

В. С. Астахова, Е. П. Настенко, Е. Г. Оксамытная

ПОКАЗАТЕЛИ КЛОНИРОВАНИЯ И АРХИТЕКТОНИКА КОЛОНИЙ СТРОМАЛЬНЫХ ФИБРОБЛАСТОВ КОСТНОГО МОЗГА ЧЕЛОВЕКА ПРИ ЗАБОЛЕВАНИЯХ РАЗЛИЧНОГО ГЕНЕЗА

Исследовали активность КОЕф костного мозга человека при гематологических и ортопедических заболеваниях. Изучена также архитектура крупных колоний. Эффективность клонирования КОЕф у больных с воронкообразной деформацией грудной клетки составила $55,4 \pm 2,2$ на 10^5 клеток, у больных с врожденным вывихом бедра — $27,4 \pm 3,0$ на 10^5 клеток. У гематологических больных она колебалась от 240 до 0 на 10^5 клеток.

Установлено, что крупные колонии состоят из поверхностного монослоя фибробластных клеток, под которыми находятся продукты метаболизма, немногочисленные адипоциты и фибробласты, образующие структуры с признаками примитивной циркуляторной сети.

Введение. В последние годы складывается представление о строении костного мозга как сложной, полифункциональной системе, выступающей, с одной стороны, в качестве гемопозитического микроокружения, поддерживающего и регулирующего кроветворение, а с другой — участвующей в перестройке костной ткани. Среди методических подходов, используемых в изучении фибробластов — основного клеточного компонента костномозговой стромы, — существенное место принадлежит методу клонирования стромальных фибробластов, позволяющему характеризовать основные функциональные показатели клеток-предшественников — колониобразующих единиц фибробластов (КОЕф) [1].

Ранее установлено, что вырастающие в культуре колонии гетерогенны по величине и количеству входящих в них клеток. При этом выделены два типа колоний: однослойные и многослойные. Соотношение однослойных и многослойных колоний при разной ортопедической патологии различно [2]. До настоящего времени нет единого мнения о строении крупных многослойных колоний, которые в норме составляют более 1/3 общего числа выросших колоний, т. е. неизвестно, являются они истинно многослойными с параллельно идущими один над другим слоями клеток или имеют другое строение, что немаловажно как в плане изучения цитогенеза фибробластов, так и анализа клеточного состава клона — потомка одной клетки.

Учитывая изложенное, цель настоящего исследования состояла в изучении активности КОЕф при заболеваниях различного генеза и архитектоники образуемых ими колоний.

Материалы и методы. Исследования проведены в двух группах: к первой группе отнесены больные с врожденными заболеваниями опорно-двигательного аппарата — врожденный вывих бедра (10 человек) и воронкообразная деформация грудной клетки (10 человек). Исследовали костный мозг спонгиозной кости, взятой во время реконструктивно-восстановительных операций. Вторую группу составили 14 больных с гематологическими заболеваниями, из них 7 с хроническим миелолейкозом. Материалом для исследования служили кусочки трепано-биоптатов подвздошной кости, взятые с диагностической целью.

Метод клонирования стромальных фибробластов костного мозга

детально описан нами ранее [1]. Содержание ионов электролитов (Na^+ , K^+ , Ca^{2+}) и параметры кислотно-щелочного состояния (КЩС) (pH , pO_2 , pCO_2 , O_2^{sat} , O_2^{cont}) изучали в культуральной среде перед введением в суспензию клеток (исходные данные) и на 14-е сутки культивирования при учете результатов клонирования. Исследования проведены на анализаторе AVL 985S фирмы «AVL». Внешний вид колоний оценивали в микроскопе МБС-9. Морфологические исследования осуществляли на серийных полутонких срезах, полученных после подготовки материала по методике, используемой в электронной микроскопии [3]. Чтобы не нарушить строения, колонии фиксировали в сосудах для культивирования, предварительно удалив культуральную среду и промыв исходным буфером. После окончания полимеризации плоскопараллельные блоки открепляли от стекла, погрузив в жидкий азот и горячую воду. Срезы готовили на ультрамикротоме ЛКВ-111, ориентируя блоки таким образом, чтобы получить поперечные срезы колоний. Полутонкие срезы окрашивали 1%-м раствором пиронина и 1%-м метиленовым синим, а затем изучали в световом микроскопе. Морфометрический анализ срезов колоний проведен на анализаторе изображения «Videolab 2.2» фирмы «Uni-Export Instruments Ltd/Moscow State University».

Результаты и обсуждение. Эффективность клонирования КОЕф у больных с воронкообразной деформацией грудной клетки составила $55,4 \pm 2,2$ на 10^5 ядерных клеток костного мозга грудины, у больных с врожденным вывихом бедра — $27,4 \pm 3,0$ на 10^5 ядерных клеток костного мозга спонгиозы крыла подвздошной кости.

У гематологических больных, составляющих разнородную группу, эффективность клонирования колебалась от 0 до 240 на 10^5 ядерных клеток. Причем отсутствие роста колоний в культурах было у 10 из 14 человек.

Такое существенное различие в активности КОЕф побудило нас исследовать основные параметры культуральной среды и их возможное влияние на результаты (таблица).

Для сохранения жизнеспособности, роста и размножения клеток в культуре требуются определенные физико-химические условия. Так, КЩС культуральной среды имеет ключевое значение в обеспечении клеточного метаболизма. Растворенный кислород и углекислота проникают в клетку и выходят из нее по градиенту концентрации, тем самым поддерживая ее в нормальном функциональном состоянии. Неорганические соли, в основном, обуславливают поддержание электролитического баланса и осмотического равновесия среды [4]. Полученные нами результаты свидетельствуют о том, что на 14-е сутки культивирования концентрация ионов Na^+ и Ca^{2+} несколько уменьшается, в то время как концентрация K^+ возрастает, что отражает процессы, протекающие между клетками и окружающей средой. Что касается КЩС, то очевиден сдвиг pH в кислую сторону вследствие накопления продуктов

Изменение концентрации ионов электролитов и КЩС в процессе культивирования

Показатель	Исходные данные	14-е сут культивирования	
		1-я группа, ортопедическая	2-я группа, гематологическая
Концентрация ионов электролитов, ммоль/л			
Na^+	$149,7 \pm 0,3$	$141,2 \pm 0,9$	$143,0 \pm 0,2$
K^+	$6,29 \pm 0,52$	$8,66 \pm 1,02$	$6,87 \pm 0,49$
Ca^{2+}	$1,073 \pm 0,098$	$1,005 \pm 0,182$	$0,952 \pm 0,063$
КЩС			
pH	$7,32 \pm 0,11$	$7,04 \pm 0,08$	$7,11 \pm 0,20$
pCO_2 мм. рт. ст.	$13,17 \pm 0,09$	$5,93 \pm 0,19$	$6,37 \pm 0,14$
pO_2 , мм. рт. ст.	$173,9 \pm 0,2$	$192,9 \pm 1,7$	$185,8 \pm 0,6$
O_2^{sat} , %	$99,5 \pm 0,0$	$99,6 \pm 0,03$	$99,6 \pm 0,08$
O_2^{cont} , Vol %	$17,1 \pm 0,0$	$17,1 \pm 0,05$	$17,1 \pm 0,01$

метаболизма (пирувата, молочной кислоты), закономерно и изменение показателей насыщения среды газами. Важным моментом, на наш взгляд, является то, что на конечных этапах культивирования показатели рН не достигают критического значения 6,8, при котором начинается подавление роста клеток [2], т. е. условия в культуральной системе в обеих группах оставались удовлетворительными для функционирования стромальных фибробластов.

В культурах костного мозга больных 1-й и 2-й групп выросли однослойные и многослойные колонии (рис. 1), причем существенных различий в строении колоний между исследуемыми группами не отмечено.

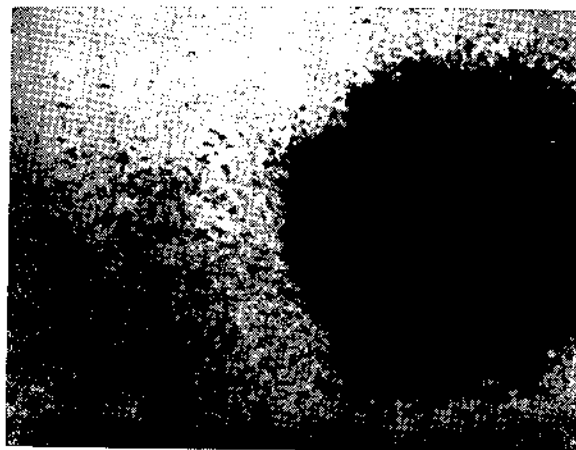


Рис. 1. Многослойная и однослойная колонии в культуре стромальных фибробластов костного мозга человека. Окр. гематоксилин-эозин. $\times 40$

Архитектоника колоний стромальных фибробластов представлена в схематическом изображении (рис. 2), а также на микрофотографиях (рис. 3, 4). Как видно, колонии имеют центральную куполообразную зону и более плоские периферийные, которые могут быть более или менее симметричными по отношению к куполообразной. В базальной час-

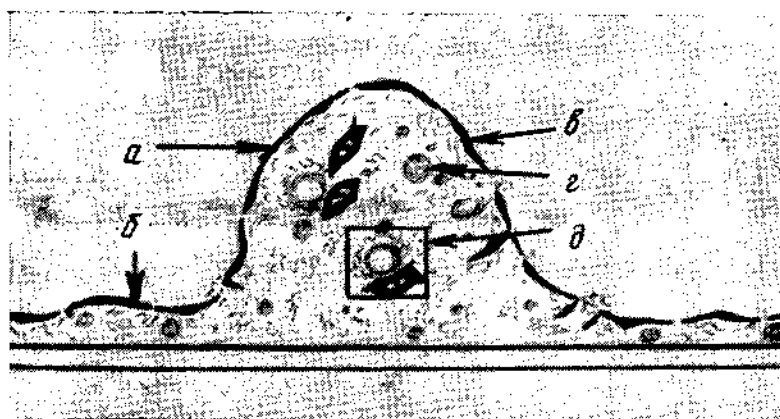


Рис. 2. Архитектоника колоний стромальных фибробластов костного мозга человека: а — центральная куполообразная зона колоний; б — периферийная зона колоний; в — поверхностный слой клеток; г — липидные глобулы в биомассе колоний; д — клетки, ассоциированные с полостями, в биомассе колонии

ти диаметр колоний составляет 1,1—0,7 мм, максимальная высота достигает 0,6—0,3 мм. Клеточные элементы сосредоточены преимущественно на поверхности колоний, формируя покровный слой, состоящий из уплощенных клеток. Поверхностный рельеф покровных клеток гладкий с наружной стороны и более сложный — с внутренней (обращенной в глубь колонии) стороны благодаря наличию небольших отростков. Иногда можно наблюдать контакты цитоплазматических отростков клеток, локализованных на поверхности и в глубине колонии. В поверхностном слое встречается черепицевидное наложение двух соседних клеток. Основную часть биомассы колоний составляют продукты клеточного метаболизма. В обширных межклеточных пространствах находятся

скопления основного вещества в виде гомогенных или мелкозернистых масс, а также волокнистые структуры. Их выход за пределы колоний отмечается лишь в фенестрированных участках поверхностного клеточного слоя. Липиды выявляются в виде рассеянных, различных по величине глобул, и занимают, по данным морфометрического анализа, от 21,4 до 37,2 % площади срезов.

В центральной части колоний обнаружены полости, контурированные липидным слоем. Топографический анализ показал, что ядросодержащие зоны фибробластов встречаются ассоциированными с подобными образованиями, при этом клеточная стенка фибробластов может

примыкать к их поверхности или клетка имеет отросток, ориентированный в их сторону (рис. 4). Вокруг подобных образований наблюдается более плотная упаковка волокнистых структур, выполняющих, несомненно, опорную роль. Основную часть ядросодержащей зоны фибробластов зани-

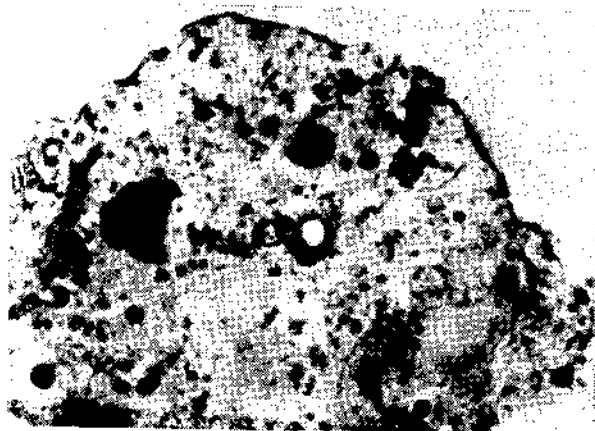


Рис. 3. Куполообразная часть колоний. $\times 200$

мает крупное ядро сложной формы с одним или двумя четкими ядрышками. Наряду с типичными фибробластами в составе колоний находятся клетки с липидными везикулами в цитоплазме. По своей морфологии они близки к молодым адипоцитам, встречающимся в паратрабекулярной зоне костного мозга. Следует отметить, что адипозные клетки располагаются как в составе покровного слоя, так и в основной биомассе колонии. Общая площадь, занимаемая кле-

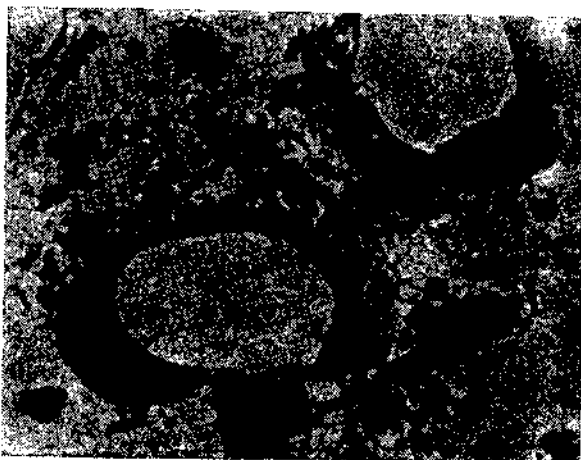


Рис. 4. Полости в куполообразной части колонии и ассоциированные с ними клетки. $\times 1000$

точными элементами (при морфометрическом анализе учитывались не только ядросодержащие зоны клеток, но и участки срезов отростков), невелика и не превышает 7 %.

В свете полученных данных является весьма спорным представление о высокой клеточности многослойных колоний с последовательным расположением клеточных слоев по сравнению с однослойными.

У нас сложилось мнение, что морфология клеток определяется, прежде всего, той функциональной ролью, которую те или иные клетки выполняют в составе колонии. Это — барьерная (защитная) функция для клеток покровного слоя, метаболическая и, не исключено, в какой-то мере опорная — для клеток в составе основной биомассы. Деталь-

ный анализ ультраструктуры клеточных элементов и состава компонентов основного вещества составляет предмет дальнейшего изучения.

Проведенное изучение колоний стромальных фибробластов костного мозга свидетельствует о том, что архитектоника колоний является более сложной, чем гипотетическое представление о чередующихся слоях в многослойных колониях с большой биомассой [5, 6]. Фактически, как организованный клеточный слой в колонии есть один, поверхностный слой клеток. В основной биомассе колонии количество клеток невелико, а их расположение носит неслучайный характер. Клетки ассоциированы с комплексами, состоящими из центральной полости, окруженной липидным слоем и волокнистым компонентом. В целом таким комплексам присущи черты участков примитивно организованной циркуляторной сети. Вероятно, благодаря ее формированию происходит перемещение культуральной жидкости и аэрация, обеспечивающие поддержание жизнедеятельности клеток внутри колонии, что и объясняет их расположение. Следует подчеркнуть, что обнаруженные признаки самоорганизации можно рассматривать как показатель сохранения КОЕф структурообразовательного потенциала и именно им, при прочих равных условиях, определяется возможность формирования колоний с большой биомассой, ранее описываемых как многослойные.

Важным моментом представляется выявление в пределах одной колонии типичных фибробластов и адипозных клеток. Это наряду с высоким содержанием липидов служит веским аргументом в пользу того, что КОЕф является клеткой-предшественником для этих типов клеток соединительной ткани.

В. С. Астахова, О. П. Настенко, О. Г. Оксамитна

ПОКАЗНИКИ КЛОНУВАННЯ ТА АРХІТЕКТОНІКА КОЛОНІЙ СТРОМАЛЬНИХ ФІБРОБЛАСТІВ КІСТКОВОГО МОЗКУ ЛЮДИНИ ПРИ ЗАХВОРЮВАННЯХ РІЗНОГО ГЕНЕЗУ

Резюме

Досліджували активність КЮФ кісткового мозку людини при гематологічних та ортопедичних захворюваннях. Вивчено також архітектоніку великих колоній.

Ефективність клонування КЮФ у хворих на воронкоподібну деформацію грудної клітки дорівнювала $55,4 \pm 2,2$ на 10^5 клітин, а у хворих з уродженим вихом стегна — $27,4 \pm 3,0$ на 10^5 клітин. У гематологічних хворих вона коливалася від 240 до 0 на 10^5 клітин.

Встановлено, що великі колонії складаються з поверхневого моношару фібробластних клітин, під якими знаходяться продукти клітинного метаболізму, малочисельні адипоцити та фібробласти, які утворюють структури з ознаками примітивної циркуляторної сітки.

V. S. Astakhova, E. P. Nastenko, O. G. Oksamitna

CLONING INDICES AND ARCHITECTONICS OF HUMAN BONE MARROW STROMAL FIBROBLAST COLONIES IN DISEASES OF VARIOUS GENESIS

Summary

It has been studied the activity of CFUf of human bone marrow in orthopedic and haematologic patients. The architectonics of large colonies was investigated too.

The cloning efficiency of CFUf of patients with funnel chest was $55,4 \pm 2,2$ among 10^5 bone marrow cells and of patients with congenital hip dislocation $27,4 \pm 3,0$ among 10^5 cells. There was the cloning efficiency of CFUf from 0 to 240 among bone marrow cells in haematologic patients.

It has been shown that large colonies consist of the surface monolayer of fibroblast's cells, the products of cell's metabolism, some adipositic cells and fibroblasts which form the primitive structure of circulation.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Астахова В. С. Сравнительная оценка ксенифидеров при клонировании стромальных фибробластов костного мозга человека // Бюл. эксперим. биологии и медицины.— 1982.— № 10.— С. 111—113.
2. Астахова В. С. Дифференцировка стромальных клеток — предшественников костного мозга в монослойной культуре // Там же.— 1985.— № 10.— С. 479—481.
3. Культура животных клеток. Методы / Под ред. Р. Фрешни.— М.: Мир, 1989.— 333 с.
4. Адамс Р. Методы культуры клеток для биохимиков.— М.: Мир, 1983.— 264 с.
5. Владимирская Е. Б., Кошель И. В., Цуря В. М. и др. Стромальные фибробласты нормального костного мозга у детей // Гематология и трансфузиология.— 1990.— № 1.— С. 3—5.
6. Greenberger J. B. The hematopoietic microenvironment. Critical rev. in oncology // Hematology.— 1991.— 11, N 1.— P. 65—84.

Укр. НИИ травматологии и ортопедии, Киев
Киев. НИИ гематологии и переливания крови

Получено 11.10.93