

В. С. Астахова, О. В. Таран, Л. М. Панченко

ГЕТЕРОГЕННІСТЬ ЛІНІЇ СТРОМАЛЬНИХ КЛІТИН-ПОПЕРЕДНИКІВ КІСТКОВОГО МОЗКУ ЛЮДИНИ

Вивчали властивості колонієутворюючих одиниць фібробластів (КУОФ) при культивуванні з фідером кроля. Лінія стромальних клітин-попередників кісткового мозку гетерогенна за своїм проліферативним потенціалом, що проявляється у різному відношенні КУОФ до фідера. Є дві фракції КУОФ: фідерзалежна, яка дає у культурах колонії тільки при додаванні фідера, а також фідернезалежна, здатна до утворення колоній у відсутності фідера. Під впливом фідера одна частина КУОФ, яка дає за звичайних умов кластер, здійснює декілька додаткових ділень і зростає до колонії, інша частина КУОФ не здатна утворювати за цих умов колонії. Гетерогенність КУОФ, з одного боку обумовлена властивостями КУОФ, а саме: їх проліферативним потенціалом, з іншого — пов'язана із впливом мікрооточення, яке створюється непримілюючою фракцією кісткомозкових клітин.

Вступ. Стромальні клітини-попередники кісткового мозку людини і тварин, які називаються колонієутворюючими одиницями фібробластів (КУОФ), мають властивості стовбурових клітин, є остеогенними клітинами-попередниками і створюють кровотворне мікрооточення для ви-зрівання стовбурових кровотворних клітин [1—3]. Експериментально доведено, що утворення ділянок кісткомозкового кровотворення у дорослому організмі настає після того, як стромальні клітини-попередники побудують кісткову тканину, яка потім заселюється стовбуровими кровотворними клітинами. Про вирішальну роль строми кісткового мозку у кровотворенні свідчить також вторинна аплазія кісткового мозку в результаті радіаційного ураження. Ця форма аплазії пов'язана із загибеллю стромальних елементів кісткового мозку у місці ураження [3].

Основним засобом вивчення властивостей стромальних клітин-попередників кісткового мозку людини є метод клонування *in vitro*. Як було встановлено раніше, додавання до культурального середовища фідера, який являє собою летально опромінені клітини кісткового мозку, значно підвищує ефективність клонування КУОФ. Причому найбільш ефективним з вивчених виявився фідер з клітин кісткового мозку кроля [4]. Стимулююча дія фідера кроля на КУОФ кісткового мозку людини виявилася значно вищою за аутологічний та алогенний. Його використання дозволило на два порядки знизити щільність експлантації клітин кісткового мозку людини. При цьому ефективність клонування КУОФ кісткового мозку людини підвищилася у 50 і більше разів [1]. Раніше при клонуванні стромальних клітин-попередників кісткового мозку людини ксеногенний фідер не застосовували і механізм його дії на КУОФ невідомий.

Метою цього дослідження було з'ясування особливостей росту колоній стромальних клітин-попередників кісткового мозку людини у присутності фідера кроля, а також знаходження відповідей на наступні питання:

1) які зміни у рості колоній КУОФ спостерігаються при додаванні ксеногенного фідера?

2) яка саме з фракцій кісткомозкових клітин (та, що прилипає або та, що не прилипає) є відповідальною за фідерний ефект?

3) гомогенною або гетерогенною є популяція КУОФ кісткового мозку людини?

Матеріали і методи. Дослідження проведено на кістковому мозку, який був одержаний з грудини, крила клубової кістки, головки і великого вертлюга стегнової кістки ортопедичних хворих. Спонгіозну кістку брали під час реконструкційно-відновлювальних операцій і поміща-

ли до стерильної пробірки. Клітини кісткового мозку добували з спонгіозної кістки шляхом вимивання у середовищі 199 на магнітній мішалці протягом 30 хв. Кількість клітин у суспензії визначали за допомогою камери Горяєва. Культивування провадили у чашках Петрі та у флаконах Ру протягом 12—14 діб. Як культуральне середовище використовували середовище 199 з додаванням 20 % сироватки крові людини АВ (IV) групи. Культури, які вирости, фіксували етанолом і фарбували за Романовським—Гімзою. Скупчення фібробластів, яке містило більше 50 клітин, вважали колонією. Скупчення менше 50 клітин нами враховувалося як кластери. Крім того, окремо фіксували кількість одношарових та багатшарових колоній.

Результати і обговорення. Величини ефективності клонування КУОф кісткового мозку людини, отримані при культивуванні з фідером та без нього, наведені у табл. 1. Як показали дослідження, у п'яти з проведених дев'яти дослідів ріст колоній при культивуванні без фідера відсутній: у культурах були поодинокі фібробласти, які не утворювали колоній. В інших чотирьох випадках ефективність клонування не перевищувала 1 на 10^5 ядерних клітин. В таких культурах спостерігалися кластери і поодинокі фібробласти, які не утворювали колоній. Це відповідає даним вітчизняної і закордонної літератури.

Таблиця 1

Ефективність клонування КУОф кісткового мозку людини за різних умов культивування

№ досліду	Ефективність клонування КУОф (10^5 ядерних клітин)	
	З фідером кроля	Без фідера
1	$32,05 \pm 0,55$	0,25
2	$44,45 \pm 0,81$	0,23
3	$21,6 \pm 0,39$	0
4	$20,5 \pm 5,1$	0
5	$0,15 \pm 0,15^*$	0
6	$47,86 \pm 3,12$	0,4
7	$56,03 \pm 4,85$	0
8	$33,05 \pm 15,75$	0
9	$14,75 \pm 5,25$	0,2

* У культурі багато кластерів, які містять до 50 клітин.

Таблиця 2

Характеристика росту колоній КУОф у культурі при клонуванні з фідером кроля і без нього

№ досліду	Кількість колоній при клонуванні з фідером		Кількість колоній і кластерів при клонуванні без фідера	
	Загальна	З них багатшарових	Загальна	З них із числом клітин 2^7
1	73	4	60	4
2	273	40	243	42
3	239	55	261	59
4	99	0	101	0
5	187	0	133	0
6	179	7	195	1
8	85	7	99	9

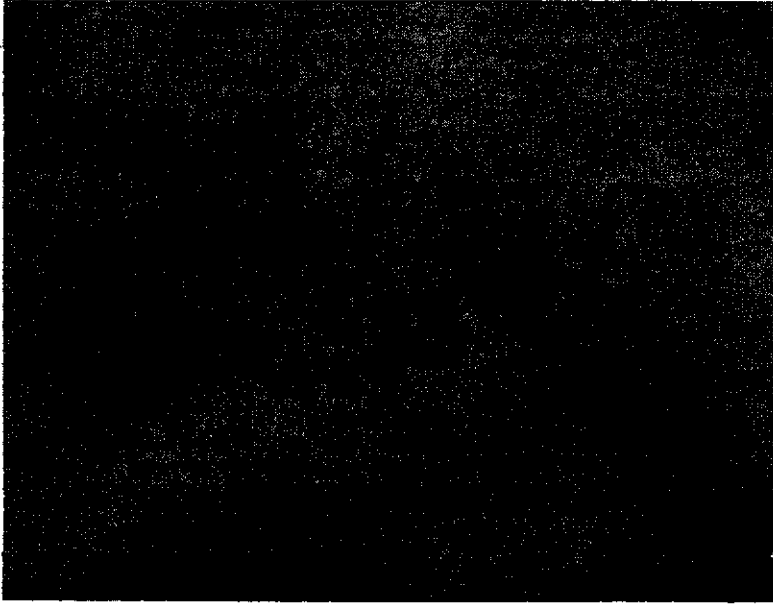
При культивуванні клітин кісткового мозку людини з фідером кроля ефективність клонування була на два порядки вищою, у флаконах зростали великі багатшарові колонії (малюнок), що свідчить про стимулюючий вплив фідера на КУОф кісткового мозку людини.

Для з'ясування питання про ступінь стимулювання КУОф клітинами фідера ми провели другу серію експериментів, в якій культивування здійснювали також з фідером і без нього у паралельних флаконах. Підраховували загальну кількість колоній, кількість багатшарових колоній і кількість кластерів. Результати дослідів наведено у табл. 2. Видно, що кількість колоній при культивуванні з фідером кроля дорівнює сумі колоній і кластерів, які зростають при культивуванні без фідера. При цьому кількість багатшарових колоній при культивуванні з фідером відповідає кількості колоній, які містять більше 2^7 клітин при рості без фідера.

Відомо, що у системі культивування, яку ми описуємо, присутні дві фракції кісткомозкових клітин: та, що прилипає, і та, що не прилипає. Для відповіді на запитання, яка саме з цих фракцій відповідальна за фідерний ефект, нами здійснена наступна серія дослідів. Клітини культивували без фідера у двох паралельних флаконах. У од-

ному з них після 2-год експозиції видаляли неприкріплені клітини, змінювали середовище і у подальшому культивували, як звичайно. Порівняння характеру росту виявило, що в усіх дослідах у флаконах з видаленою неприлипаючою фракцією не зростали ні колонії, ні кластери; були лише поодинокі клітини, які не утворювали колоній. У флаконах з невидаленою неприлипаючою фракцією зростали одношарові колонії і кластери з ефективністю клонування від 0,25 до 1 на 10^5 ядерних клітин.

Фідерний ефект, як свідчать наші досліди, обумовлений саме неприлипаючою фракцією клітин кісткового мозку, видалення якої при-



Колонія стромальних клітин-попередників кісткового мозку людини. Забарвлення за Романовським — Гімзою. Зб. у 30 разів

зводило до цілковитої втрати КУОф утворювати колонії. І раніше висувалося припущення про те, що неприлипаюча фракція кістковомозкових клітин за щільності експлантації $5 \cdot 10^5$ ядерних клітин на 1 см^2 дна культурального флакону чинить фідерний ефект [2]. Досліди, які проведено нами за більш жорстких умов при щільності експлантації $5 \cdot 10^3$ клітин на 1 см^2 дна культурального флакону, тобто на два порядки нижче, цілковито це підтвердили.

Як впливає з експериментів з кістковим мозком людини, є дві фракції стромальних клітин-попередників: фідерзалежна, що дає у культурах колонії тільки при додаванні фідера, та фідернезалежна, здатна утворювати колонії і у відсутності фідера. Причому є індивідуальні коливання. В одних осіб у кістковому мозку є присутніми обидві фракції клітин — фідерзалежна і фідернезалежна, в інших — тільки фідерзалежна фракція. У відсутності фідера стромальні клітини-попередники кісткового мозку таких людей не здатні утворювати колонії при культивуванні *in vitro*. Це, з нашої точки зору, є основною причиною того, що в усіх дослідженнях як вітчизняних, так і закордонних з клонування КУОф без фідера були низькі і нестабільні величини ефективності цього процесу [5—7, 8—10].

Якщо уявити умовну «ідеальну» колонію, де всі клітини діляться рівномірно і з однаковою швидкістю, що, звичайно, не відповідає дійсності, а є тільки зручною моделлю для математичного опису процесу, то кількість клітин у колонії буде визначатися за формулою $N=2^n$, де N — загальна кількість клітин колонії; n — число генерацій. Під генерацією у даному випадку мають на увазі потомство розділившихся

клітин, тому що вихідна клітина, ділючись, дає першу генерацію з двох клітин, вони у свою чергу — другу генерацію з чотирьох, ті третю — з восьми і т. д. Звідси неважко підрахувати, яку мінімальну кількість генерацій повинен здійснити найменший кластер, щоб стати колонією. Якщо за колонію приймати сукупність, яка налічує більше 50 клітин, то n для кластера буде менше шести, а для колонії $n \geq 6$.

Результати наших досліджень свідчать про те, що кількість колоній, які виростили у культурах з додаванням фідера, відповідає сумі колоній і кластерів, отриманих з клітин того ж кісткового мозку, який ріс без фідера. Отже, під впливом летально опромінених клітин кісткового мозку кроля стромальна клітина-попередниця, яка дає за звичайних умов кластер, здійснює декілька додаткових ділень і зростає до колонії.

Кількість багат шарових колоній у культурах з додаванням фідера відповідає числу колоній, які містять більше 2^7 клітин при культивуванні того ж самого кісткового мозку без фідера. З цього випливає, що клітина-попередниця, яка утворює без стимуляції колонію з числом клітин менше 2^7 , а тим більше кластер, не здатна утворювати багат шарову колонію навіть після стимуляції фідером. Додавання фідера до культури для утворення багат шарових колоній повинно викликати як мінімум чотири додаткові генерації. Отже, багат шарова колонія не може складатися менше ніж з 2^{11} клітин. І дійсно, при підрахунку нам не вдалося виявити багат шарової колонії, як складалася б менше ніж з 2000 фібробластів. Тому запропоновану математичну модель можна вважати за таку, що адекватно описує досліджуваний процес колонієутворення. В зв'язку з цим за даних умов культивування фідер однаковою мірою стимулює процеси росту і ділення нащадків різних КОУФ однієї й тієї ж культури.

На підставі проведених досліджень можна умовно вирізнити два типи росту колоній КОУФ: фідернезалежний, де ефект фідера виражається у стимуляції подальшого росту тих колоній і кластерів, які вже є; і фідерзалежний, де вплив фідера викликає якісні зміни в самих КУОФ, що проявляється у здатності утворювати колонії тільки у присутності фідера. Слід відмітити, що проміжні форми між цими типами росту не виявлені. Отже, той чи інший тип росту при культивуванні без фідера визначається не тільки властивостями самих КОУФ, але й особливостями мікрооточення, яке створюється не прикріпленими клітинами. Саме з останнім і пов'язаний, мабуть, факт вибіркової дії різних видів ксеногенного фідера на КОУФ кісткового мозку людини: клітини кісткового мозку кроля і шура стимулюють рост КОУФ, а морської свинки — пригнічують проліферацію та диференціювання КОУФ у культурі [11].

Таким чином встановлено, що лінія стромальних клітин-попередників кісткового мозку людини гетерогенна. Гетерогенність цієї лінії кістковомозкових клітин КОУФ обумовлена, з одного боку, властивостями самих КОУФ, а саме: їх проліферативним потенціалом, а з другого — пов'язана з впливом мікрооточення, яке утворюється неприлипаючою фракцією кістковомозкових клітин. Подальше вивчення взаємодії КОУФ людини з неприлипаючою фракцією кістковомозкових клітин *in vitro* допоможе розкрити механізм фідерного ефекту, а також з'ясувати закономірності регенерації стромі кісткового мозку за різних умов, у тому числі й при радіаційних ураженнях, що має досить важливе практичне значення.

Виходячи з вищевказаного, можна зробити такі висновки.

1. Лінія стовбурових стромальних клітин кісткового мозку людини є гетерогенною, що проявляється у різному проліферативному потенціалі КУОФ і в їх реакції на дію фідера.

2. Фідер кроля однаково впливає на ріст різних КОУФ однієї й тієї ж культури, підвищує проліферативний потенціал КУОФ, що кількісно відповідає чотирьом додатковим генераціям «ідеальної» колонії.

3. Фідерзалежний тип росту колоній у культурі забезпечується особливостями впливу неприлипаючої фракції кістковомозкових клітин на КУОФ людини.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Астахова В. С. Свойства стромальных клеток-предшественников костного мозга, при ортопедо-травматологической патологии и перспективы их клинического использования / Автореф. дис. ... д-ра мед. наук. — Киев, 1987. — С. 32.
2. Фриденштейн А. Я., Лалыкина К. С. Индукция костной ткани и остеогенные клетки-предшественники. — М.: Медицина, 1973. — 223 с.
3. Фриденштейн А. Я., Лурья Е. А. Клеточные основы кроветворного микроокружения. — М.: Медицина, 1980. — 214 с.
4. Астахова В. С. Сравнительная оценка ксеновидеров при клонировании стромальных фибробластов костного мозга // Бюл. эксперим. биологии и медицины. — 1982. — № 10. — С. 111—113.
5. Колониеобразующая способность фибробластных клеток-предшественников костного мозга у больных хроническим миелолейкозом / А. Ю. Зарицкий, И. Я. Каждан, М. А. Кулик и др. // Терапевт. архив. — 1982. — 54, № 8. — С. 120—123.
6. О некоторых факторах, влияющих на колониобразующую способность клеток костного мозга человека / А. И. Колесникова, С. К. Хоптынская, Г. Д. Байсоголов и др. // Там же. — С. 104—108.
7. К характеристике стромальных клеток-предшественников костного мозга у больных без изменений в системе крови / А. И. Колесникова, С. К. Хоптынская, Е. А. Жербин и др. // Пробл. гематологии и переливания крови. — 1978. — 23, № 11. — С. 35—38.
8. *Castro-Malaspina H.* Human bone marrow fibroblast colony forming units (CFU-F) // *Progr. Clin. Biol. Res.* — 1984. — 154, P. 209—236.
9. *Nagao T., Yamauchi K., Komatsuda M.* Serial *in vitro* bone marrow fibroblast culture in human leukemia // *Blood.* — 1983. — 62, N 6. — P. 1261—1262.
10. *In vitro* functions of stromal cells from human and mouse bone marrow / D. Zipori, N. Reichman, L. Arcavi et al. // *Exp. Hematol.* — 1985. — 13, N 7. — P. 603—609.
11. К методике клонирования стромальных клеток костного мозга человека / Н. Н. Кулагина, Е. А. Лурья, В. С. Астахова, Е. Н. Генкина // Пробл. гематологии и переливания крови. — 1981. — № 11. — P. 39—41.

Київ. НДІ ортопедії МОЗ України

Одержано 14.02.92

УДК 617.3—076:616.419

В. С. Астахова

КЛОНУВАННЯ СТРОМАЛЬНИХ КЛІТИН-ПОПЕРЕДНИКІВ З ПУЛЬПИ ЗУБА ЛЮДИНИ

З використанням методики клонування у моношарових культурах отримано колонії фібробластоподібних клітин з ефективністю клонування 9—15 на 10^5 ядерних клітин пульпи. Колонії були гетерогенними за величиною та вмістом клітин.

Провідна проблема теоретичної стоматології полягає у регенерації тканин зуба. Останнім часом велика увага приділяється дослідженню пульпи, як можливого джерела репаративних процесів зубів [1]. Розглядаючи зуб як спеціалізований кістковий орган, можна припустити, що його пульпа є аналогом кісткового мозку. Відомо, що остеогенні клітини-попередники, які походять з стромальних стовбурових клітин кісткового мозку, забезпечують регенерацію кістки у дорослому організмі [2, 3]. Тому саме у пульпі повинні знаходитися клітини з високим проліфераційним потенціалом, здатні забезпечувати регенерацію тканин зуба.

Це припущення підтверджено нами за допомогою методики клонування *in vitro*. За цією методикою клонували стромальні клітини-попередники з пульпи зубів, які видаляли, виходячи з ортопедичних показань.

© В. С. АСТАХОВА, 1992