

OKREŚLENIE WPLYWU WARUNKÓW HODOWLI *IN VITRO* NA JAKOŚĆ ŚWIŃSKICH KOMÓREK MSC IZOLOWANYCH ZE SZPIKU KOSTNEGO

Joanna Romanek, Joanna Jurkiewicz

Instytut Zootechniki Państwowy Instytut Badawczy, Zakład Biotechnologii Rozrodu
i Kriokonserwacji, 32-083 Balice k. Krakowa
E-mail: joanna.romanek@iz.edu.pl

ORCID Joanna Romanek: <https://orcid.org/0000-0001-9068-4300>

Niniejsza praca naukowa uzyskała finansowanie ze środków zadań badawczych nr 01-19-11-21 realizowanych w Instytucie Zootechniki Państwowym Instytucie Badawczym (IZ-PIB).

Abstrakt

Hodowla in vitro komórek macierzystych umożliwia prowadzenie badań w ściśle określonych warunkach, które można w sposób dowolny modyfikować. Warunki te obejmują: dobór odpowiedniego podłoża hodowlanego, pożywki hodowlanej, zastosowanie atmosfery z wysoką zawartością CO₂, a także ustalenie odpowiedniej temperatury. W niniejszym artykule przedstawiono wyniki oceny jakości świńskich komórek macierzystych wyizolowanych ze szpiku kostnego poddanych hodowli in vitro w pożywkach hodowlanych o różnym składzie oraz hodowanych w 37°C oraz 39°C. Ocena wpływu różnych wariantów hodowli prowadzona w 7. dniu hodowli wykazała, że najwyższą konfluencją (na poziomie 90%) i prawidłową morfologią charakteryzowały się komórki hodowane w temperaturze 39°C oraz w mieszaninie składającej się z pożywek Dulbecco's Modified Eagle's Medium – niska zawartość glukozy oraz Dulbecco's Modified Eagle's Medium/Nutrient Mixture F-12 Ham w stosunku 1:1 z dodatkiem 10 ng fibroblastycznego czynnika wzrostu (Fgf). Dodatkowo wykazano, że komórki hodowane w wyżej wymienionej pożywce charakteryzowały się najwyższym odsetkiem komórek żywych oraz niskim odsetkiem komórek późnoapoptotycznych i nekrotycznych niezależnie od zastosowanych warunków termicznych hodowli.

Słowa kluczowe: MSC, aneksyna V, fosfatydyloseryny, apoptoza, świnia

Wstęp

Możliwość zachowania optymalnych warunków prowadzenia hodowli *in vitro* komórek macierzystych jest kluczowym czynnikiem wpływającym na ich jakość. Warunki te można modyfikować poprzez dobór odpowiedniego podłoża hodowlanego, pożywki hodowlanej, zastosowanie atmosfery z różną zawartością CO₂, a także zmianę temperatury hodowli. Przy wyborze odpowiedniej pożywki hodowlanej należy przede wszystkim wziąć pod uwagę stężenie glukozy oraz L-glutaminę. Glukoza jest najczęściej stosowanym źródłem węgla dla komórek zwierzęcych

w hodowli *in vitro*. L-glutamina wykorzystywana jest przez komórki jako źródło azotu między innymi do biosyntezy nukleotydów. Związki te są najważniejszymi składnikami, z których komórka na drodze przemian metabolicznych wytwarza energię komórkową (ATP) niezbędną do jej wzrostu i rozwoju (Salehinejad i in., 2012). Kolejnym ważnym czynnikiem wpływającym na jakość komórek jest temperatura hodowli. W wielu doniesieniach naukowych w hodowlach *in vitro* świńskich komórek stosowana jest temperatura 37°C (Kokubun i in., 2013; Zhang i in., 2024), wiadomo natomiast, że temperatura ciała świń oscyluje w okolicach 39°C. Można zatem wywnioskować, że temperatura bliższa ciepłocie ciała konkretnego gatunku zwierzęcia będzie bardziej zbliżona do tej optymalnej dla wzrostu i rozwoju komórek w warunkach *in vitro*. Dodatkowo w literaturze dostępne są opisy badań, w których komórki świni poddawano hodowli *in vitro* w tej właśnie temperaturze (Romanek i in., 2018). Ze względu na ten fakt przeprowadzono analizy mające na celu ocenę wpływu dwóch temperatur hodowli (37°C i 39°C) na jakość świńskich komórek.

Mezenchymalne komórki macierzyste (ang. mesenchymal stem cells MSCs) cechuje zdolność do różnicowania się w kierunku tkanek wywodzących się z mezodermy takich jak: tkanka kostnotwórcza (osteoblasty), chrzęstna (chondrocyty) i tłuszczowa (adipocyty). Ponadto, ze względu na ich łatwą izolację, wysoką ekspansję, niską immunogenność, podatność na modyfikacje genetyczne oraz multipotentny charakter komórki te są wykorzystywane w wielu terapiach komórkowych (Almalki i in., 2017). W przypadku zapalenia wymienia u krów mlecznych i kóz skutecznym sposobem na zmniejszenie stanu zapalnego jest podawanie MSCs drogą dożylną lub domięśniową (Ghai i in., 2022; Peralta i in., 2020; Costa i in., 2019). Opublikowane badania wykazały pozytywny wpływ na regenerację kości przy braku powikłań po zastosowaniu terapii z wykorzystaniem komórek MSCs u owiec, kóz (Elkhenany i in. 2014), świni (Wilson i in., 2010) oraz koni (McDuffee i in., 2014; Seo i in., 2014). Iniekcja komórek spowodowała znaczące zmniejszenie kulawizny, bólu w uszkodzonych stawach i obrzęków u zwierząt doświadczalnych (Pacini i in., 2007; Heinola i in., 2013). Podsumowując, zastosowanie iniekcji z zarówno autologicznych, jak i allogenicznych komórek MSCs u badanych gatunków zwierząt jest bezpieczne i nie powoduje skutków ubocznych (Renzi i in., 2013; Pacini i in., 2007; Elkhenany i in., 2014; Caminal i in., 2014).

Jednym ze sposobów poprawy efektywności produkcji zarodków *in vitro* jest zastosowanie współhodowli z innymi komórkami (tzw. monowarstwy odżywcze) lub hodowli zarodków w pożywkach warunkowanych aktywnością wydzielniczą komórek (tzw. pożywki kondycjonowane). Wszystkie czynniki wydzielnicze wytwarzane przez MSCs, takie jak hematopoetyczne i niehematopoetyczne czynniki wzrostu, a także wydzielające interleukiny i chemokiny, mogą korzystnie wpływać na stopień totipotencji lub pluripotencji w rozwijających się zarodkach (Romanek i in., 2018; Opiela i in., 2020).

W celu określenia wpływu warunków hodowli *in vitro* na jakość świńskich komórek macierzystych pozyskanych ze szpiku kostnego przeprowadzono analizę zmian apoptotycznych w komórkach. Apoptoza jest zjawiskiem fizjologicznym istotnym w prawidłowym funkcjonowaniu organizmu zarówno na etapie embrionalnym jak i w późniejszym okresie (Gala i in., 2009). Dwie najlepiej poznane ścieżki to szlak zewnętrzny (receptorowy), związany z błoną komórkową, oraz wewnętrzny przebiegający z udziałem mitochondrium. Elementem łączącym wszystkie te szlaki są kaspazy, które w zależności od etapu apoptozy, w którym biorą udział, dzielimy na inicjatorowe oraz wykonawcze (Stępień i in., 2007). Cechą charakterystyczną procesu apoptozy są zmiany zachodzące w budowie błony komórkowej. Dochodzi wówczas do zaburzenia asymetrii w rozmieszczeniu fosfolipidów błonowych. Utrzymywanie składu lipidów w błonie komórkowej jest ważne dla struktury i funkcji komórki. W warstwie wewnętrznej błony komórkowej występuje

podwyższona zawartość fosfatydyloseryny posiadającej ładunek ujemny. Asymetryczna lokalizacja aminofosfolipidów jest utrzymana dzięki aktywności ATP-zależnej translokazy zwanej flipazą, która wpompowuje je do wewnętrznej warstwy błony, a inne lipidy do zewnętrznej. Aktywacja kaspaz doprowadza do zakłócenia tego procesu, powodując zablokowanie funkcji flipazy i następuje wyrównanie lipidów wewnętrznej i zewnętrznej warstwy błony komórkowej i pojawienia się PS na powierzchni błony komórek apoptotycznych. Sygnał apoptotyczny powoduje translokację fosfatydyloseryny (Kiliańska, 2002). Ekspozycję fosfatydyloseryny na powierzchni komórki wykorzystuje się do znakowania komórek apoptotycznych za pośrednictwem aneksyny V, która ma zdolność do preferencyjnego wiązania się z ujemnie naładowanymi fosfolipidami, takimi jak fosfatydyloseryna (Iaccarino i in., 2011).

Material i metody

W przeprowadzonych doświadczeniach dawczyniami szpiku kostnego były loszki rasy polskiej białej zwisłouchej (pbz – ang. Polish Landrace) o masie nieprzekraczającej 40 kg. Szpik kostny czerwony z kręgosłupa stanowił rezerwuar, z którego wyizolowano *post mortem* szpikopochodne mezenchymalne komórki macierzyste (MSCs). Materiał pozyskano w Zakładzie Doświadczalnym Instytutu Zootechniki PIB Chorzelów sp. z.o.o. Szpik kostny po pobraniu rozcieńczono w zbuforowanym roztworze soli fizjologicznej (PBS – ang. phosphate buffered saline) pozbawionym jonów wapnia i magnezu (Biomed, Lublin, Polska), uzupełnionym 2% cielęcą surowicą płodową (FCS – ang. fetal calf serum) w stosunku 1:1. Mieszaninę tę nawarstwiono na roztwór fikolu (Ficoll–Paque Plus, Stem Cell Technologies, Canada) w celu izolacji frakcji mezenchymalnych komórek macierzystych (hematopoetycznych i niehematopoetycznych) i wirowano przez pół godziny przy parametrach 500 g. Komórki pozyskane z interfazy dwukrotnie przepłukiwano w roztworze PBS (Opieła i in., 2016), a następnie zawieszono o koncentracji 50000 komórek/cm² w odpowiedniej pożywce. Hodowlę komórek prowadzono w inkubatorze w temp. 37°C lub 39°C, w atmosferze zawierającej 5% CO₂, przy maksymalnej wilgotności. Zmianę pożywki przeprowadzano co 3 dni. Hodowlę prowadzono przez 10 dni. W celu oderwania komórek od podłoża poddano je trypsynizacji, dodając 1 ml roztworu 0,25% trypsyny z 0,01% EDTA i inkubowano 5 minut w temp. 39°C. Trypsynę inaktywowano poprzez dodanie 1ml FCS. Następnie komórki poddawano wirowaniu (5 minut, 500 g) oraz zawieszono w płynie PBS i przeprowadzono detekcję fosfatydyloseryny na pomocą cytometru przepływowego.

Wprowadzone hodowle pierwotne i linie komórek MSCs, posiadające zdolność do samoodnawiania subpopulacji komórkowych w warunkach pozaustrojowych, poddane zostały weryfikacji immunofluorescencyjnej w kierunku potwierdzenia mezenchymalnego charakteru macierzystego pod kątem identyfikacji immunofenotypu obejmującego właściwy zakres ekspresji markerów powierzchniowych (transbłonowych i błonowych z rodziny kompleksów różnicowania – CD; ang. clusters of differentiation). Weryfikowano również zdolność komórek MSCs do różnicowania w warunkach *in vitro*. W tym celu przeprowadzono identyfikację klasycznych ścieżek cytodyferencjacji w kierunku osteoblastów/osteocytów, chondroblastów/chondrocytów i adipocytów. Jedynie komórki CD44-, CD90- oraz CD105-pozytywne i jednocześnie CD14- oraz CD45-negatywne zostały wykorzystane do badań.

Zastosowane pożywki bazowe:

1. DMEM z niską zawartością glukozy (ang. Dulbecco's Modified Eagle's Medium – low glucose, D5546), Merck Life Science sp. z o.o., Poznań, Polska
2. Mieszanina pożywek 1 i 3 (DMEM z niską zawartością glukozy oraz DMEM/F12) w stosunku 1:1
3. DMEM/F12 (ang. Dulbecco's Modified Eagle's Medium/Nutrient Mixture F-12 Ham, D6434), Merck Life Science sp. z o.o., Poznań, Polska
4. Stem MACS™ MSC Expansion Media XF MACS– 130-01-375 – Miltenyi Biotec, Niemcy.

Zastosowane suplementy pożywek:

- Bydlęca surowica płodowa, inaktywowana na gorąco (ang. FBS, Fetal Bovine Serum Heat Inactivated, F4135), Merck Life Science sp. z o.o., Poznań, Polska,
- Roztwór antybiotyku i związku przeciwgrzybicznego (ang. AAS, Antibiotic Antimycotic Solution (100×), Stabilized, A5955), Merck Life Science sp. z o.o., Poznań, Polska,
- Suplement Glutamaks (ang. Glutamax™ Supplement, 35050061), Life Technologies Polska sp. z o.o. Thermofisher Scientific Gibco, Warszawa, Polska,
- Roztwór podstawowych aminokwasów (ang. BME Amino Acids Solution (50×), B6766), Merck Life Science sp. z o.o., Poznań, Polska,
- Roztwór endogennych aminokwasów (ang. MEM Non–essential Amino Acids (100x) solution, M7145), Merck Life Science sp. z o.o., Poznań, Polska,
- Fibroblastyczny czynnik wzrostu (ang. Fgf, Fibroblast Growth Factor-Basic, F3685), Merck Life Science sp. z o.o., Poznań, Polska.

Skład zastosowanych w doświadczeniu pożywek:

- ✓ **Pożywka 1:** DMEM; 10% FBS; 1% AAS; 1% glutamaks; 1% BME; 1% MEM;
- ✓ **Pożywka 1 + Fgf :** Pożywka 1; 10 ng/ml Fgf;
- ✓ **Pożywka 2:** DMEM i DMEM/F12 – mieszanina dwóch pożywek w stosunku 1:1; 10% FBS; 1% AAS ; 1% glutamaks; 1% BME ; 1% MEM;
- ✓ **Pożywka 2 + Fgf :** Pożywka 2; 10 ng/ml Fgf;
- ✓ **Pożywka 3:** DMEM/F12; 10% FBS; 1% AAS ; 1% glutamaks; 1% BME ; 1% MEM;
- ✓ **Pożywka 3 + Fgf :** Pożywka 3; 10 ng/ml Fgf;
- ✓ **Pożywka 4:** Stem MACS™ MSC Expansion Media XF MACS; 10% FBS; 1% AAS ; 1% glutamaks; 1% BME; 1% MEM.

Detekcja fosfatydyloseryny (PS) i jodku propidyny (PI) w MSCs

Analizy fluorescencyjne wykonywano w oparciu o Kit Annexin A5-FITC/7-AAD (Beckman Coulter, Brea, Kalifornia, Stany Zjednoczone) zgodnie z protokołem załączonym przez producenta. Kontrole pozytywną stanowiły komórki, w których sztucznie wywoływano apoptozę poprzez ich 30-minutową inkubację w 3% roztworze formaldehylu. Kontrolę negatywną natomiast stanowiły komórki oceniane w mieszaninie bez dodatku fluorochromu. Do przygotowanych próbek o koncentracji komórek 5–10 mln/ml dodano 10 µl odczynnika Aneksyny A5 oraz 2 µl jodku propidyny, delikatnie zamieszano i inkubowano przez 15 minut na lodzie w ciemności. Po inkubacji do próbki dodano 400 µl buforu (1x binding buffer) i poddano analizie za pomocą programu CytExpert 2.0 (Beckman Coulter, USA). W komórkach apoptotycznych następuje reorganizacja lipidów w błonie komórkowej, skutkiem której jest ekspozycja PS na zewnętrzną warstwę błony komórkowej.

Zjawisko to wykorzystuje się do znakowania komórek apoptotycznych za pośrednictwem aneksyny V, która ma zdolność do preferencyjnego wiązania się z ujemnie naładowanymi fosfolipidami, do których należy fosfatydyloseryna. Jodek propydydy (PI – ang. propidium iodide) przenika przez uszkodzoną błonę komórek żywych i wczesnoapoptotycznych. Barwi on jednak na czerwono komórki z uszkodzoną błoną cytoplazmatyczną, a więc nekrotyczne lub znajdujące się w późnej fazie apoptozy (Trzcńska i in., 2011). Oceniane komórki dzielono na trzy grupy: komórki w fazie nekrozy lub późnej apoptozy (wykazujące zieloną oraz czerwoną fluorescencję – aneksyna V+/PI+), komórki w fazie wczesnej apoptozy (wykazujące tylko zieloną fluorescencję – aneksyna V+/PI-) oraz komórki żywe (brak fluorescencji – aneksyna V-/PI-).

Analiza statystyczna

Analizy przeprowadzono w minimum trzech powtórzeniach biologicznych. Do wszystkich obliczeń wykorzystywano test jednoczynnikowej analizy wariancji ANOVA z testem *post hoc* Tukeya.

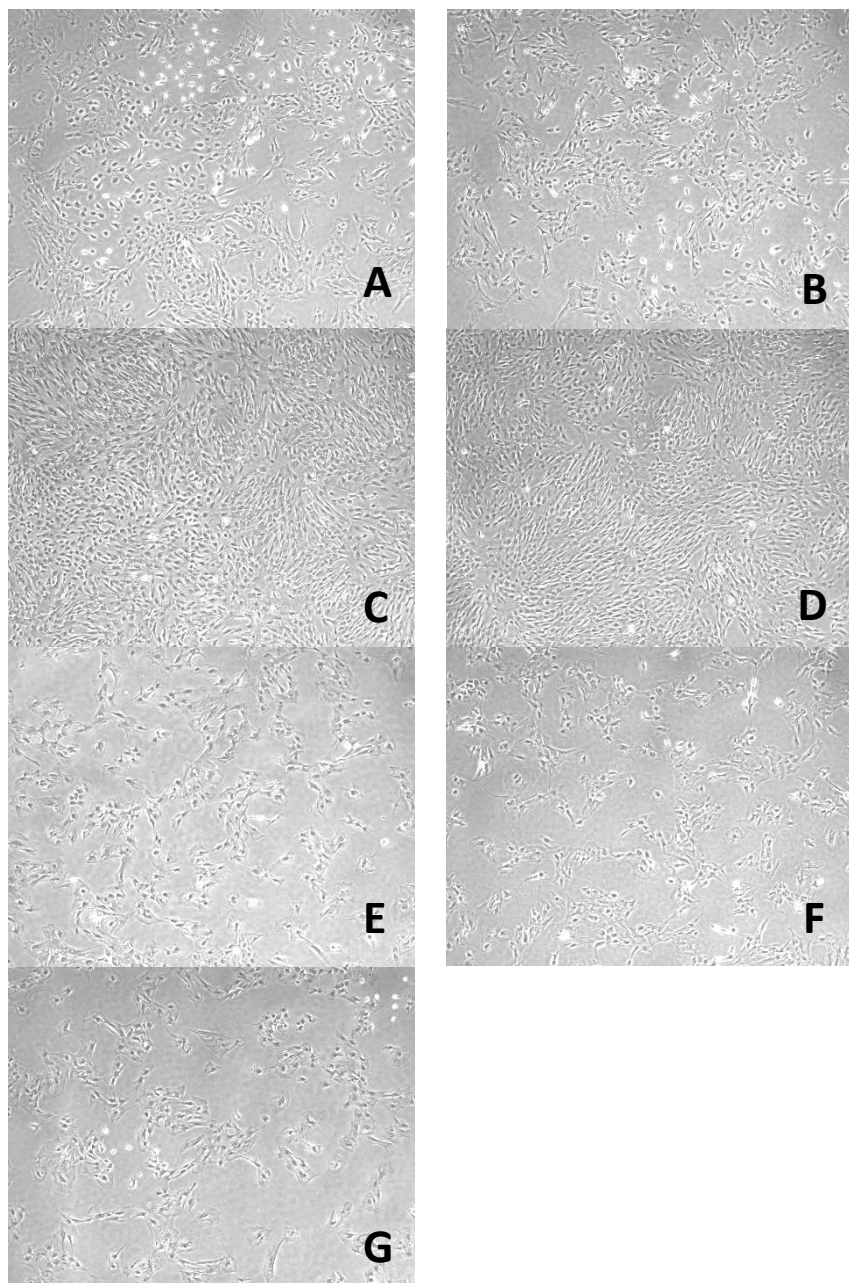
Wyniki

Potwierdzenie mezenchymalnego charakteru wyprowadzonych linii MSCs

Mezenchymalny charakter wyprowadzonych linii komórkowych MSCs został potwierdzony poprzez analizę poziomu ekspresji wybranych markerów powierzchniowych oraz zdolności komórek do cytodyferencjacji w adipocyty, osteoblasty i chondrocyty (Romanek i in., 2024). Tylko komórki wykazujące ekspresję markerów CD44, CD90 i CD105 przy braku ekspresji markerów CD14 i CD45 zostały wykorzystane w dalszych doświadczeniach.

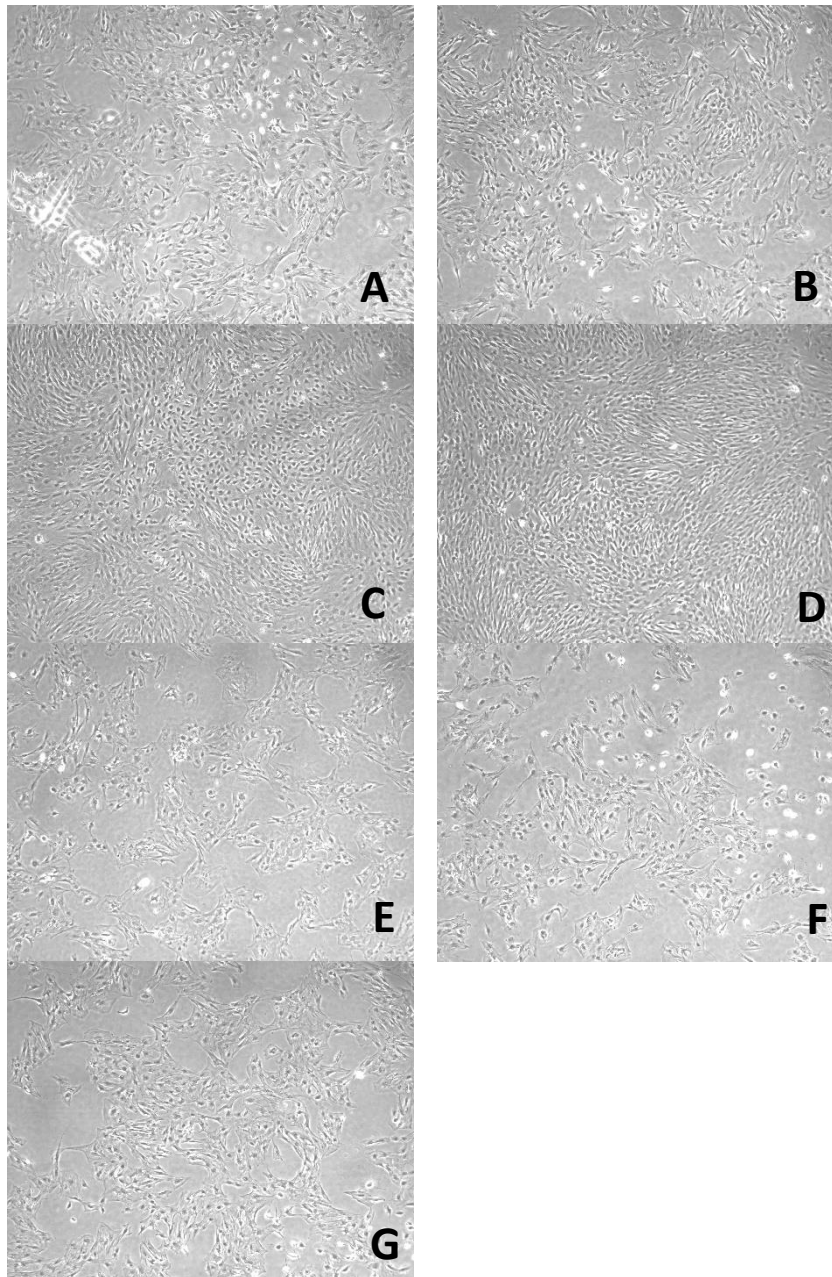
Ocena morfologiczna

W 7. dniu hodowli *in vitro* świńskich komórek MSCs zaobserwowano kolonie komórek o konfluencji na poziomie 90% i prawidłowej morfologii w pożywce 2 (DMEM i DMEM/F12, mieszanina dwóch pożywek w stosunku 1:1) z dodatkiem Fgf w temperaturze 39°C (rycina 1D). W przypadku zastosowania tej samej temperatury i pożywki, ale bez dodatku Fgf konfluencja komórek wynosiła około 85% (rycina 1C). Zbliżone wyniki zaobserwowano w przypadku hodowli komórek w pożywce 2 i pożywce 2 + Fgf, ale hodowanej w temperaturze 37°C (rycina 2C, rycina 2D). Hodowle te charakteryzowały się także, najmniejszą liczbą komórek nieadherentnych (martwych) w pożywce. Konfluencją, około 75% oraz 70% i poprawną morfologią charakteryzowały się kolonie komórek hodowanych w pożywce 1 (DMEM), odpowiednio w temperaturze 39°C oraz 37°C (rycina 1A, rycina 2A). W tych hodowlach zaobserwowano jednak najwyższą liczbę komórek nieadherentnych (nekrotycznych) w pożywce, w obydwu zakresach temperatur (rycina 1A, rycina 2A). Dodatek Fgf do pożywki 1 spowodował wzrost konfluencji komórek do około 80% w obydwu badanych temperaturach, a także spadek liczby obumarłych komórek w w/w hodowlach (rycina 1B; rycina 2B). Również prawidłową morfologią, lecz o niższej konfluencji kształtującej się na poziomie około 70% i 65% (odpowiednio w temperaturze 39°C oraz 37°C), charakteryzowały się hodowle komórkowe w pożywce 4 (ang. Stem MACS™ MSC Expansion Media XF MACS). Dodatkowo w tych hodowlach liczba nieadherentnych komórek w pożywce była najniższa (rycina 1G, rycina 2G). Najślabszy wzrost komórek (konfluencja na poziomie 50% oraz 40%) zaobserwowano w pożywce 3 (DMEM/F12) bez dodatku Fgf dla temperatury 39°C oraz 37°C (rycina 1E, rycina 2E). Dodatek Fgf do pożywki 3 skutkował podniesieniem konfluencji hodowli o około 10% (rycina 1F, rycina 2F). Wzrost ten następował niezależnie od zastosowanej temperatury hodowli.



Rycina 1. Mikrofotografie przedstawiające morfologie komórek MSC w siódmym dniu hodowli *in vitro* w temperaturze 37°C w następujących pożywkach: **A** – 1, **B** – 1+ Fgf, **C** – 2, **D** – 2+ Fgf, **E** – 3, **F** – 3 + Fgf, **G** – 4 (powiększenie zdjęć 200x)

Figure 1. Light micrographs showing the morphology of MSCs on day 7 day of *in vitro* culture at 37°C in medium: **A** – 1, **B** – 1+ Fgf, **C** – 2, **D** – 2+ Fgf, **E** – 3, **F** – 3 + Fgf, **G** – 4 (photo magnification 200x)



Rycina 2. Mikrofotografie przedstawiające morfologie komórek MSC w siódmym dniu hodowli *in vitro* świńskich komórek MSC w temperaturze 39°C w następujących pożywkach: **A** – 1, **B** – 1+ Fgf, **C** – 2, **D** – 2+ Fgf, **E** – 3, **F** – 3 + Fgf, **G** – 4 (powiększenie zdjęć 200x)

Figure 2. Light micrographs showing the morphology of MSCs on day 7 of *in vitro* culture at 39°C in medium: **A** – 1, **B** – 1+ Fgf, **C** – 2, **D** – 2+ Fgf, **E** – 3, **F** – 3 + Fgf, **G** – 4 (photo magnification 200x)

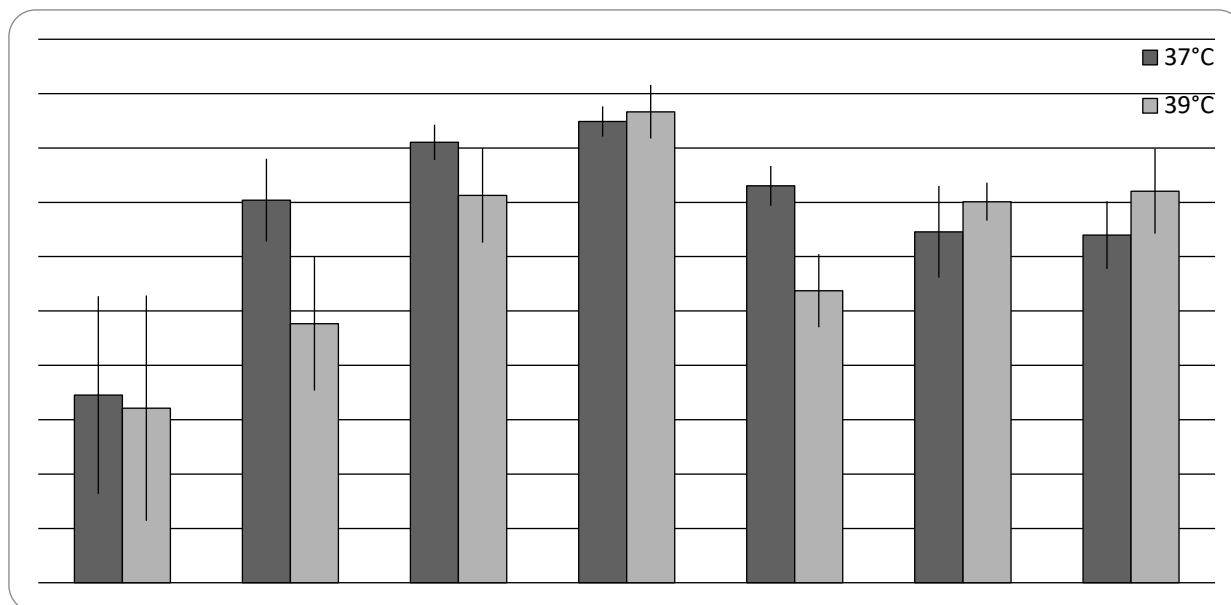
Ocena ekspozycji PS na powierzchni MSC

Nie zaobserwowano statystycznie istotnych różnic w odsetku komórek w fazie późnej apoptozy lub nekrozy, w fazie wczesnej apoptozy oraz komórek żywych pomiędzy analizowanymi grupami. Niemniej jednak zaobserwowano, że komórki hodowane w pożywce 2 charakteryzowały się najwyższym odsetkiem komórek żywych (około 90%) oraz niskim odsetkiem komórek późnoapoptycznych i nekrotycznych (około 7–8%) niezależnie od zastosowanej temperatury hodowli (wy-

kresy 1 i 2). Ponadto suplementacja pożywek czynnikiem Fgf poprawiała jakość hodowanych komórek, czyli zwiększała odsetek komórek żywych oraz zmniejszała liczbę komórek apoptotycznych (w sumie wczesno- i późnoapoptotycznych). Najlepszymi parametrami jakościowymi charakteryzowały się komórki hodowane w temp. 39°C w pożywce 2 z dodatkiem Fgf. W celu oceny liczby komórek późnoapoptotycznych lub nekrotycznych, wczesnoapoptotycznych oraz żywych wykonano trzy oddzielne doświadczenia. Wyniki analiz przedstawiono w tabeli 1. Przykładowy wynik analizy cytometrycznej dla analizowanej próbki oraz kontroli pozytywnej przedstawiono na rycinie 3.

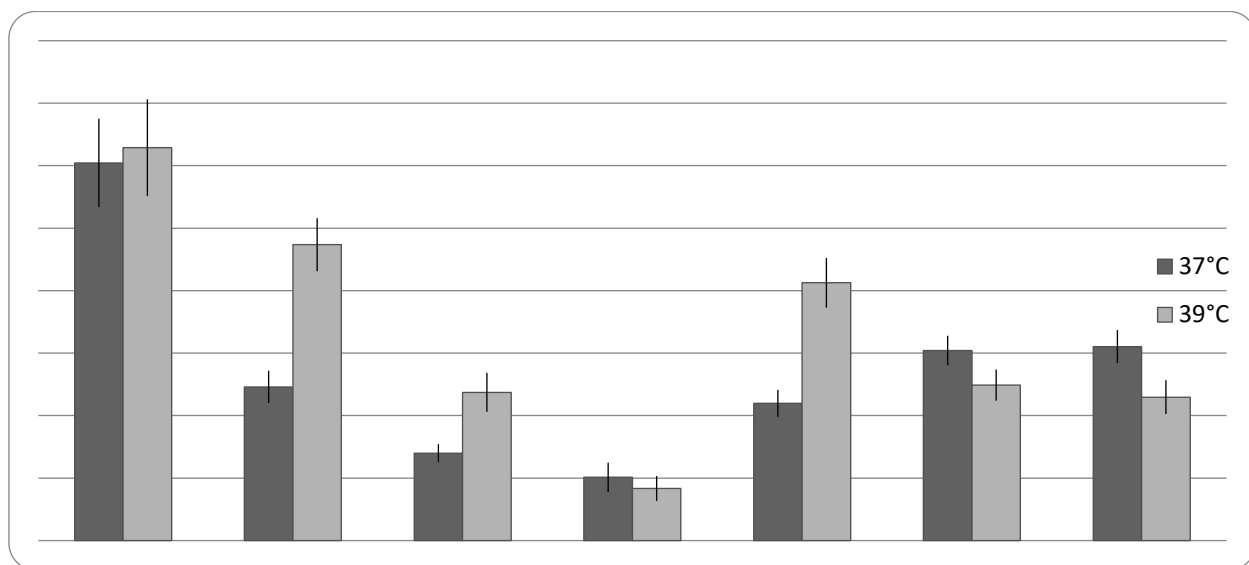
Tabela 1. Odsetek komórek MSC (%) w fazie późnej apoptozy lub nekrozy, wczesnej apoptozy oraz żywych \pm SEM
Table 1. Percentage of MSCs (%) in the phase of late apoptosis or necrosis early apoptosis or viable cells \pm SEM

LP. No.	Typ pożywki Culture type	37°C		
		Komórki żywe Viable cells	Komórki wczesnoapoptotyczne Early apoptotic cells	Komórki późnoapoptotyczne / nekrotyczne Late apoptotic/necrotic cells
1	Pożywka 1	81,91 \pm 3,64	7,57 \pm 2,54	10,52 \pm 0,85
2	Pożywka 1+Fgf	89,08 \pm 1,52	4,03 \pm 0,64	6,89 \pm 0,45
3	Pożywka 2	91,20 \pm 0,65	0,74 \pm 0,03	8,05 \pm 0,43
4	Pożywka 2+Fgf	91,97 \pm 0,56	1,92 \pm 0,29	6,10 \pm 0,56
5	Pożywka 3	89,60 \pm 0,73	1,69 \pm 0,36	8,70 \pm 0,47
6	Pożywka 3+Fgf	87,92 \pm 1,69	1,03 \pm 0,22	11,06 \pm 0,59
7	Pożywka 4	87,79 \pm 1,25	0,64 \pm 0,09	11,57 \pm 0,75
LP. No.	Typ pożywki Culture type	39°C		
		Komórki żywe Viable cells	Komórki wczesnoapoptotyczne Early apoptotic cells	Komórki późnoapoptotyczne / nekrotyczne Late apoptotic/necrotic cells
1	Pożywka 1	81,42 \pm 4,15	6,88 \pm 2,36	11,70 \pm 1,14
2	Pożywka 1+Fgf	84,53 \pm 2,46	4,41 \pm 0,71	11,06 \pm 0,92
3	Pożywka 2	89,25 \pm 1,74	1,33 \pm 0,12	9,42 \pm 0,88
4	Pożywka 2+Fgf	92,33 \pm 0,99	1,12 \pm 0,09	6,55 \pm 0,55
5	Pożywka 3	85,75 \pm 1,34	0,98 \pm 0,33	13,27 \pm 1,03
6	Pożywka 3+Fgf	89,02 \pm 0,70	0,77 \pm 0,20	10,21 \pm 0,65
7	Pożywka 4	89,41 \pm 1,56	0,95 \pm 0,11	9,64 \pm 0,76



Wykres 1. Analiza poziomu ekspozycji fosfatydyloseryny na powierzchni komórek MSC – liczba komórek żywych (%) w różnych pożywkach hodowlanych

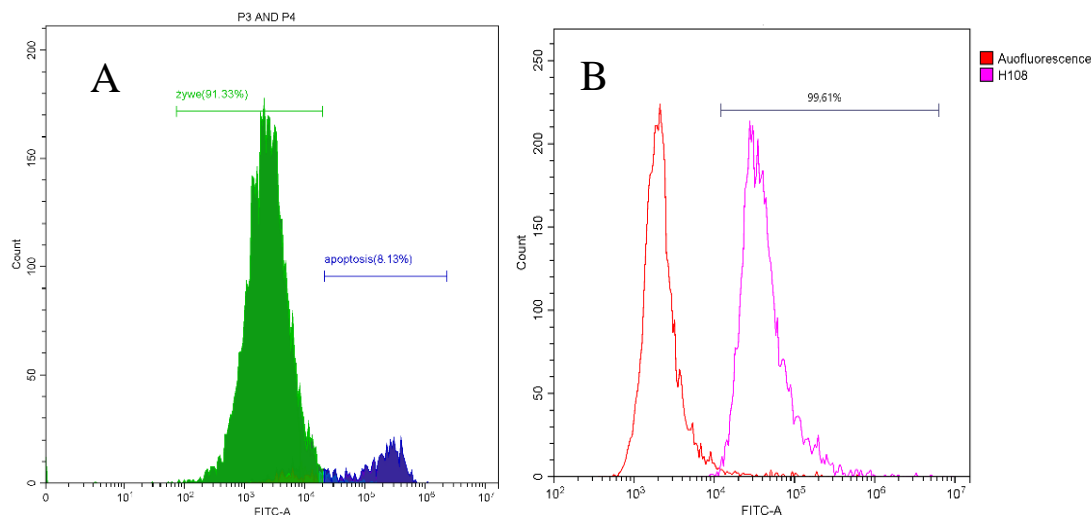
Diagram 1. Analysis of the level of phosphatidylserine exposure on the surface of MSC cells – number of viable cells (%) in various culture media



Wykres 2. Analiza poziomu ekspozycji fosfatydyloseryny na powierzchni komórek MSC – liczba wczesno- i późnoapoptycznych komórek MSC (%) w różnych pożywkach hodowlanych

Diagram 2. Analysis of the level of phosphatidylserine exposure on the surface of MSC cells – the number of early and late apoptotic MSC cells (%) in various culture media

Podsumowując, liczba nieadherentnych komórek była nieznacznie niższa w pożywce 2 z dodatkiem fibroblastycznego czynnika wzrostu w temperaturze 39°C. Ponadto zaobserwowano, że wzrost komórek w temperaturze 39°C we wszystkich typach badanych pożywek kształtował się na wyższym poziomie konfluencji średnio o 10%. Dodatkowo w tej temperaturze obserwowano mniej komórek nieadherentnych w pożywkach.



Rycina 3A. Analiza cytometryczna w kierunku określenia profilu ekspresji aneksyny i jodku propydydny w populacjach immunofluorescencyjnie oznakowanych komórek BM-MSCs. 3B. Analiza cytometryczna w kierunku określenia profilu ekspresji aneksyny i jodku propydydny w komórkach poddanych dwu godzinnej inkubacji z dodatkiem 1 μ M staurosporiny (kontrola pozytywna)

Diagram 3A. Flow cytometric analysis of annexin V-FITC staining and propidium iodide (PI) in immunofluorescence-adapted BM-MSC cell populations. 3B. Flow cytometric analysis of the functional profile and propidium iodide in cells subjected to a two-hour incubation with 1 μ M staurosporine (positive control)

Omówienie wyników

Zachowanie optymalnych warunków hodowli *in vitro* jest kluczowym czynnikiem wpływającym na wzrost i rozwój hodowanych komórek. Dostępne są pożywki hodowlane, tzw. pożywki bazowe o znanym składzie, które następnie suplementuje się dodatkowymi odczynnikami takimi jak L-glutamina, roztwór antybiotyku i związek przeciwgrzybiczny lub czynnikami wzrostu. Przy wyborze pożywki dla określonego typu komórek, glukoza i L-glutamina są najważniejszymi składnikami odżywczymi do wytwarzania energii komórkowej (ATP), która jest niezbędna do wzrostu i utrzymania komórek. Udowodniono, że glutamaks w porównaniu z L-glutaminą skutecznie wspiera wzrost MSCs (Salehinejad i in., 2012). Dostępne są także komercyjne pożywki o składzie nieznanym, opatentowanym, które są przeznaczone do użycia na konkretnym etapie hodowli komórkowej. Ze względu na duże zainteresowanie wykorzystaniem komórek MSCs w medycynie i weterynarii, bezpieczeństwo i ich skuteczność w różnych zastosowaniach klinicznych pozostaje kluczową kwestią. Optymalizacja warunków hodowli do produkcji MSCs na dużą skalę jest zatem priorytetowa. Celem badania było ustalenie warunków hodowli dla ekspansji świńskich MSCs, aby zapewnić im optymalne warunki do wzrostu komórkowego przy jednoczesnym ograniczeniu inicjowania procesu apoptozy. Nasze wyniki wykazały, że pożywka uzyskana z mieszaniny dwóch pożywek DMEM i DMEM/F12 w stosunku 1:1, uzupełniona 10% FBS oraz 10 ng Fgf jest optymalną oraz odpowiednią do hodowli i namnażania komórek MSCs. W tym przypadku temperatura hodowli nie miała znaczącego wpływu na jakość komórek. Ponadto zaobserwowano, że hodowla komórek z pożywcę DMEM charakteryzowała się wyższą liczbą komórek nieadherentnych. Spowodowane może być to faktem, że pożywka DMEM, w porównaniu do pozostałych wykorzystanych pożywek nie zawiera w swoim składzie buforu HEPES (ang. N'-2-Hydroxyethylpiperazine-N'-2 ethanesulphonic acid). Bufor HEPES może być dodany do pożywki hodowlanej, aby zapewnić dodatkową zdolność buforowania i lepszą kontrolę wahań pH (Brodsky i in., 2013). Możliwe, że właśnie ten czynnik skutkował niższym odsetkiem komórek nieadherentnych w pozostałych

badanych mediach. Wpływa to na wyższą konfluencję w 7. dniu hodowli komórkowej. Oznaczałoby to, że nie można określić, czy niższa konfluencja komórek hodowanych w pożywce DMEM wynika ze słabszej zdolności komórek do proliferacji w tych warunkach, czy z problemu związanego ze słabszą zdolnością buforującą pożywki.

W swoich badaniach Nekanti i in. (2010) stwierdzili, że zastosowany DMEM/F12 był odpowiedniejszą pożywką w porównaniu z innymi testowanymi podłożami pod względem wspierania ekspansji *in vitro* MSCs wyizolowanych z galarety Whartona. Jedną z głównych różnic pomiędzy podłożami podstawowymi, tj. DMEM/F12 i DMEM, jest stężenie glukozy. W DMEM/F12 stężenie glukozy wynosi 3,15 g/l, w DMEM – 1,0 g/l, a w mieszaninie DMEM:DMEM/F12 – 2,075g/l. Wyniki naszych analiz wykazały, że dla wzrostu komórek najodpowiedniejszym stężeniem glukozy okazało się 2,075 g/l. Komórki hodowane w niższym stężeniu (1,0g/l) charakteryzowały się również zadowalającym wzrostem, niemniej jednak wyższym od innych odsetkiem komórek nieadherentnych. Najniższy wzrost komórek zanotowano w pożywce z zawartością 3,15 g/l glukozy. Wyniki te nie pokrywają się z wynikami otrzymanymi dla ludzkich szpikopochodnych mezenchymalnych komórek macierzystych. Pal i in. (2009) wykazali, że komórki MSCs charakteryzowały się lepszą proliferacją przy zachowaniu wysokiej ekspresji markerów powierzchniowych oraz zdolnością różnicowania wieloliniowego w pożywce DMEM/F12. Niemniej jednak komórki hodowane w pożywce zawierającej 4,5 g/l glukozy wykazywały zahamowany wzrost po 5. pasażu. W przypadku hodowli w pożywce z niską zawartością glukozy komórki wykazywały zdolności podwojenia populacji do 10. pasażu, ale wraz z kolejnym pasażem następowały zmiany morfologiczne w komórkach (Pal i in., 2009). Szczurze szpikopochodne komórki MSCs hodowane w pożywce z niską zawartością glukozy (1,0 g/l) charakteryzowały się krótszym czasem tworzenia kolonii, krótszym czasem pierwszego pasażu oraz prawidłową morfologią. Wyniki te wskazują, że DMEM z niską zawartością glukozy jest najodpowiedniejszą pożywką do hodowli *in vitro* szczurzych MSCs (Wang i in., 2019). Analizy te potwierdzają fakt, że stężenie glukozy jest jednym z czynników wpływających na proliferację MSCs.

Wiadomo także, że dodanie do pożywki innych czynników wspierających wzrost komórkowy takich jak: aminokwasy, witaminy, sole nieorganiczne czy czynniki wzrostu, wpływają korzystnie na utrzymanie zdolności proliferacyjnych komórek. Jednym w tych czynników jest fibroblastyczny czynnik wzrostu. Wiadomo, że suplementacja Fgf pożywki hodowlanej zwiększa ekspansję ludzkich komórek MSCs (Gharibi i Hughes, 2012). W grupie kontrolnej (bez dodatku Fgf) MSCs podwoiły 10-krotnie liczbę komórek, kiedy w grupie z dodatkiem Fgf nastąpiło 25-krotne podwojenie liczby komórek. W warunkach klinicznych oznacza to możliwość ograniczenia wielkości biopłatów, z których pozyskane zostaną komórki MSCs (Gharibi i Hughes, 2012). Solchaga i in. (2010) również wykazali wyższą szybkość proliferacji ludzkich komórek MSCs w pożywce z dodatkiem Fgf w porównaniu do komórek hodowanych w warunkach kontrolnych. W każdym pasażu czas podwojenia populacji komórek suplementowanych Fgf był zawsze krótszy niż w komórkach hodowanych w warunkach bez suplementacji (Solchaga i in., 2010). Analiza poziomu ekspozycji fosfatydyloseryny (PS) na powierzchni komórki wykazała, że analizowane warunki hodowli (temp 37°C i 39°C) oraz różne stężenia glukozy w pożywce jak i suplementy pożywek hodowlanych nie powodują znaczącej inicjacji procesu apoptozy w komórkach. Huang i in. (2017) analizowali poziom ekspozycji PS szczurzych MSCs hodowanych w temperaturze 37°C w pożywce DMEM/F12. Otrzymane wyniki badań wykazały odsetek komórek żywych na poziomie 91% oraz około 9% komórek wczesno/późnoapoptotycznych oraz nekrotycznych (Huang i in., 2017). Zbliżone wyniki otrzymano dla szpikopochodnych ludzkich komórek macierzystych hodowanych w pożywce DMEM w temperaturze 37°C (de Andrade i in., 2014). Świńskie komórki MSCs analizowane w tych samych warunkach wykazywały bardzo zbliżone wartości. Analizy

przeprowadzone na świńskich MSCs hodowanych w temperaturze 39°C w pożywce z niską zawartością glukozy wykazały $67,2 \pm 14,2$ % komórek żywych, $24,3 \pm 12,7$ % komórek wczesnoapoptotycznych oraz $8,5 \pm 4,9$ % komórek późnoapoptotycznych oraz nekrotycznych (Romanek i in., 2017). W niniejszych badaniach wyniki wykazały wyższy odsetek komórek żywych (ponad 81%) przy niższym odsetku komórek wczesnoapoptotycznych (około 7%). Różnice te mogą wynikać z różnic sposobu kriokonserwowania komórek. Komórki analizowane w roku 2017 poddawane były procedurze kriokonserwacji w sposób dwustopniowy (umieszczanie komórek na 2 godziny w temperaturze -20°C , a następnie w oparach z ciekłego azotu) bez większej kontroli nad tempem ochładzania komórek (Romanek i in., 2017). Aktualnie w naszych badaniach komórki kriokonserwowane są przy użyciu Nalgene Mr Frosty Freezing Container (Merck Life Science sp. zo.o. , Poznań, Polska), które zapewnia tempo schładzania $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$.

Na podstawie oceny morfologicznej oraz analizy poziomu ekspozycji PS na błonie komórkowej stwierdzono, że najlepszymi warunkami do hodowli szpikopochodnych świńskich komórek macierzystych jest mieszanina dwóch pożywek DMEM i DMEM/F12 w stosunku 1:1 z dodatkiem fibroblastycznego czynnika wzrostu. Badania wskazywały także na korzyść hodowli komórkowych w temperaturze 39°C. Uzyskane wyniki sugerują konieczność kontynuowania podjętego tematu. Optymalizowanie warunków prowadzenia hodowli powinno dotyczyć wszystkich komórek i być zdefiniowane osobno dla danego typu komórek oraz gatunku źródłowego. Dodatkowo należy pamiętać, że komórki MSC pozyskane z różnych źródeł charakteryzują się inną żywotnością, plastycznością oraz poziomem ekspresji markerów powierzchniowych CD na powierzchni komórkowej. Dlatego kolejną istotną kwestią powinno być zoptymalizowanie warunków hodowli komórek pozyskiwanych z innych źródeł niż szpik.

Piśmiennictwo

- Almalki S.G., Llamas Valley Y., Agrawal DK. (2017). MMP-2 and MMP-14 silencing inhibits VEGFR2 cleavage and induces the differentiation of porcine adipose-derived mesenchymal stem cells to endothelial cells. *Stem Cells Transl. Med.*, 6(5): 1385–1398.
- Brodsky A.N., Zhang J., Visconti R.P., Harcum S.W. (2013). Expansion of mesenchymal stem cells under atmospheric carbon dioxide. *Biotechnol. Prog.*, 29(5): 1298–1306.
- Caminal M., Fonseca C., Peris D., Moll X., Rabanal R.M., Barrachina J., Codina D., García F., Ciro J.J., Gòdia F., Arnau Pla A., Vives J. (2014). Use of a chronic model of articular cartilage and meniscal injury for the assessment of long-term effects after autologous mesenchymal stromal cell treatment in sheep. *N Biotechnol.*, 31(5): 492–498.
- Costa C.R., Feitosa M.L., Rocha A.R., Bezerra D.O., Leite Y.K.C., Argolo Neto N.M., Rodrigues H.W.S., Sousa A. Junior., Silva A.S., Sarmiento J.L., Silva L.S., Carvalho A.M. (2019). Adipose stem cells in reparative goat mastitis mammary gland. *PLoS One*, 22:14(10): e0223751.
- de Andrade A.V., Riewaldt J., Wehner R., Schmitz M., Odendahl M., Bornhäuser M., Tonn T. (2014). Gamma irradiation preserves immunosuppressive potential and inhibits clonogenic capacity of human bone marrow-derived mesenchymal stromal cells. *J. Cell Mol. Med.*, 18(6): 1184–1193.
- Elkhenany H., Amelse L., Andersen Lafont A., Shawn Bourdo S., Caldwell M., Neilse N., Dervishi E., Derek O., Biris AS., Anderson D., Dhar M. (2015). Graphene supports *in vitro* proliferation and osteogenic differentiation of goat adult mesenchymal stem cells: potential for bone tissue engineering. *J. Appl. Toxicol.*, 35: 367–374.

- Gala K., Burdzińska A., Pączek L. (2009). Mezenchymalne komórki macierzyste szpiku kostnego a starzenie. *Post. Biol. Kom.*, 37: 89–106.
- Ghai S., Saini S., Ansari S., Verma V., Chopra S., Sharma V., Devi P., Malakar D. (2022). Allogenic umbilical cord blood-mesenchymal stem cells are more effective than antibiotics in alleviating subclinical mastitis in dairy cows. *Theriogenology*, 187: 141–151.
- Gharibi B., Hughes FJ. (2012). Effects of medium supplements on proliferation, differentiation potential, and *in vitro* expansion of mesenchymal stem cells. *Stem Cells Transl. Med.*, 1(11): 771–782.
- Heinola T., de Grauw J.C., Virkki L., Kontinen A., Raulo S.M., Sukura A., Kontinen Y.T. (2013). Bovine chronic osteoarthritis causes minimal change in synovial fluid. *J. Comp. Pathol.*, 148(4): 335–344.
- Huang D., Yin L., Liu X., Lv B., Xie Z., Wang X., Yu B., Zhang Y. (2018). Geraniin protects bone marrow-derived mesenchymal stem cells against hydrogen peroxide-induced cellular oxidative stress *in vitro*. *Int. J. Mol. Med.*, 41(2): 739–748.
- Iaccarino L., Ghirardello A., Canova M., Zen M., Bettio S., Nalotto L., Punzi L., Doria A. (2011). Autoprzeciwiała przeciwko aneksynom i ich rola jako biomarkerów chorób autoimmunologicznych. *Dermatologia po Dyplomie*, 2(6): 28–37.
- Kiliańska Z.M. (2002). Apoptoza organizmów zwierzęcych. W: *Cytobiochemia*, Kłyszewko-Stefanowicz L. (red.). Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, ss. 772–815, 919–930.
- Kokubun K., Pankajakshan D., Kim M. J., Agrawal D. K. (2016). Differentiation of porcine mesenchymal stem cells into epithelial cells as a potential therapeutic application to facilitate epithelial regeneration. *J. Tissue Eng. Regen Med.*, 10(2): 73–83.
- McDuffee L.A., Esparza Gonzalez B.P., Nino-Fong R., Aburto E. (2014). Evaluation of an *in vivo* heterotopic model of osteogenic differentiation of equine bone marrow and muscle mesenchymal stem cells in fibrin glue scaffold. *Cell Tissue Res.*, 355: 327–335.
- Nekanti U., Mohanty L., Venugopal P., Balasubramanian S., Totey S., Ta M. (2010). Optimization and scale-up of Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells for clinical applications. *Stem Cell Res.*, 5(3): 244–254.
- Opiela J., Lipiński D., Romanek J., Juzwa W., Bochenek M., Wilczek P. (2016). MMP-2, TIMP-2, TAZ and MEF2A transcript expression in osteogenic and adipogenic differentiation of porcine mesenchymal stem cells. *Ann. Anim. Sci.*, 16: 369–385.
- Opiela J., Bülbül B., Romanek J. (2020). Varied approach of using MSCs for bovine embryo *in vitro* culture. *Anim Biotechnol.*, 31(1):1–8.
- Pacini S., Spinabella S., Trombi L., Fazzi R., Galimberti S., Dini F., Carlucci F., Petrini M. (2007). Suspension of bone marrow-derived undifferentiated mesenchymal stromal cells for repair of superficial digital flexor tendon in race horses. *Tissue Eng.*, 13(12): 2949–2955.
- Pal R., Hanwate M., Jan M., Totey S. (2009). Phenotypic and functional comparison of optimum culture conditions for upscaling of bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *J. Tissue Eng. Regen Med.*, 3(3): 163–174.
- Peralta O.A., Carrasco C., Vieytes C., Tamayo M.J., Munoz I., Sepulveda S., Tadich T., Duchens M., Melendez P., Mella A., Torres C.G. (2020). Safety and efficacy of a mesenchymal stem cell intramammary therapy in dairy cows with experimentally induced *Staphylococcus aureus* clinical mastitis. *Sci. Rep.*, 10(1): 2843.
- Renzi S., Ricco S., Dotti S., Sesso L., Grolli S., Cornali M., Carlin S., Patruno M., Cinotti S., Ferrari M. (2013). Autologous bone marrow mesenchymal stromal cells for regeneration of injured equine ligaments and tendons: a clinical report. *Res. Vet. Sci.*, 95(1): 272–277.

- Romanek J., Opiela J., Lipiński D., Smoraż Z. (2017). The effect of high hydrostatic pressure on survival rate and quality of porcine mesenchymal stem cells after cryopreservation. *Anim. Biotechnol.*, 29: 283–292.
- Romanek J., Opiela J., Smoraż Z. (2018). The impact of high hydrostatic pressure (40 MPa and 60 MPa) on the apoptosis rates and functional activity of cryopreserved porcine mesenchymal stem cells. *Ann. Anim. Sci.*, 8(1): 69–86.
- Romanek J., Samiec M., Jurkiewicz J., Kurowska P., Rak A., Trzcińska M. (2024). Deciphering the transcriptional activities of genes coding for adipokines and their receptors in porcine ex situ-protected mesenchymal stem cells undergoing adipogenic differentiation. *Ann. Anim. Sci.*, 24(3): 829–842.
- Salehinejad P., Alitheen N.B., Nematollahi-Mahani S.N., Ali A.M., Omar A.R., Janzamin E., Hajghani M. (2012). Effect of culture media on expansion properties of human umbilical cord matrix-derived mesenchymal cells. *Cytotherapy*, 14(8): 948–953.
- Seo J.P., Tsuzuki N., Haneda S., Yamada K., Furuoka H., Tabata Y., Sasaki N. (2014). Osteoinductivity of gelatin/ β -tricalcium phosphate sponges loaded with different concentrations of mesenchymal stem cells and bone morphogenetic protein-2 in an equine bone defect model. *Vet. Res.*, 38: 73–80.
- Solchaga L.A., Penick K., Goldberg V.M., Caplan A.I., Welter J.F. (2010). Fibroblast growth factor-2 enhances proliferation and delays loss of chondrogenic potential in human adult bone-marrow-derived mesenchymal stem cells. *Tissue Eng Part A*, 16(3): 1009–1019.
- Stępień A., Izdebska M., Grzanka A. (2007). Rodzaje śmierci komórki. *Post. Hig. Med. Dośw.*, 61: 420–428.
- Trzcińska M., Bryła M., Smoraż Z. (2011). Apoptotic-like changes in the spermatozoa of fresh and stored boar semen and the quality of embryos produced *in vivo*. *Anim. Reprod. Sci.*, 124: 90–97.
- Wang J.G., Yu X.Q., Wen J.R., Zhu G.G., Bao M.Y., He X.L., Li L. (2019). Screening of the optimum medium for rat mesenchymal stem cells. *Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban.*, 50(6): 891–895.
- Wilson S.M., Monaco E., Goldwasser M.S., Clark S.G., Hurley W.L., Wheeler M.B. (2010). Migration and therapeutic potential of porcine adult adipose-derived mesenchymal stem cells. *Reprod. Fertil. Dev.*, 22: 357.
- Zhang A., Lu L., Yang F., Luo T., Yang S., Yang P., Li X., Deng X., Qiu Y., Chen L., Long K., Pan D., Jin L., Li M., Chen, L. (2024). Effects of miR-29c on proliferation and adipogenic differentiation of porcine bone marrow mesenchymal stromal cells. *Adipocyte*, 13(1): 2365211.

DETERMINATION OF THE EFFECT OF *IN VITRO* CULTURE CONDITIONS ON THE QUALITY OF PORCINE MSC CELLS ISOLATED FROM BONE MARROW

Joanna Romanek, Joanna Jurkiewicz

SUMMARY

The conditions of *in vitro* cell culture are a key factor influencing the quality of cultured cells. In experiments, we can use basic media supplemented with various factors such as vitamins or growth factors, as well as ready-made commercial media with a hidden composition. Temperature also has an important effect on cell viability and proliferation rate. In this article, the effect of culture media composition and culture temperature on the quality of porcine bone marrow-derived stem cells was evaluated. Morphological assessment carried out on day 7 of *in vitro* culture of porcine MSCs showed that the highest confluence (at 90%) and physiological morphology were characteristic of cells cultured at 39°C and in a medium containing a mixture of Dulbecco's modified Eagle's medium (low glucose content) and Dulbecco's modified Eagle's medium/nutrient mixture F-12 ham in a 1:1 ratio with the addition of 10 ng fibroblast growth factor (Fgf). Furthermore, it was shown that cells cultured in the above mentioned medium were characterized by the highest percentage of live cells and a low percentage of late apoptotic and necrotic cells, regardless of the culture temperature.

Keywords: mesenchymal stem cells, bone marrow-derived MSCs, annexin V, viable cells, apoptosis, porcine