

Научно-методический материал «Методы выделения и культивирования мезенхимальных стволовых клеток».

Научно-методический материал по курсу «Методы выделения и культивирования мезенхимальных стволовых клеток человека» предназначен для студентов и аспирантов медико-биологических специальностей.

Данный научно-методический материал содержит базовые принципы работы с клеточными культурами МСК и протоколы получения и ведения первичных культур клеток, использующихся для исследования фундаментальных общебиологических вопросов (выяснение механизмов дифференцировки и пролиферации, а также старения и злокачественной трансформации) или в практических целях (тест-объекты при испытании новых фармакологических веществ, клеточная терапия). В данном научно-методическом материале собраны протоколы выделения и ведения культур мезенхимальных клеток костного мозга человека и мыши, мезенхимальных клеток плаценты, пуповины и пульпы молочного зуба человека.

Целью данного научно-методического материала является подготовка специалистов, владеющих базовыми методами работы с клеточными культурами МСК.

1. Базовые принципы работы с клеточными культурами.

1.1 Первичные культуры и клеточные линии.

Свежевыделенные культуры носят название первичных культур до начала субкультивирования. Клетки первичной культуры обычно гетерогенны и характеризуются малым пролиферативным пулом, но в них наиболее полно представлены типы клеток той ткани, откуда они были получены. Субкультивирование обеспечивает возможность продления существования культуры (в результате субкультивирования получают линии клеток), исследования и сохранения клеток, а также получения более однородных популяций. Главным преимуществом получения клеточных линий из первичных культур является наработка большого количества стабильного материала, пригодного для продолжительного использования.

На первом этапе получения первичной культуры происходит стерильное удаление фрагмента ткани животного и его механическая или ферментативная дезагрегация. Ткань может быть просто измельчена до кусочков объемом 1мм^3 , которые прикрепляются к поверхности чашки благодаря собственной адгезивности или специальному покрытию культуральной посуды (например, коллаген). В этих случаях будет происходить рост клеток из фрагментов, и клетки, мигрирующие из эксплантатов, могут использоваться для пассирования. Первичные культуры могут быть также получены путем дополнительной дезагрегации тканей ферментами, например трипсином или коллагеназой. Клетки образующейся при этом суспензии оседают, прикрепляются и распластываются на поверхности пластика. Такой способ получения культуры обеспечивает более высокий выход клеток, хотя он кажется более селективным, поскольку только определенные клетки переживают диссоциацию.

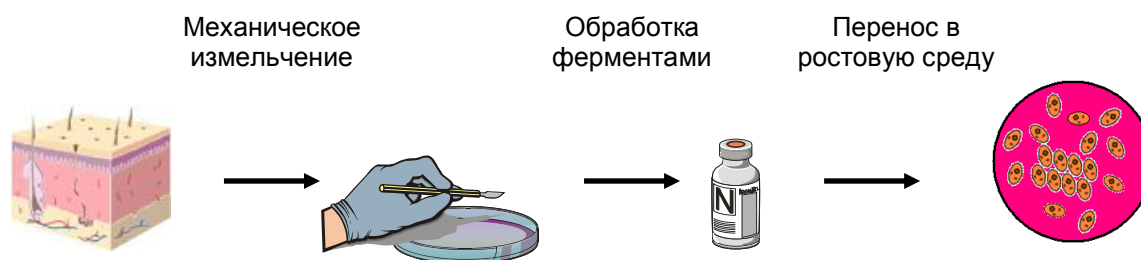


Схема получения первичной культуры клеток путем механической и ферментативной дезагрегации.

Большинство клеточных культур размножаются в форме монослоя, прикрепившись к стеклу или пластиковому субстрату. Некоторые культуры, главным образом трансформированные клетки, кроветворные клетки и асцитные опухоли, могут размножаться в суспензии.

Монослойная первичная культура может быть перенесена во второй культуральный сосуд после диссоциации клеток монослоя трипсином и разведения. В случае культивирования суспензионных культур достаточно только разведения. Диссоциация клеток монослойной культуры достигается лучше всего промыванием монослоя фосфатным буфером с ЭДТА (этилендиаминтетраацетатом) и последующей инкубацией с холодным раствором трипсина. После удаления трипсина клетки суспендируют в среде и засевают на новые флаконы. Трипсинизированные и перенесенные в новые сосуды клетки

становятся вторичной культурой, и по формальным признакам такая культура носит название линии клеток.

После нескольких пересевов линия клеток либо гибнет (ограниченная линия клеток), либо трансформируется и становится постоянной клеточной линией. К преимуществам постоянных линий клеток относятся их более высокая скорость роста, возможность достижения более высокой плотности, меньшая зависимость от сыворотки, возможность поддержания в более простых средах. К недостаткам этих линий относятся повышенная хромосомная нестабильность, отклонение от фенотипа донора и утрата специфических тканевых маркеров.

1.2 Культуральная посуда.

В настоящее время для культур тканей в основном используется пластмассовая посуда одноразового применения. Эти сосуды оптически прозрачны и подготовлены для использования в культивировании тканей путем модификации пластика, увеличивающей его смачиваемость и облегчающей прикрепление клеток. В качестве материала, из которого изготавливается культуральная посуда, почти повсеместное распространение получил полистирол, обработанный таким образом, чтобы придать поверхности отрицательный заряд. В особых случаях (культуры нейронов, мышечных клеток и некоторые культуры эпителиальных клеток) пластиковая посуда покрывается желатином, коллагеном или полилизинном для придания ей положительного заряда.

Культуральные сосуды варьируют по размеру от многолуночных пластинок Терраски (площадь поверхности 1 мм^3) до набора чашек и флаконов с площадью поверхности до 180 см^2 . Определяющим фактором при выборе культуральной посуды является требуемое количество клеток (максимальная плотность большинства трансформируемых культур $5 \cdot 10^4$ - 10^5 клеток/ см^2). В случае суспензионных культур главным определяющим фактором становится объем сосуда. При увеличении объема могут создаваться проблемы в перемешивании и аэрации культур.

1.3 Питательные среды для культивирования.

После извлечения клеток из ткани или из организма и помещения их в культуру питательная среда должна обеспечивать все внешние условия, которые клетки имели *in vivo*. Только в этом случае возможно выживание клеток, их пролиферация и дифференцировка.

Даже при кратковременном культивировании одним из главных условий сохранения жизнеспособности клеток является поддержание pH и осмотического давления. Эту функцию выполняет лежащая в основе питательной среды смесь солей, дополненная углеводом в качестве источника энергии – сбалансированный солевой раствор. В состав большинства сред входит раствор Эрла или раствор Хэнкса. Растворы Эрла и Хэнкса, а также фосфатно-солевой буфер Дульбекко и Фогта широко используются и самостоятельно для промывания клеток и приготовления растворов трипсина, ЭДТА и других веществ, вводимых в среду. В большинстве сред, как и в крови, в качестве главного компонента системы, поддерживающей pH, используется бикарбонатный буфер. Растворы с бикарбонатным буфером можно разделить на две группы. Одни, подобно раствору Хэнкса, содержат относительно малое количество бикарбоната и предназначены для поддержания pH в плотно закрытых сосудах; в других, так же как в растворе Хэнкса, значительно больше бикарбоната, они используются в системах с повышенным парциальным давлением углекислого газа (CO_2 -инкубатор), где поддерживается заданный уровень CO_2 (обычно 5-10%). Альтернативными буферами являются β -глицерофосфат и различные синтетические органические буферы, из которых наиболее широкое распространение получил HEPES. Добавляя к стандартным средам HEPES или другие вещества, надо учитывать их вклад в общую осмоляльность. Пределы pH и осмоляльности, в которых происходит размножение клеток, довольно узки и варьируют в зависимости от типа клеток. Оптимум pH для нетрансформированных клеток, как правило, слегка сдвинут в щелочную область по сравнению с клетками сопутствующих постоянных линий.

Внеклеточная среда должна обеспечивать клетки питательными и гормональными факторами, а также факторами стромы. Для удовлетворения уже известных потребностей клеток в питательных веществах созданы среды определенного химического состава, включающие компоненты, имеющие известную химическую структуру. Наиболее распространенными питательными средами являются среда Игла (MEM – minimal essential medium), среда Дульбекко (DMEM – Dullbecco's modified Eagle's medium) и среда RPMI-1640 (Roswell Park

Memorial Institute). Данные среды отличаются по набору и концентрации аминокислот, витаминов, углеводов, микроэлементов и других питательных веществ, и могут служить для подбора индивидуальных условий для клеток различного происхождения. Основой всех этих сред является раствор Эрла. Во все среды добавляется индикатор pH, например, феноловый красный.

Потребность клеток в факторах роста обычно удовлетворяют, добавляя в среды 5-20% сыворотки крови. Обычно для этих целей используют сыворотку крови эмбрионов крупного рогатого скота.

1.4 Стерильность при работе с культурами клеток.

В настоящее время для предотвращения бактериальной либо иной контаминации клеточных культур все работы с ними проводят в ламинарном боксе. Обычно используются ламинарные боксы II класса защиты, которые защищают как оператора, так и образец (Рис.2). Кроме того, для снижения опасности микробного заражения клеточных культур в среду для культивирования часто добавляют антибиотики. При получении первичных клеточных культур в среду для культивирования иногда добавляют и антимикотики, что позволяет уменьшить вероятность грибковой контаминации из исходной ткани.



Ламинарный бокс.



Работа в ламинарном боксе.

Необходимо периодически производить визуальную оценку микробного заражения культуры по быстрому изменению pH. Как правило, заражение сопровождается снижением pH, хотя некоторые грибы могут вызвать увеличение его увеличение. Заражение может также приводить к помутнению среды, появлению межклеточного гранулярного материала при микроскопическом

обследовании и к появлению взвеси неидентифицированного происхождения в среде. Заражение микоплазмой не выявляется невооруженным глазом и часто остается незамеченным. Микоплазму выявляют методом флуоресцентного окрашивания ДНК по методу Чена.

Для предотвращения перекрестного загрязнения культур не следует использовать одни и те же бутылки со средой и реагентами при работе с различными культурами клеток. Кроме того, пипетки, имевшие контакт с флаконами и бутылками, не следует повторно использовать для отбора среды из соответствующих емкостей.

2. Протоколы получения и ведения первичных клеточных культур.

2.1. Протокол получения культуры мезенхимальных клеток из костного мозга человека.

Данный протокол предназначен для выделения и культивирования мезенхимальных клеток из костного мозга человека. Протокол основан на экспериментах по оптимизации среды культивирования, обеспечивающей высокую скорость роста клеток и максимальный пролиферативный потенциал.

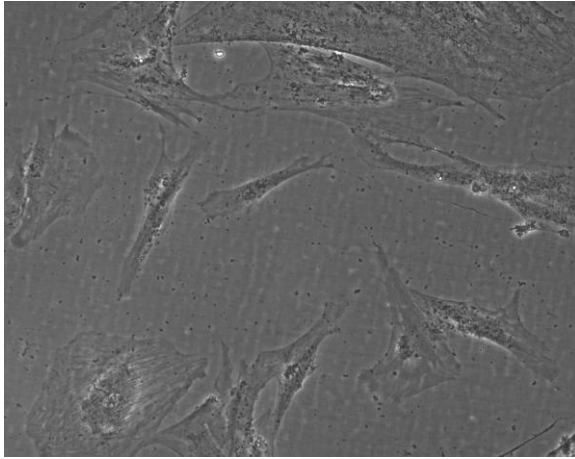
Протокол.

1. Аспират красного костного мозга человека, полученный в результате стерильной пункции, разделяют путем центрифугирования в градиенте фиколлаурографина.

2. Клетки мононуклеарной фракции рассеивают в концентрации 10^4 кл/мл в ростовой среде DMEM/F12 с добавлением 10% фетальной телячьей сыворотки, 100 Ед./мл пенициллина; 100 Ед./мл стрептомицина; 2 мМ глутамина; 1 мМ пирувата натрия.

3. Пассирование клеток *in vitro* осуществляют по стандартной методике в культуральных флаконах в CO₂-инкубаторе (37°C, 5 % CO₂, 80% влажности) со сменой ростовой среды каждые 3 дня.

4. При достижении монослоем 80 %-ой конfluenceности, клетки переводят в суспензию с использованием смеси 0.25%-го раствора трипсина с раствором Версена (1:1) и рассеивают в соотношении 1:3.



Первичная культура мезенхимальных клеток костного мозга человека.

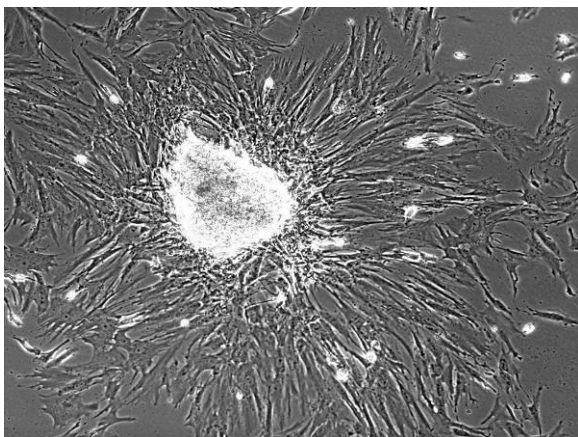
2.2. Протокол получения культуры мезенхимальных клеток из плаценты человека.

Данный протокол предназначен для выделения и культивирования мезенхимальных клеток из плаценты человека. Протокол основан на экспериментах по оптимизации среды культивирования, обеспечивающей высокую скорость роста клеток и максимальный пролиферативный потенциал.

Протокол.

1. Ткани амниона плаценты человека после нормальных родов на 39-40 неделе гестации промывают раствором Хенкса, измельчают и затем инкубируют в 0.1% растворе коллагеназы I-го типа в течение 30 мин при 37°C.
2. Полученную клеточную суспензию осаждают центрифугированием 1000 об/мин 5мин.
3. Осадок ресуспендируют в ростовой среде DMEM/F12 с добавлением 10% фетальной телячьей сыворотки, 100 Ед./мл пенициллина; 100 Ед./мл стрептомицина; 2 мМ глутамина; 1 мМ пирувата натрия и помещают в культуральные флаконы.
4. Пассирование клеток *in vitro* осуществляют по стандартной методике в CO₂-инкубаторе (37°C, 5% CO₂, 80% влажности) со сменой ростовой среды каждые 3 дня.

5. При достижении монослоем 80%-ой конфлюэнтности, клетки переводят в суспензию с использованием смеси 0.25%-го раствора трипсина с раствором Версена (1:1) и рассеивают в соотношении 1:3.



Первичная культура мезенхимальных клеток из плаценты человека.

2.3. Протокол получения культуры мезенхимальных клеток из пуповины человека.

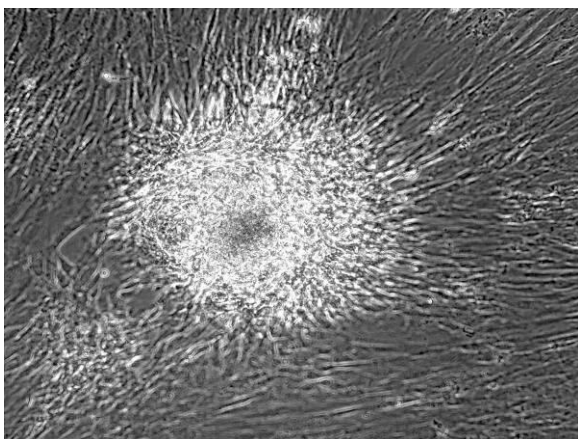
Данный протокол предназначен для выделения и культивирования мезенхимальных клеток из пуповины человека. Протокол основан на экспериментах по оптимизации среды культивирования, обеспечивающей высокую скорость роста клеток и максимальный пролиферативный потенциал.

Протокол.

1. Ткани пуповины человека после нормальных родов на 39-40 неделе гестации промывают раствором Хенкса, измельчают и затем инкубируют в 0.1% растворе коллагеназы I-го типа в течение 30 мин при 37°C.
2. Полученную клеточную суспензию осаждают центрифугированием 1000 об/мин 5мин.
3. Осадок ресуспендируют в ростовой среде DMEM/F12 с добавлением 10% фетальной телячей сыворотки, 100 Ед./мл пенициллина; 100 Ед./мл стрептомицина; 2 мМ глутамина; 1 мМ пирувата натрия и помещают в культуральные флаконы.

4. Пассирование клеток *in vitro* осуществляют по стандартной методике в CO₂-инкубаторе (37°C, 5% CO₂, 80% влажности) со сменой ростовой среды каждые 3 дня.

5. При достижении монослоем 80%-ой конфлюэнтности, клетки переводят в суспензию с использованием смеси 0.25%-го раствора трипсина с раствором Версена (1:1) и рассеивают в соотношении 1:3.



Первичная культура мезенхимальных клеток из пуповины человека.

2.4. Протокол получения культуры мезенхимальных клеток из пульпы молочного зуба человека.

Данный протокол предназначен для выделения и культивирования мезенхимальных клеток из пульпы молочного зуба человека. Протокол основан на экспериментах по оптимизации среды культивирования, обеспечивающей высокую скорость роста клеток и максимальный пролиферативный потенциал.

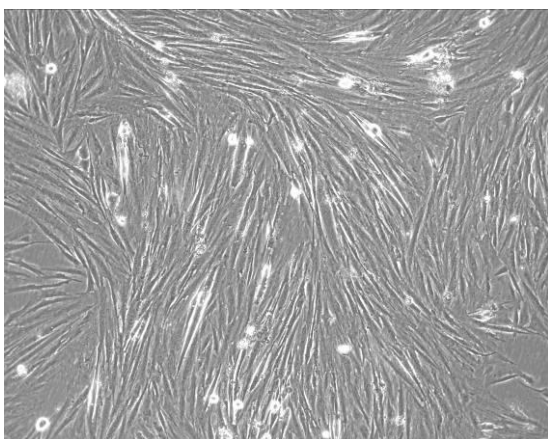
Протокол.

1. Молочные зубы детей получают в результате естественного выпадения.
2. После вскрытия коронки пульпу извлекают, измельчают, а затем инкубируют в 0.1% растворе коллагеназы I-го типа в течение 30 мин при 37°C.
3. Полученную клеточную суспензию осаждают центрифугированием 1000 об/мин 5мин.
4. Осадок ресуспендируют в ростовой среде DMEM/F12 с добавлением 10% фетальной телячей сыворотки, 100 Ед./мл пенициллина; 100 Ед./мл

стрептомицина; 2 мМ глутамин; 1 мМ пирувата натрия и помещают в культуральные флаконы.

5. Пассирование клеток *in vitro* осуществляют по стандартной методике в CO₂-инкубаторе (37°C, 5% CO₂, 80% влажности) со сменой ростовой среды каждые 3 дня.

6. При достижении монослоем 80%-ой конфлюэнтности, клетки переводят в суспензию с использованием смеси 0.25%-го раствора трипсина с раствором Версена (1:1) и засеивают в соотношении 1:3.



Первичная культура мезенхимальных клеток из пульпы молочного зуба человека.

2.5. Протокол получения культуры мезенхимальных клеток из костного мозга мыши.

Данный протокол предназначен для получения мезенхимальных клеток из костного мозга мышей. Протокол основан на экспериментах по оптимизации среды культивирования, обеспечивающей высокую скорость роста клеток и максимальный пролиферативный потенциал. Протокол предусматривает культивирование мезенхимальных клеток при атмосферном содержании кислорода. Культивирование мезенхимальных клеток при пониженном (3%) содержании кислорода может увеличить скорость роста и пролиферативный потенциал клеток.

Первые прикрепляющиеся фибробластоподобные клетки появляются на 3 день культивирования и располагаются индивидуально или образуют группы из нескольких клеток. К 5 дню культивирования в культуре костномозговых клеток обнаруживается значительное количество митозов. Клетки интенсивно делятся в

течении трех пассажей. Однако к четвертому пассажиру в культуре костномозговых клеток количество митозов уменьшается, и скорость пролиферации клеток замедляется. Добавление к среде базального фактора роста фибробластов (bFGF) до концентрации 10 нг/мл позволяет восстановить динамику роста клеток.

Протокол.

1. Самцов 8-10 недельного возраста убивают разрушением шейного отдела спинного мозга. Извлекают бедренные и большие берцовые кости, освобождают их от мягких тканей. Эпифизы полученных костей отделяют.

2. Диафизы бедренных и больших берцовых костей промывают средой DMEM, содержащей 15% фетальной сыворотки крупного рогатого скота (КРС), 100 ед./мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина, 12 мМ L-глутамин (ростовая среда).

3. Выделенные из диафизов костей клетки помещают в конические пробирки, содержащие 5 мл ростовой среды, и центрифугируют 10 мин при 400g. Надосадочную жидкость удаляют.

4. Осадок из каждой пробирки ресуспендируют в ростовой среде до концентрации 1×10^6 кл/мл. Полученные клетки высаживают на 25-см² культуральные флаконы по 5 мл суспензии на флакон. Культивирование проводят в CO₂-инкубаторе при 5% CO₂ и температуре 37°C.

5. Через 48 часов не прикрепившиеся клетки удаляют, а во флаконы добавляют 7 мл свежей ростовой среды.

6. Прикрепившиеся клетки культивируют в течение 2 недель, меняя ростовую среду каждые 3-4 дня.

7. При достижении монослоя клетки промывают 2 раза 0,25% раствором трипсина в смеси с раствором Версена в соотношении 1:1. Затем во флакон добавляют 2 мл вышеуказанной смеси и инкубируют при 37°C 5-10 мин. Клетки переводят в суспензию встряхиванием.

8. Полученную суспензию клеток осаждают центрифугированием при 400g в течение 5 мин. Осадок ресуспендируют в ростовой среде с концентрацией 10^4 кл/мл. Полученные клетки высаживают на 25-см² культуральные флаконы по 5 мл суспензии на флакон. Культивирование проводят до достижения клетками конfluence.

9. После четвертого пассажа к ростовой среде добавляют фактор роста фибробластов (bFGF) до концентрации 10 нг/мл.

2.6. Протокол криоконсервации клеточного материала.

Протокол основан на экспериментах по оптимизации среды для криоконсервирования, концентрации криопротектора и режима охлаждения клеток различного происхождения. Применение криопротекторов позволяет снизить повреждающее действие физико-химических факторов при криоконсервировании. Экспериментальные данные показали, что криопротектор ДМСО (диметилсульфоксид) обеспечивает не только более высокую жизнеспособность клеток, но также и сохранение их морфофункциональных свойств.

При замораживании клеточной суспензии необходимо обеспечить скорость понижения температуры около 1°C в минуту. Для этой цели используют программируемые замораживатели или специальные контейнеры, например Mr.Frosty (Nalgene, США), которые при помещении в низкотемпературный холодильник (-80°C) обеспечивают необходимую скорость замораживания. При отсутствии подобных приспособлений в качестве контейнеров можно использовать небольшие пенопластовые коробки с крышкой.

Немаловажную роль играет плотность замораживаемой клеточной суспензии. Оптимальные результаты восстановления были получены при замораживании клеточной суспензии плотностью $1 \cdot 10^6$ - $5 \cdot 10^6$ клеток в 1 мл. Для криоконсервирования отбирают клетки в экспоненциальной фазе роста. Жизнеспособность клеток в суспензии зависит от скорости отогрева – при ее увеличении количество выживших клеток в суспензии возрастает. Размораживание в водяной бане при температуре 40 - 41°C является наиболее распространенным. Исследования особенностей восстановительных процессов в клетках показали, что при отогреве лучше восстанавливаются клетки, помещаемые в кондиционированную среду. Кондиционированную среду собирают с культур клеток на 3-4 сутки после их посева, отфильтровывают через фильтр с диаметром пор $0,22$ - $0,45$ мкм и хранят при -20°C .

Протокол.

1. Культуры клеток переводят в суспензию путем инкубации в смеси 0.25% -го раствора трипсина с раствором Версена (1:1) в течение 5-10 мин. при 37°C .
2. Клетки осаждают центрифугированием 100 об/мин 5 мин.

3. Осадок ресуспендируют в питательной среде, содержащей 50% сыворотки новорожденных телят, из расчёта 1 млн. клеток на 0,5 мл среды.
4. К полученной суспензии добавляют 20%-ный раствор ДМСО по каплям, постоянно перемешивая суспензию клеток, доводя содержание криопротектора до 10% в течение 5-7 мин.
5. Полученную суспензию разливают в криопробирки объёмом 1 см³ и помещают в программный замораживатель или контейнер для криоконсервации, который затем помещают в низкотемпературный холодильник при -70°C.
6. После замораживания в течение суток криопробирки переносят в жидкий азот.
7. Отогрев замороженных образцов производят в водяных банях при температуре 40-41°C в течение 0,5-1 мин.
8. После размораживания клетки переносят в центрифужные пробирки, с ростовой средой, разбавляя суспензию клеток в 5-10 раз.
9. Суспензию клеток выдерживают при комнатной температуре в течение 10 мин, затем пробирки центрифугируют 5 мин при 1000 об/мин.
10. Супернатант удаляют, а к осадку клеток добавляют свежую или кондиционированную среду.