены среды кондиционированную среду, в которой клетки находились ранее, переносят в другой культуральный сосуд. К такой среде добавляют порцию сыворотки и ростовых факторов.



Сравнение морфологии культур клеток (через 48 ч): *а* – клетки, прошедшие стандартную процедуру пассирования, 2-й пассаж; *б* – клетки, полученные в результате переноса среды, где их культивировали в течение 3 дней, в другой культуральный флакон, 1-й пассаж. МСК живые, неокрашенные; $\times 100$

На следующие сутки наблюдают прикрепление клеток, находившихся, очевидно, на момент пассирования в менее адгезированном состоянии. Для их концентрации полученную среду также можно центрифугировать, осаждая, таким образом, клетки и сразу помещая полученный осадок во флакон со средой, на которой в опыте ведут культуру.

Учитывая индивидуальные особенности культур, полученных от разных доноров, важно отметить, что на дне культурального флакона в среднем обнаруживаются 10–20 «точек прикрепления». Они могут содержать от 1 до 10 клеток. Такие клоны являются жизнеспособными и активно пролиферируют. Через 7–10 дней количество клеток возрастает в среднем в 3 раза. Через 2 недели после появления первых клеток клоны достигают такой численности и плотности расположения клеток, что их можно пассировать с помощью стандартных подходов.

Клетки, полученные методом сохранения кондиционированной среды, имеют типичную для МСК морфологию. С учетом различий в количестве клеток, полученных по методике, описанной выше, и клеток, пассированных по стандартным методикам с применением растворов трипсина (0,25 %) и версена (0,02 %), можно констатировать, что в целом клетки дочерней культуры сохраняют морфологию, характерную для клеток исходной культуры (рису-

нок, см. вклейку). Они также имеют степень экспрессии поверхностных маркеров, аналогичную культурам, пересейанным по стандартной методике (более 75 % популяции являются положительными по маркерам CD105, CD73, CD90).

Экспрессию поверхностных маркерных белков определяли с помощью окраски антителами с флуоресцентными метками («United States Biological», США) на проточном цитофлуориметре-сортере BD FACSAria (Институт генетической и регенеративной медицины НАМНУ) (данные не приведены).

Вред многократного принудительного открепления клеток от субстрата при ведении культуры по пассажам хорошо описан в работах [7–9, 15].

Предложенная нами методика использования кондиционированной среды дает возможность дополнительно сохранить определенное количество клеток и снизить степень негативного влияния на МСК.

Выводы. Главным преимуществом предложенного подхода является то, что культура, полученная посредством сохранения клеток, спонтанно открепившихся при замене культуральной среды, фактически сохраняет свойства клеток исходного пассажа. Поскольку в состоянии со сниженной степенью адгезии находится лишь часть популяции, описанный метод целесообразно применять дополнитель-

но к стандартной методике. Это позволит постоянно поддерживать популяцию клеток, избежавших влияния стандартной процедуры пассирования на белки и гликопротеины поверхностного аппарата.

N. S. Shuvalova, O. A. Maslova, O. M. Sukhorada, O. G. Deryabina, V. A. Kordium

Maintenance of mesenchymal stem cells culture due to the cells with reduced attachment rate

Institute of Molecular Biology and Genetics, NAS of Ukraine
150, Akademika Zabolotnoho Str., Kyiv, Ukraine, 03680

Aim. The classic detachment techniques lead to changes in cells properties. We offer a simple method of cultivating the population of cells that avoided an influence on the surface structures. **Methods.** Mesenchymal stem cells (MSC) from human umbilical cord matrix were obtained and cultivated in standard conditions. While substituting the culture media by a fresh portion, the conditioned culture medium, where the cells were maintained for three days, was transferred to other culture flasks with addition of serum and growth factors. **Results.** In the flasks, one day after medium transfer, we observed attached cells with typical MSC morphology. The cultures originated from these cells had the same rate of surface markers expression and clonogenic potential as those replated by standard methods. **Conclusions.** MSC culture, derived by preserving the cells with reduced attachment ability, actually has the properties of «parent» passage. Using this method with accepted techniques of cells reseeding would allow maintaining the cells that avoided an impact on the cell surface proteins.

Keywords: MSC, cultivation, cells with reduced attachment ability.

Н. С. Шувалова, О. О. Маслова, О. М. Сухорада, О. Г. Дерябина, В. А. Кордюм

Можливість підтримання культури мезенхімальних стовбурових клітин за рахунок клітин зі зниженим ступенем адгезії

Мета. Застосування класичних методик для відкріплення мезенхімальних стовбурових клітин (МСК) від субстрату призводить до змін їхніх властивостей. У даному повідомленні запропоновано простий і доступний спосіб збереження популяції клітин, що уникли впливів на поверхневий апарат. **Матеріали і методи.** МСК з матриксу пупкового канатика людини отримували і культивували за стандартною методикою. При заміні культурально-го середовища на свіжу порцію кондиціоноване середовище, у якому культури знаходилися впродовж трьох днів і яке потенційно містило спонтанно відкріплені клітини, переносили в інший культуральний посуд, додаючи сироватку та ростові фактори. **Результати.** Через добу після перенесення середовища на дні культурального посуду можна було спостерігати прикріплені клітини типової для МСК морфології, які мали ступінь експресії поверхневих маркерів та клоногенний потенціал, аналогічні таким у культур, пасованих за стандартною методикою. **Висновки.** До чірня культура, отримана внаслідок збереження клітин, які спонтанно відкріпились у процесі заміни культурального середовища, фактично, зберігає властивості клітин вихідного пасажу. Запропонований метод доцільно застосовувати додатково до стандартної методики пасування. Це дозволить постійно мати пул клітин, які уникли пошкоджуючих впливів на білки і глікопротеїни поверхні клітини.

Ключові слова: МСК, культивування, клітини зі зниженим ступенем адгезії.

REFERENCES

1. Nombela-Arrieta C., Ritz J., Silberstein L. The elusive nature and function of mesenchymal stem cells // Nat. Rev. Mol. Cell Biol.—2011.—**12**, N 2.—P. 126–131.
2. Heng B. C., Cowan C. M., Basu S. Comparison of enzymatic and non-enzymatic means of dissociating adherent monolayers of mesenchymal stem cells // Biol. Proced. Online.—2009.—**11**.—P. 161–169.
3. Rombouts W. J., Ploemacher R. E. Primary murine MSC show highly efficient homing to the bone marrow but lose homing ability following culture // Leukemia.—2003.—**17**, N 1.—P. 160–170.
4. Augello A., Kurth T. B., De Bari C. Mesenchymal stem cells: a perspective from *in vitro* cultures to *in vivo* migration and niches // Eur. Cell Mater.—2010.—**20**.—P. 121–133.
5. Reilly G. C., Engler A. J. Intrinsic extracellular matrix properties regulate stem cell differentiation // J. Biomech.—2010.—**43**, N 1.—P. 55–62.
6. Toyoda M., Takahashi H., Umezawa A. Ways for a mesenchymal stem cell to live on its own: maintaining an undifferentiated state *ex vivo* // Int. J. Hematol.—2007.—**86**, N 1.—P. 1–4.
7. Wagner W., Horn P., Castoldi M., Diehlmann A., Bork S., Saffrich R., Benes V., Blake J., Pfister S., Eckstein V., Ho A. D. Replicative senescence of mesenchymal stem cells: a continuous and organized process // PLoS One.—2008.—**3**, N 5.—e2213.
8. Angelucci S., Marchisio M., Di Giuseppe F., Pierdomenico L., Sulpizio M., Eleuterio E., Lanuti P., Sabatino G., Miscia S., Di Ilio C. Proteome analysis of human Wharton's jelly cells during *in vitro* expansion // Proteome Sci.—2010.—**8**.—P. 18.
9. Sarkar D., Spencer J. A., Phillips J. A., Zhao W., Schafer S., Spelke D. P., Mortensen L. J., Ruiz J. P., Vemula P. K., Sridharan R., Kumar S., Karnik R., Lin C. P., Karp J. M. Engineered cell homing // Blood.—2011.—**118**, N 25.—e184–191.
10. Majd H., Wipff P. J., Buscemi L., Bueno M., Vonwil D., Quinn T. M., Hinz B. A novel method of dynamic culture surface expansion improves mesenchymal stem cell proliferation and phenotype // Stem Cells.—2009.—**27**, N 1.—P. 200–209.
11. Majd H., Quinn T. M., Wipff P. J., Hinz B. Dynamic expansion culture for mesenchymal stem cells // Methods Mol. Biol.—2011.—**698**.—P. 175–188.
12. Witte H., Stubenrauch M., Frober U., Fischer R., Voges D., Hoffmann M. Integration of 3-D cell cultures in fluidic microsystems for biological screenings // Eng. Life Sci.—2011.—**11**, N 2.—P. 140–147.
13. Tong C. K., Vellasamy S., Tan B. C., Abdullah M., Vidyadaran S., Seow H. F., Ramasamy R. Generation of mesenchymal stem cell from human umbilical cord tissue using a combination enzymatic and mechanical disassociation method // Cell Biol. Int.—2011.—**35**, N 3.—P. 221–226.
14. Thery M., Bornens M. Cell shape and division // Curr. Opin. Cell Biol.—2006.—**18**, N 6.—P. 648–657.
15. Bruder S. P., Jaiswal N., Haynesworth S. E. Growth kinetics, self-renewal, and the osteogenic potential of purified human mesenchymal stem cells during extensive subcultivation and following cryopreservation // J. Cell. Biochem.—1997.—**64**, N 2.—P. 278–294.

Received 05.11.12