

Метод индукции стволовых клеток стромы костного мозга по остеогенному типу

À.Ã. ÎÎÁÍÁÏÔË, À.Â. ÎÁÁ ÁÏË, Á.Ì. ÎËÑËÏÁÓ

Институт неотложной и восстановительной хирургии им. В.К. Гусака АМНУ, г. Донецк

Method for Induction of Bone Marrow Stromal Stem Cells on Osteogenic Type

A.G. POPANDOPULO, A.V. OBEREMKO, V.M. OKSIMETS

V.K. Gusak Institute of Emergency and Reconstructive Surgery
of Academy of Medical Sciences of Ukraine, Donetsk, Ukraine

Для исследования возможности дифференцировки клеток стромы были созданы микс-культуры стромальных стволовых клеток (ССК) костного мозга и прогениторных клеток надкостницы (ПКН) в соотношении 3:1 (600000 ССК и 200000 ПКН). Культуру ССК получали из костного мозга путём механической дезагрегации, центрифугирования с последующим высеваем в культуральные флаконы 75 см² (“Costar”, США). Первично выделенную культуру ССК вели на ростовой среде DMEM/F12 1:1 (“Sigma”, США) с добавлением 20% эмбриональной телячьей сыворотки (“Биолот”, Россия), глутамина (“Биолот”, Россия), L-аскорбиновой кислоты (“Sigma”, США) и основного фактора роста фибробластов (“Sigma”, США). Клетки культивировали в CO₂-инкубаторе (37°C, содержание углекислого газа 5% и влажность 95%). Среду меняли каждые 3-е суток. При достижении 70–80% монослоя клетки пассировали раствором 0,25%-го трипсин/версена (1:5).

Культуру ПКН получали из периоста костных фрагментов. Биоптат многократно промывали раствором PBS с добавлением 100 ед/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина и вносили при 4°C на 24 ч в питательную среду “Игла” (“Биолот”, Россия), содержащую 100 ед/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина. После этого элементы мышечной и соединительной ткани отделяли от костной. Поверхность чашек Петри диаметром 35 мм предварительно обрабатывали раствором коллагена I типа и помещали в них костные фрагменты. Культивирование проводили по стандартной методике. На 8-е сутки в фазово-контрастном микроскопе “Laborux” (“Leica”, Германия) при стократном увеличении наблюдали миграцию ПКН, через месяц после начала культивирования была получена конфлуэнтная культура.

Микс-культуру культивировали по стандартной методике. Поверхность плазматических мембран предварительно помечали прижизненными красителями PKH67 Green (для ССК) и PKH26 Red (для ПКН) Fluorescent Linker Kit (“Sigma”, США), которые обладают флуоресценцией в зелёной и красной частях спектра соответственно. Каждые 3–4 дня культуры фотографировали при помощи программы “Qwin” (“Leica”, Германия). Через 3–4 недели после совместного культивирования отмечена дифференцировка ССК в остеобласты, что подтверждалось положительной окраской на щелочную фосфатазу, которая является продуктом жизнедеятельности костных клеток (BCIP/NBT Liquid Substrate System, “Sigma”, США).

In order to investigate the possibilities for stromal cell differentiation there were designed the mix-cultures of stromal stem cells (SSCs) of bone marrow and periosteal progenitor cells (PPCs) in 3:1 ratio (600,000 SSCs and 200,000 PPCs). SSCs culture was derived from bone marrow by means of mechanical disaggregation, centrifugation with following inoculation in 75 cm² cultural flasks (“Costar”, USA). The isolated SSCs culture was primarily plated on DMEM/F12 growth medium in 1:1 ratio (“Sigma”, USA) with adding 20% fetal calf serum (“Biolot”, Russia), glutamine (“Biolot”, Russia), L-ascorbic acid (“Sigma, USA”) and main factor of fibroblast growth (“Sigma”, USA). Cells were cultured in CO₂ incubator (37°C, 5 and 95% of CO₂ and humidity, correspondingly). Medium was changed every 3 days. When getting 70-80% monolayer, the cells were passed with 0.25% trypsin/versene solution (1:5).

The PPCs culture was derived from bone fragment periost. Biopsy specimen was many-fold washed with PBS solution, complimented with 100 U/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin and introduced into the “Eagle” cultural medium (“Biolot, Russia), containing 100 U/ml penicillin and 100 mg/ml streptomycin at 4°C for 24 hrs. Afterwards the elements of muscular and connective tissues were isolated from the bone one. The surface of 35 mm diameter’s Petri dishes was preliminarily treated with I type collagen solution with placing bone fragments into them. Culturing was carried-out by the standard technique. To the 7th day the PPCs migration was observed under phase-contrast microscope “Laborux” (“Leica, Germany”) at 100-fold magnification, a confluent culture was obtained a month later of culturing beginning.

The mix-culture was cultured according to the standard technique. The surface of plasmatic membranes was preliminarily marked with supravital dyes PKH67 Green (for SSCs) and PKH26 Red (for PPCs) Fluorescent Linker Kit (“Sigma”, USA), having fluorescence in green and red spectra, correspondingly. Cultures were recorded with “Qwin” software (“Leica”, Germany) every 3-4 days. The SSCs differentiation into osteoblasts was noted 3-4 weeks after mutual culturing, confirmed by a positive staining onto alkaline phosphatase, being the product of bone cell vital activity (BCIP/NBT Liquid Sytem, “Sigma”, USA).