

УДК 611.018.46:57.086.835

Оптимизация стандартных протоколов субкультивирования мезенхимальных стволовых клеток первичной культуры костного мозга мышей

Садовников Ф.А.

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии».
125315, Москва, ул. Балтийская, д. 8

Особый интерес научного сообщества привлекает терапевтический и иммуномодулирующий потенциал мультипотентных мезенхимальных стволовых клетках (ММСК) костного мозга. В связи с этим поиск эффективной методики выращивания клеток данного типа является актуальной задачей для экспериментальной медицины.

Целью исследования стала оптимизация стандартных протоколов субкультивирования мышинных ММСК, получаемых из первичной культуры костного мозга.

Материалы и методы. Оценивался выход клеток при пассировании трипсином или аккутазой с помощью различных методик спустя 14 дней культивирования суспензий костного мозга мышей линии ICR в посевных концентрациях первичной культуры: 10, 15-20 и 30 млн клеток на 25 см².

Результаты. С помощью обработки в течение 15 мин 2 мл трипсина или 2 мл аккутазы удалось спассировать до 300 тыс адгезирующих и делящихся клеток при исходном посеве в 10 млн. По той же методике обработки удалось снять в 1,3–1,5 раза меньше клеток с посева в 15–20 млн за 15 мин и 30 млн клеток за 30 мин, а также культура значительно медленнее росла в 1-м пассаже

Заключение. Посевная плотность первичной культуры костного мозга в 10 млн клеток на 25 см² является оптимальной для получения адгезивной культуры мезенхимальных стволовых клеток мышей линии ICR. Субкультивирование с 2 мл трипсина или 2 мл аккутазы в течение 15 мин наиболее эффективно для получения первого пассажа.

Ключевые слова: костный мозг мыши; мезенхимальные стволовые клетки; протокол субкультивирования; оптимизация пассирования клеток.

Для цитирования: Садовников Ф.А. Оптимизация стандартных протоколов субкультивирования мезенхимальных стволовых клеток первичной культуры костного мозга мышей. *Патогенез.* 2023; 21(3): 58-61.

DOI: 10.25557/2310-0435.2023.03.58-61

Для корреспонденции: Садовников Фёдор Алексеевич, e-mail: fedor.sadovnikov.2000@yandex.ru

Финансирование. Работа выполнена в рамках государственного задания по теме: «Оценка адаптивных реакций организма на действие физико-химических и экологических факторов среды» (No FGFU-2022-0010).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Благодарность. Автор выражает благодарность сотрудникам лаборатории физико-химической и экологической патофизиологии ФГБНУ «НИИОПП» Карганову М.Ю. Алчиновой И.Б., Поляковой М.В. за огромную поддержку в реализации эксперимента.

Поступила: 17.07.2023.

Optimization of standard protocols for subculturing mesenchymal stem cells from primary mouse bone marrow culture

Sadovnikov F.A.

Institute of General Pathology and Pathophysiology,
Baltiyskaya Str. 8, Moscow 125315, Russian Federation

The therapeutic and immunomodulatory potential of bone marrow multipotent mesenchymal stem cells (BMSCs) attracts special interest of the scientific community. In this regard, the search for an effective cell culture technique is an urgent task for experimental medicine.

The aim of the study was to optimize the standard protocols for subculturing murine MMSCs obtained from primary bone marrow culture.

Methods. The cell yield was evaluated by trypsin and accutase passaging using different methods after 14 days of culturing bone marrow suspensions of ICR line mice in seed concentrations of primary culture: 10, 15-20, 30 million cells per 25 cm².

Results. With the help of treatment for 15 min with 2 ml of trypsin and 2 ml of accutase, it was possible to save up to 300 thousand adherent and dividing cells with an initial inoculation of 10 million. Using the same method, 30–35% fewer cells were removed from inoculation of treatment in 15–20 in 15 min and 30 million cells in 30 min.

Conclusion. Seeding density of primary bone marrow culture of 10 million cells per 25 cm² is optimal for obtaining an adherent culture of mesenchymal stem cells of mice of ICR line. Subculturing with 2 ml of trypsin and 2 ml of accutase for 15 min is most effective for obtaining the first passage.

Keywords: mouse bone marrow; mesenchymal stem cells; subculturing protocol; optimization of cell passaging.

For citation: Sadovnikov F.A. [Optimization of standard protocols for subculturing mesenchymal stem cells of primary culture of mouse bone marrow]. *Patogenesis [Pathogenesis]*. 2023; 21(3): 58-61. (in Russian)

DOI: 10.25557/2310-0435.2023.03.58-61

For correspondence: Sadovnikov Fedor Alekseevich, e-mail: fedor.sadovnikov.2000@yandex.ru

Funding. The work was carried out within the framework of the state assignment on the theme: "Assessment of adaptive reactions of the organism to the action of physicochemical and ecological environmental factors" (№ FGUF-2022-0010).

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

Acknowledgments. The author wants to express gratitude to colleagues at laboratory of physicochemical and environmental pathophysiology of Institute of General Pathology and Pathophysiology Karganov M.Yu., Alchinova I.B., Polyakova M.V. for vast support in the realization of the experiment.

Received: 17.07.2023.

Введение

Особый интерес научного сообщества привлекает терапевтический и иммуномодулирующий потенциал мультипотентных мезенхимальных стволовых клетках (ММСК) костного мозга [1, 2]. Культура показала эффективность в экспериментальной медицине при моделировании патологических процессов. Прделаны работы по изучению резистентности ММСК к сублетальным дозам гамма-радиации [3], репаративного потенциала при трансплантации клеток для лечения лучевой болезни [4], цирроза печени [5], ишемии сердца [6]. В связи с этим поиск эффективной методики выращивания данной культуры является, на сегодняшний день, актуальной задачей.

Первичная культура костного мозга мышей довольно гетерогенна. Она состоит из гемопоэтических и стромальных клеток-предшественников различной степени дифференцировки. ММСК являются редкой популяцией в костном мозге и составляют до 0,01% от всех ядродержащих клеток [7]. Низкая доля стволовых клеток затрудняет процесс получения культуры. Кроме того, выделение первичной культуры осложняется множеством других факторов, в том числе частой контаминацией вирусами и микоплазмой [8], экранированием субстратной поверхности не адгезивными гемопоэтическими клетками [9], условиями культивирования [10], контактными ингибированием клеток.

Целью исследования стала оптимизация стандартных протоколов субкультивирования мышинных ММСК, получаемых из первичной культуры костного мозга. Для достижения поставленной цели были поставлены следующие задачи:

- подобрать оптимальную посевную концентрацию клеток первичной культуры костного мозга мыши,
- подобрать наиболее эффективный способ открепления клеток в процессе пассирования с помощью диссоциирующих ферментных препаратов,
- оценить жизнеспособность и колониеобразующий потенциал клеток первого пассажа.

Материалы и методы исследования

В работе использовали костный мозг мышей линии ICR (CD1) в возрасте 2–3 месяца. Костный мозг осаждали из диафизов бедренных костей центрифугированием в течение 10 мин при 3500 g в 1 мл RPMI («ПанЭко», Россия) с 50 мкг пенициллин-стрептомицина («ПанЭко», Россия) при 4°C. Клетки ресуспендировали в питатель-

ной среде до посевной концентрации и вносили в культуральные флаконы 25 см² («Corning» США). В результате были сформированы суспензии в трех посевных плотностях: 10, 15-20 и 30 млн клеток на флакон. Выращивание первичной культуры и 1-го пассажа проводили в питательной среде RPMI, содержащей 10% фетальной бычьей сыворотки («ПанЭко», Россия), 4 Мм аланин-глутамин («ПанЭко», Россия), 50 мкг/мл пенициллин-стрептомицина, 2,5 мкг/мл амфотерицина В («ПанЭко», Россия), при 5% CO₂ и 37°C в CO₂-инкубаторе (N-BIOTEK, Корея) в течение 14 дней. Среду сменяли через 24 часа после засева, далее меняли каждые 48-72 часа.

В заключительный день культивирования после визуальной оценки клеток микроскопированием (СЕТІ, Бельгия, × 4) проводили диссоциацию субконфлюэнтного слоя с помощью двух ферментных препаратов: 0,25% трипсин и ЭДТА («ПанЭко», Россия); аккутазы («Accutase® solution, Sigma», США).

Применяли следующие методики пассирования:

- вносили 2 мл раствора трипсина, инкубировали при 37°C в течение 15–30 мин;
- вносили 2 мл раствора трипсина на 30 с, декантацией удаляли жидкость до объема в 500–750 мкл (состояние смачивания слоя клеток), инкубировали при 37°C в течение 15–30 мин;
- вносили 2 мл аккутазы, инкубировали при 37°C в течение 15–30 мин.

Ферменты инактивировали 1,5 мл питательной среды. Определяли количество клеток в камере Горяева с трипановым синим (табл. 1). Полученные клеточные суспензии рассеивали в новые флаконы. Способность к делению 1 пассажа клеток оценивали визуально микроскопированием (× 10) спустя 7 дней культивирования (рис. 1).

Результаты исследования

Важнейшим этапом для получения культуры клеток являлось определение оптимальной концентрации засева клеток на единицу площади культурального флакона, а также подбор методики пассирования с минимальной потерей жизнеспособности клеток (табл. 1).

С помощью обработки в течение 15 мин 2 мл трипсина или 2 мл аккутазы удалось спассировать до 300 тыс адгезирующих и делящихся клеток при исходном посеве в 10 млн, что является наилучшим из полученных результатов (рис. 1, а, г). По той же методике обработ-

Количество клеток, полученных в результате ферментативной диссоциации трипсином и аккутазой по трем методикам

Методики пассирования		Абсолютное количество клеток при посеве, млн		
		10	15–20	30
		Количество пассированных клеток, тыс.		
Трипсин	2 мл	324 (15)	< 205 (15)	< 100 (30)
	500–750 мкл	120 (15)	210 (30)	– (30)
Аккутаза 2 мл		285 (15)	200–250 (15)	< 200 (30)

Примечание: оценка количества клеток проводилась по 2–3 повторам измерений. В скобках указано время экспозиции культуры в ферменте (в мин). При плотности посева в 10 млн в течение 15 мин при объёме трипсина 500–750 мкл клетки мало диссоциируют в суспензию, поэтому при более высокой плотности клетки выдерживали в течение 30 мин.

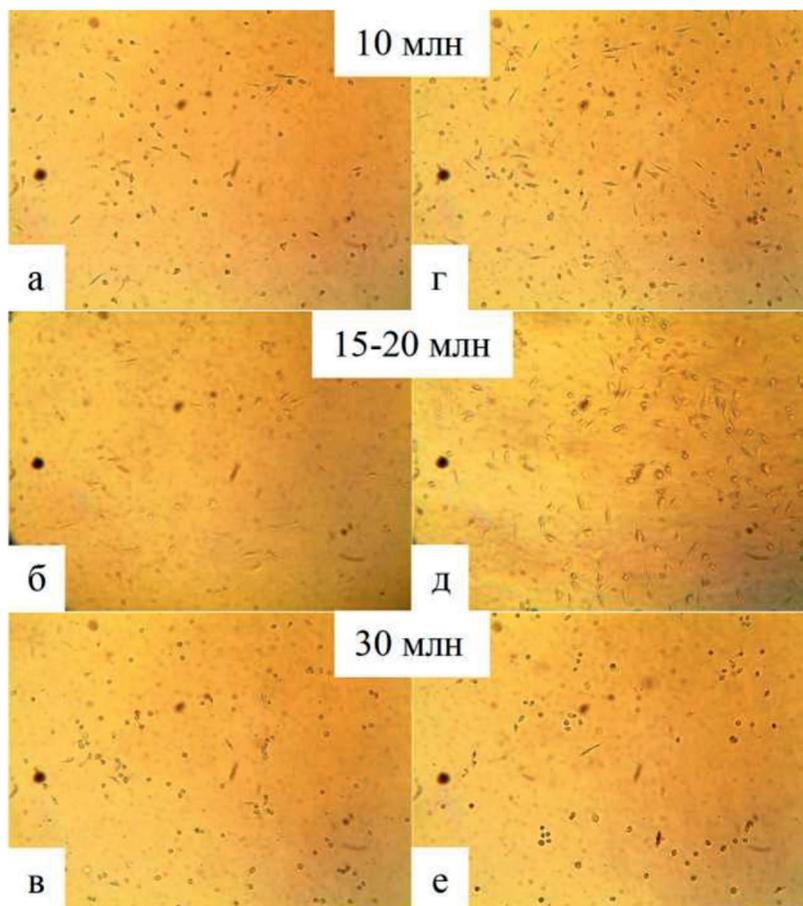


Рис. 1. Микрофотографии клеток после субкультивирования первичной культуры и получения 1-го пассажа на 1-й день (а, б, в) и на 7-й день (г, д, е), увеличение $\times 10$.

ки удалось снять в 1,3–1,5 раза меньше клеток с посева в 15–20 млн за 15 мин и 30 млн клеток за 30 мин, а также культура значительно медленнее росла в 1-м пассаже (рис. 1, б, д). Обработка трипсином в течение 30 мин в малых объёмах (500–750 мкл) оказалась неэффективной для работы с данным типом клеток. Культура не дала роста в 1-м пассаже (рис. 1, в, е).

Обсуждение

Так как селекция ММСК из первичной культуры происходит за счет способности повторно закреплять-

ся на субстрате и пролиферировать, оптимально осуществлять посев при невысокой концентрации первичной культуры (10 млн кл). Расширение временного интервала ферментативной обработки не давало значимого увеличения выхода клеток при пассировании в высокой плотности, так как ферменты снижали жизнеспособность быстро диссоциирующих клеток. Для пассирования первичной культуры клеток костного мозга мышей ICR недостаточно малого объема диссоциирующего агента (500–750 мкл), однако, возможно, с ростом номера пассажа клеточная культура станет более чувствительна к ферментам и время обработки можно будет сократить.

Заключение

Посевная плотность первичной культуры костного мозга в 10 млн клеток на 25 см² является оптимальной для получения адгезивной культуры мезенхимальных стволовых клеток мышей линии ICR. Субкультивирования в 2 мл трипсина или 2 мл аккумулята в течение 15 мин показали наибольшую эффективность при получении первого пассажа.

Список литературы

1. Афанасьева Ф.М., Ниаури Д.А., Виноградова Т.И., Коган И.Ю., Тапильская Н.И., Джемлиханова Л.Х., Рыжов Ю.Р., Гзгзян А.М. Применение мезенхимных стромальных клеток в комплексной терапии экспериментального туберкулеза половых органов. *Журнал акушерства и женских болезней*. 2022; 71(2): 29–38. DOI: 10.17816/JOWD84506
2. Ветoshкин К.А., Исаева Н.В., Минаева Н.В., Зорина Н.А., Бутолина М.А. *Опыт стандартизации получения препарата, содержащего мезенхимальные стволовые клетки, на основе иммунофенотипического анализа*. Клеточные технологии – практическому здравоохранению. Материалы VII Межрегиональной научно-практической конференции. 2018; 65–70. Режим доступа: <https://celltechnologies.ru/Konferenciya-2021/Konferenciya-2018> Дата обращения: 07.07.2023
3. Родина А.В., Семочкина Ю.П., Высоцкая О.В., Глухов А.И., Москалёва Е.Ю. Особенности действия γ -излучения на мезенхимальные стволовые клетки жировой ткани после длительного культивирования. *Радиационная биология. Радиоэкология*. 2019; 59(3): 243–254. DOI: 10.1134/S0869803119020127
4. Вялкина М.В., Алчинова И.Б., Яковенко Е.Н., Медведева Ю.С., Сабурова И.Н., Карганов М.Ю. Долговременные эффекты стволовых клеток на облученных мышях. *Биомедицина*. 2017; 4: 18–33.
5. Осипов Б.Б. Трансплантация мезенхимальных стволовых клеток в комбинации с озонотерапией в лечении экспериментального цирроза печени. *Вестник Витебского государственного медицинского университета*. 2018; 17(1): 81–90.
6. Комок В.В., Буненков Н.С., Белый С.А., Пизин В.М., Кондратьев В.М., Дулаев А.В., Лукашенко В.И., Кобак А.Е., Максимова Т.С., Сергиенко И.П., Парусова Е.В., Смирнова Л.А., Бабенко Е.В., Афанасьев Б.В., Немков А.С., Хубулава Г.Г. Оценка безопасности трансплантации аутологических мононуклеаров костного мозга в комбинированном лечении ишемической болезни сердца результаты рандомизированного, слепого, плацебо контролируемого исследования (TAMIS). *Вестник трансплантологии и искусственных органов*. 2019; 21(2): 112–120. DOI: 10.15825/1995-1191-2019-2-112-120
7. Miaohua Mo, Shan Wang, Ying Zhou, Hong Li, Yaojiong Wu. Mesenchymal stem cell subpopulations: phenotype, property and therapeutic potential. *Cell. Mol. Life Sci*. 2016; 73(17): 3311–3321. DOI: 10.1007/s00018-016-2229-7
8. Watanabe K., Otabe, K., Shimizu N., Komori K., Mizuno M., Katano H., Hideyuki K., Sekiya I. High-sensitivity virus and mycoplasma screening test reveals high prevalence of parvovirus B19 infection in human synovial tissues and bone marrow. *Stem Cell Res. Ther*. 2018; 9(1): 80. DOI: 10.1186/s13287-018-0811-7
9. Soleimani M., Nadri S. A protocol for isolation and culture of mesenchymal stem cells from mouse bone marrow. *Nat. Protoc*. 2009; 4(1): 102–106. DOI: 10.1038/nprot.2008.221
10. Плахотный М.А., Кодунов А.М., Горина Е.В., Бояринцев В.В., Трофименко А.В., Бирюков С.А., Фильков Г.И. Влияние условий культивирования мезенхимальных стволовых клеток на их жизнеспособность при трансплантации в субретинальное пространство. *Биофизика*. 2020; 65(6): 1126–1134. DOI: 10.31857/S0006302920060125

References

1. Afanasyeva F.M., Niauri D.A., Vinogradova T.I., Kogan I.Yu., Tapilskaya N.I., Dzhemlikhanova L.H., Ryzhov Yu. R., Gzgzian A. M. [Application of mesenchymal stromal cells in complex therapy of experimental genital tuberculosis.] *Zhurnal akusherstva i zhenskikh boleznei [Journal of Obstetrics and Women's Diseases]*. 2022; 71(2): 29–38. DOI: 10.17816/JOWD84506. (in Russian)
2. Vetoshkin K.A., Isaeva N.V., Minaeva N.V., Zorina N.A., Butolina M.A. [Experience of standardization of obtaining a preparation containing mesenchymal stem cells on the basis of immunophenotypic analysis]. In: Cellular technologies – practical health care. Materials of the VII Interregional Scientific and Practical Conference. 2018; 65–70. Available at: <https://celltechnologies.ru/Konferenciya-2021/Konferenciya-2018> Retrieved: 07/07/2023 2018; 65–70. (in Russian)
3. Rodina A.V., Semochkina Yu.P., Vysotskaya O.V., Glukhov A.I., Moskal'yova E.Yu. [Peculiarities of γ -radiation action on adipose tissue mesenchymal stem cells after long-term cultivation]. *Radiatsionnaya biologiya. Radioekologiya [Radiation biology. Radioecology]*. 2019; 59(3): 243–254. DOI: 10.1134/S0869803119020127. (in Russian)
4. Vyalkina M.V., Alchinova I.B., Yakovenko E.N., Medvedeva Yu.S., Saburina I.N., Karganov M.Yu. [Long-term effects of stem cells on irradiated mice]. *Biomeditsina [Journal Biomed]*. 2017; 4: 18–33. (in Russian)
5. Osipov B.B. [Transplantation of mesenchymal stem cells in combination with ozone therapy in the treatment of experimental liver cirrhosis]. *Vestnik Vitebskogo gosudarstvennogo meditsinskogo universiteta [Vitebsk Medical Journal]*. 2018; 17(1): 81–90. (in Russian)
6. Komok V.V., Bunenkov N.S., Bely S.A., Pizin V.M., Kondratyev V.M., Dulaev A.V., Lukashenko V.I., Kobak A.E., Maksimova T.S., Sergienko I.P., Parusova E.V., Smirnova L.A., Babenko E.V., Afanasyev B.V., Nemkov A.S., Khubulava G.G. [Safety assessment of autologous bone marrow mononuclear transplantation in combined treatment of ischemic heart disease results of randomized, blinded, placebo-controlled study (TAMIS)]. *Vestnik Transplantologii i Iskusstvennykh Organov [Russian Journal of Transplantation and Artificial Organs]*. 2019; 21(2): 112–120. DOI: 10.15825/1995-1191-2019-2-112-120. (in Russian)
7. Miaohua Mo, Shan Wang, Ying Zhou, Hong Li, Yaojiong Wu. Mesenchymal stem cell subpopulations: phenotype, property and therapeutic potential. *Cell. Mol. Life Sci*. 2016; 73(17): 3311–3321. DOI: 10.1007/s00018-016-2229-7
8. Watanabe K., Otabe, K., Shimizu N., Komori K., Mizuno M., Katano H., Hideyuki K., Sekiya I. High-sensitivity virus and mycoplasma screening test reveals high prevalence of parvovirus B19 infection in human synovial tissues and bone marrow. *Stem Cell Res. Ther*. 2018; 9(1): 80. DOI: 10.1186/s13287-018-0811-7
9. Soleimani M., Nadri S. A protocol for isolation and culture of mesenchymal stem cells from mouse bone marrow. *Nat. Protoc*. 2009; 4(1): 102–106. DOI: 10.1038/nprot.2008.221
10. Plakhotniy M.A., Kodunov A.M., Gorina E.V., Boyarintsev V.V., Trofimenko A.V., Biryukov S.A., Filkov G.I. [Influence of mesenchymal stem cells culture conditions on their viability when transplanted into the subretinal space]. *Biofizika [Biophysics]*. 2020; 65(6): 1126–1134. DOI: 10.31857/S0006302920060125. (in Russian)

Сведения об авторе:

Садовников Фёдор Алексеевич — младший научный сотрудник лаборатории физико-химической и экологической патофизиологии Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»; <https://orcid.org/0009-0006-9760-9964>