

Некоторые аспекты эффективности роллерного культивирования

А.Г. ПОПАНДОПУЛО, А.В. ОБЕРЕМКО, В.М. ОКСИМЕЦ, А.А. ШТУТИН

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

Some Aspects of Roller Culturing Efficiency

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

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

При исследовании влияния роллерного культивирования на формирование объёмных 3D-структур, обладающих природной архитектоникой костной ткани, была проведена серия экспериментов. Культуру стромальных стволовых клеток (ССК) получали из костного мозга путём механической дезагрегации, центрифугирования с последующим высеиванием 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).

В экспериментах использовали блоки ксено- или аллоколлагена и гидроксиапатита, содержащие костные сульфатированные гликозаминогликаны. Пористый биоматериал “Остеоматрикс” (“Конектбиофарм”, Россия), применяемый для заполнения объёма полости или костного дефекта, в стерильных условиях разрезали скальпелем на две равные части, заливали культуральной средой и помещали в термостат при температуре 37°C. Через 2 ч добавляли по 1 млн ССК, предварительно снятых с культуральных флаконов и меченных мембранным прижизненным красителем PKH67 Green Fluorescent Linker Kit (“Sigma”, США). Клетки культивировали в силиконовой посуде, во избежание адгезии к стеклянной поверхности, при 37°C и содержании углекислого газа 5%, одна половина – в роллерной установке, другая – в чашке Петри диаметром 100 мм.

Пролиферацию клеток оценивали визуально при помощи флуоресцентной микроскопии на микроскопе “Labogux” (“Leica”, Германия). На 15-е сутки культивирования проводили МТТ-анализ (МТТ-Cell Proliferation Assay), основанный на измерении оптической плотности раствора при отложении кристаллов формазана в митохондриях клеток. Преобразование жёлтой соли тетразолия, МТТ в нерастворимые в воде тёмно-синие кристаллы формазана возможно только в живых клетках в присутствии митохондриального фермента – сукцинат-дегидрогеназы. Оптическую плотность жидкости измеряли спектрофотометрически на микропланшетном фотометре для многофункционального анализа “Synergy HT” (“Bio-Tek”, США), определяя поглощение как функцию от концентрации преобразованного красителя, количество которого прямо пропорционально зависит от количества метаболически активных клеток в культуре.

Результаты исследований показали, что количество и жизнеспособность клеток без использования роллерного культивирования были в 5 раз больше.

The series of experiments were carried-out when studying the effect of roller culturing on formation of volumetric 3D-structures, having a natural architecture of bone tissue. The culture of stromal stem cells (SSCs) was derived from bone marrow via mechanical disaggregation and centrifugation with following inoculation in 75 cm² cultural flasks (Costar, USA). Primarily isolated SSCs culture was plated on DMEM/F12 1:1 growth medium (Sigma, USA) with adding 20% fetal calf serum (Biolog, Russia), glutamine (Biolog, Russia), L-ascorbic acid (Sigma, USA) and fibroblast growth main factor (Sigma, USA). Cells were cultured in CO₂-incubator (37°C, 5% CO₂ content and 95% humidity). Medium was changed each 3 days. When achieving 70–80% monolayer the cells were passed with 0.25% trypsin/versene solution (1:5).

The blocks of either xeno- or allocollagen and hydroxyapatite, containing bone sulphated glycosaminoglycans, have been used in the experiments. Porous biomaterial “Osteomatrix” (Konektbiofarm, Russia), applied for filling the cavity volume or bone defect under sterile conditions, was cut with scalpel in two equal parts, embedded with cultural medium and placed into thermostat at 37°C. Two hours later we added 1 ml SSCs, preliminarily removed from cultural flasks and labeled with membrane supravital dye PKH67 Green Fluorescent Linker Kit (Sigma, USA). Cells were cultured in silicone dish to avoid the adhesion to glass surface at 37°C and 5% CO₂ content, one part in a roller device, another in 100 mm Petri dish.

Cell proliferation was visually assessed by means of fluorescent microscopy with Laborux microscope (Leica, Germany). The MTT analysis (MTT-Cell Proliferation Assay), based on measuring optical density of solution at formazan crystal deposit in mitochondrial cells, was carried-out to the 15th culturing days. Transformation of tetrasolium yellow salt, MTT into water-insoluble dark blue formazan crystals is only possible in living cells at the presence of mitochondrial enzyme: succinate-dehydrogenase. Optical density of liquid was spectrophotometrically measured with microplotting photometer for multifunctional analysis Synergy HT (Bio-Tek, USA), by determining absorption as the function of concentration of transformed dye, which amount depended in a direct proportion on the amount of metabolically active cells in the culture.

Research results have demonstrated the cell amount and viability to be 5 time higher when roller culturing is not used.