

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

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ФИДЕРА И СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК — ПРЕДШЕСТВЕННИКОВ КОСТНОГО МОЗГА ЧЕЛОВЕКА В ПРОЦЕССЕ КЛОНИРОВАНИЯ

*Изучали взаимодействие клеток фидера и стромальных клеток-предшественников (КОЕф) человека при клонировании *in vitro*. Установлено, что КОЕф чувствительны к действию фидера только в первые 3 сут с момента эксплантации. За фидерный эффект ответственно неприлипающая фракция клеток костного мозга. Основную роль во взаимодействии фидера с КОЕф играют прямые межклеточные контакты. При их отсутствии КОЕф костного мозга теряют способность к колониеобразованию *in vitro*.*

Введение. При остеогенной дифференцировке стромальные клетки — предшественники костного мозга человека проходят ряд стадий от ранних предшественников (колониеобразующих единиц фибробластов — КОЕф) до остеобластов. Известно, что переход клеток от стадии к стадии регулируется с помощью медиаторов и гормонов, к которым относятся остеобластактивирующие факторы моноцитов и лимфоцитов, интерлейкины, простагландины, тромбоцитарные факторы, инсулин, тиреоидный и паратиреоидный гормоны и ряд других веществ [1]. Особую роль в дифференцировке клеток играет их микроокружение, т. е. прямые межклеточные контакты с другими клетками.

Фриденштейном с соавт. [2, 3] было установлено, что КОЕф животных образуют колонии при культивировании *in vitro* при плотности их эксплантации не ниже $(3-5) \cdot 10^5$ ядерных клеток на 1 см^2 дна культурального флакона. При более низких плотностях теряется линейная зависимость между числом высаженных клеток и количеством выросших колоний. Найденная закономерность была подтверждена и в отношении КОЕф костного мозга человека [4]. Устойчивость показателей клонирования не меняется, если часть живых костномозговых клеток заменена на летально облученные, т. е. фидерные, не обязательно аутологичные или аллогенные. Наиболее эффективным при клонировании КОЕф костного мозга человека оказалось добавление в культуральную систему летально облученных костномозговых клеток кролика. Добавление фидера крысы также несколько повышало эффективность клонирования КОЕф, в то время как костномозговые клетки морской свинки угнетали рост колоний КОЕф человека в культуре [5, 6].

Наши предыдущие исследования показали, что пределы колебаний плотности эксплантации фидера кролика для получения стабильных результатов и обеспечения дифференцировки КОЕф костного мозга человека *in vitro* невелики и составляют $(2-5) \cdot 10^5$ ядерных клеток на 1 см^2 дна культурального флакона. Как при более низких, так и при более высоких плотностях нарушается линейная зависимость между количеством высаженных клеток костного мозга человека и числом выросших колоний [7]. Роль других факторов во взаимодействии клеток фидера и КОЕф костного мозга человека оставалась неизвестной.

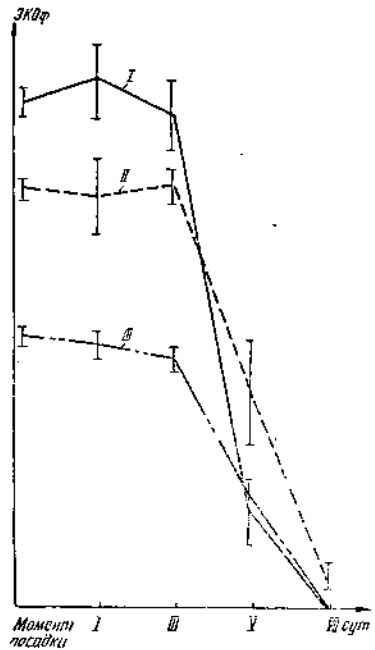
Целью настоящего исследования было выяснение ведущих факторов при взаимодействии клеток фидера кролика и КОЕф костного мозга человека в процессе клонирования.

Материалы и методы. Материалом для исследования служил костный мозг крыла подвздошной кости ортопедических больных, используемый в целях аутотрансплантации. Суспензию клеток костного мозга получали вымыванием их из спонгиозной кости в среде 199 на магнитной мешалке в течение 30 мин. Клонирование КОЕф проводили в среде 199, содержащей 20 % сыворотки человека, в течение 12—14 сут при 37 °С. Выросшие культуры фиксировали этанолом и окрашивали по Романовскому — Гимза. За колонию принимали скопление фибробластов, содержащее не менее 50 клеток.

Результаты и обсуждение. Для ответа на вопрос, во все ли сроки культивируемые КОЕф костного мозга человека одинаково чувствительны к действию фидера, проведена 1-я серия экспериментов. Клетки фидера добавляли в различные сроки с момента посадки клеток костного мозга человека. Опыты осуществляли с фидерзависимыми клетками костного мозга, т. е. с такими, которые в отсутствие фидера *in vitro* не образуют колоний [8]. Результаты представлены на рис. 1.

Как показали проведенные исследования, КОЕф костного мозга человека проявляют чувствительность к стимулирующему действию фидера только при добавлении последнего в культуральную среду в 1—3-е сут с момента их посадки. Добавление фидера на 5-е сут вызывает значительное снижение эффективности клонирования КОЕф, а при добавлении на 7-е сут они оказываются нечувствительными к действию фидера и колоний не образуют или эффективность клонирования резко падает.

Рис. 1. Эффективность клонирования КОЕф при добавлении фидера в различные сроки с момента эксплантации клеток костного мозга.



Наблюдая за ростом культуры в динамике, установлено, что в первые 2 сут в культурах появляются прикрепившиеся к стеклу клетки, находящиеся на различном, иногда довольно значительном (0,5—1 см), расстоянии друг от друга. На их поверхности, обращенной внутрь флакона, к концу первых суток наблюдаются клеточные скопления, имеющие нечеткий вид, вид «клеточного детрита». На 3-е сут количество этих скоплений достигает максимума, что совпадает с началом деления клеток. На 4—5-е сут в этих местах уже есть зародыши колоний, состоящие из 3—5 клеток (рис. 2), а на 7-е сут формируется микроколония, состоящая из 10 и более клеток (рис. 3). Клеточные скопления, находящиеся на прикрепившихся клетках, связаны с ними, но смываются средой при 3—4-кратном тщательном встряхивании. Если в первые 3 сут на прикрепившихся к стеклу клетках не формируются такие наслоения, то эти клетки в последующем, как правило, не образуют колоний: в культуре на 14-е сут были лишь единичные фибробласты. Полученные данные свидетельствуют о том, что КОЕф взаимодействуют с неприлипающей к стеклу фракцией клеток фидера и что для запуска процесса колониеобразования фидерзависимых КОЕф необходимо прямое взаимодействие между клетками фидера и КОЕф. Для подтверждения этого положения, а также ответа на вопрос, проявляет ли фидерные свойства неприлипающая фракция собственных клеток костного мозга, нами проведена 2-я серия экспериментов.

В этой серии использовали костный мозг лиц, КОЕф которых проявляют фидернезависимость, т. е. образуют мелкие колонии в отсут-

вие фидера кролика при низких плотностях эксплантации. Через 24 ч после посадки клеток, когда к стеклу прикрепляется примерно 90 % КОЕф [9], удаляли все неприкрепившиеся клетки, тщательно промывали культуру и в дальнейшем клонирование проводили в обычных условиях. Результаты исследований приведены в табл. 1.

Из представленных данных видно, что удаление из культуральной среды неприлипающих клеток костного мозга в первые сутки после их

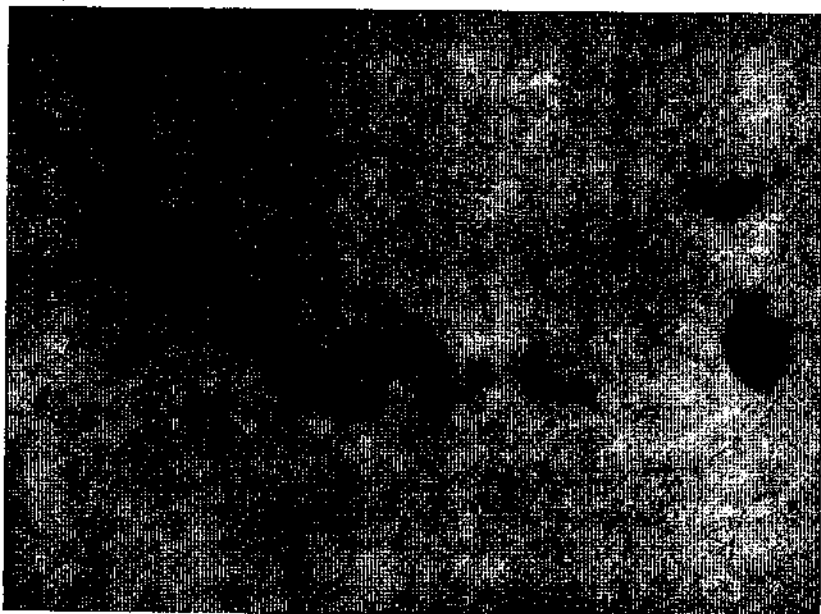


Рис. 2. Микроколония стромальных фибробластов костного мозга человека на 4-е сут культивирования. Здесь и на рис. 3—5 окраска по Романовскому—Гимза. Ув. в 200 раз

эксплантации приводит к полной потере (опыт 1 и 3) КОЕф способности к колониеобразованию или снижает ее в 10 раз (опыт 2).

Полученные результаты свидетельствуют о том, что за фидерный эффект ответственна неприлипающая к стеклу фракция клеток костного мозга, причем в роли фидерных клеток могут выступать аутологичные неприлипающие клетки.

Таблица 1
Результаты клонирования КОЕф при различных сроках удаления неприлипающей фракции

№ опыта	Количество посаженных клеток	Срок удаления неприлипающей фракции, ч	Количество выращенных колоний
1. Опыт	$5,6 \cdot 10^5$	2	0
Контроль	$5,6 \cdot 10^5$	0	249
2. Опыт	$6 \cdot 10^5$	6	1
Контроль	$6 \cdot 10^5$	0	10
3. Опыт	$7,5 \cdot 10^5$	24	0
Контроль	$7,5 \cdot 10^5$	0	2

Проведенные опыты не позволяют, однако, ответить на вопрос, какой из факторов — прямые межклеточные взаимодействия или вещества, выделяемые при разрушении клеток фидера, — играет главную роль в механизме действия фидера на КОЕф костного мозга человека. Для этого была проведена следующая серия экспериментов. Изменяя количество культуральной среды при одинаковой площади культурального флакона, в опытах снижали плотность эксплантации при сохраненной или даже повышенной концентрации клеток фидера. Результаты опытов представлены в табл. 2.

Из опытов 1 и 2 видно, что уменьшение количества питательной среды при оптимальной плотности эксплантации фидера подавляет эффективность клонирования: при фидернезависимом росте — на 31 %, при

фидерзависимом — в 1,7 раза. Снижение плотности эксплантации клеток фидера в 2 раза при сохранении их концентрации привело к падению эффективности клонирования в опыте 2 в 10 раз, а в опыте 3 — в 12,6 раза.

Ранее нами установлено, что разрушенные многократным замораживанием и оттаиванием летально облученные клетки кролика теряют свои фидерные свойства, что также подтверждает положение о ведущей роли прямых межклеточных взаимодействий КОЕф человека и фи-



Рис. 3. Микроколлония стромальных фибробластов костного мозга человека на 7-е сут культивирования. Ув. в 100 раз

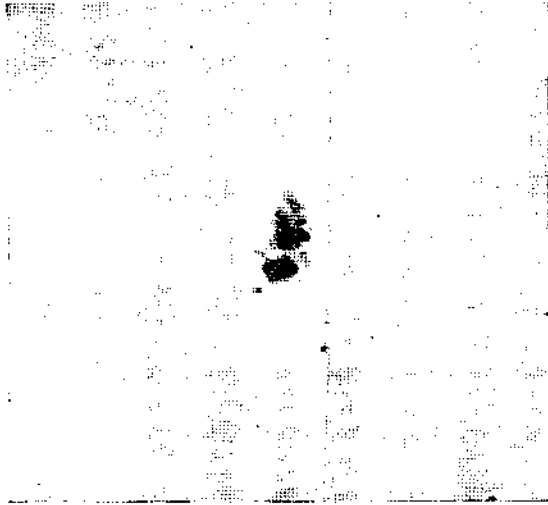
Таблица 2

Результаты клонирования КОЕф при изменении плотности эксплантации клеток фидера

№ опыта	Количество			ЭКОф*
	посаженных клеток костного мозга человека	посаженных клеток фидера	культуральной среды	
1	$7 \cdot 10^5$	$2 \cdot 10^7$	N**	31
	$7 \cdot 10^5$	$2 \cdot 10^7$	N	24
	$2,7 \cdot 10^5$	$2 \cdot 10^7$	1/2 N	19
	$2,7 \cdot 10^5$	—	1/2 N	21
2	$4,4 \cdot 10^5$	$2 \cdot 10^7$	N	5
	$4,4 \cdot 10^5$	$2 \cdot 10^7$	N	6
	$4,4 \cdot 10^5$	$2 \cdot 10^7$	N	5
	$4,4 \cdot 10^5$	—	N	0
	$4,4 \cdot 10^5$	—	1/2 N	0
	$4,4 \cdot 10^5$	$2 \cdot 10^7$	1/2 N	3
	$4,4 \cdot 10^5$	$1 \cdot 10^7$	1/2 N	0,5
3	$2 \cdot 10^5$	$2,6 \cdot 10^7$	N	106
	$2 \cdot 10^5$	$2,6 \cdot 10^7$	N	82
	$2 \cdot 10^5$	$2,6 \cdot 10^7$	N	116
	$2 \cdot 10^5$	—	N	0
	$1 \cdot 10^5$	$2,6 \cdot 10^7$	1/2 N	36
	$1 \cdot 10^5$	$1,3 \cdot 10^7$	1/2 N	8

* Эффективность колониеобразования фибробластов на 10^5 ядерных клеток костного мозга; ** N — норма.

дера в процессе клонирования. Окончательным аргументом в пользу этого положения послужили опыты, в которых через 2—3 ч после эксплантации клеток костного мозга человека в среду добавляли высокоадгезивный и нетоксичный для клеток полимер в виде порошка, а на следующие сутки — клетки фидера. В этих условиях в опытных чашках



рост колоний отсутствовал: были единичные фибробласты и небольшие кластеры по 4—5 клеток, поверхность которых была покрыта частицами полимера (рис. 4). В контроле вырастали крупные, нормальные колонии (рис. 5). Это может свидетельствовать о том, что полимер блокировал чувствительные к фидеру структуры на поверхности КОЕФ и

Рис. 4. Фибробласты с частицами полимера на поверхности, 14-е сут культивирования. Ув. в 200 раз

они потеряли способность взаимодействовать с клетками фидера.

Таким образом, проведенные исследования показывают, что при пролиферации и дифференцировке КОЕФ костного мозга человека необходимо их взаимодействие с неприлипающей к стеклу клеточной

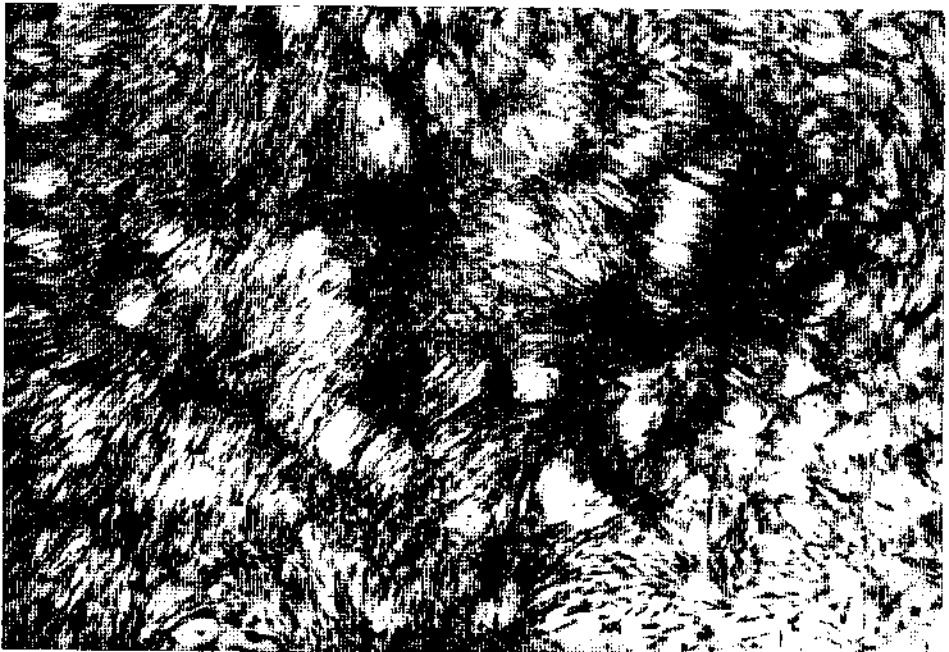


Рис. 5. Колония стромальных клеток костного мозга человека в норме, 14-е сут культивирования. Ув. в 50 раз

фракцией костного мозга. В условиях клонирования *in vitro* КОЕФ костного мозга человека способны отвечать на действие как аутологических, так и ксеногенных костномозговых фидерных клеток в первые

3 сут с момента их экплантации. В последующие фазы своего развития они эту способность теряют либо полностью, либо частично, образуя небольшие кластеры по 5—20 клеток.

Решающую роль в таком взаимодействии играет плотность экплантации клеток фидера, а не их концентрация. При наличии достаточной плотности экплантации фидера создаются оптимальные условия для непосредственного контакта его клеток и КОЕф. Это приводит к запуску механизмов, обеспечивающих деление клеток и, как следствие, образованию ими колоний. Более того, в таких условиях КОЕф получают возможность пройти остеогенную дифференцировку, свидетельством которой является построение сложных структур в колонии и отложение в них солей кальция [7, 10]. В отсутствие фидера КОЕф костного мозга человека не образуют крупных колоний со сложной архитектурой и отложениями солей кальция, хотя в фибробластах обнаруживается положительная реакция на щелочную фосфатазу.

Фидерный эффект не представляет собой чисто механического взаимодействия, а является сложным биологическим процессом. Об этом свидетельствуют следующие факты: избирательность фидерного действия костномозговых клеток различного происхождения, отсутствие фидерного эффекта у разрушенных клеток костного мозга и при блокировании поверхностных мембран КОЕф полимером. Фидерный эффект имеет универсальный характер. Так, облученные клетки крови применяются в качестве фидера при культивировании стволовых кровяных клеток [11]. Фидер, приготовленный из костномозговых клеток морской свинки, пригоден при клонировании КОЕф мышей [12]. Кроме того, в организме могут создаваться ситуации, при которых аутологические клетки костного мозга проявляют фидерные свойства. Например, при сублетальном облучении организма, применяемом для лечения некоторых гематологических заболеваний, радиочувствительные клетки будут играть роль естественного фидера по отношению к радиорезистентным, сохранившим способность к пролиферации и дифференцировке. Такая же ситуация создается и при лучевой терапии опухолей. Следовательно, дальнейшее изучение механизмов фидерного эффекта на клетки со стволовыми свойствами имеет не только теоретическое, но и большое практическое значение.

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

ВЗАЄМОДІЯ ФІДЕРУ ТА СТРОМАЛЬНИХ КЛІТИН — ПОПЕРЕДНИКІВ КІСТКОВОГО МОЗКУ ЛЮДИНИ В ПРОЦЕСІ КЛОНУВАННЯ

Резюме

Вивчали взаємодію клітин фідеру та стромальних клітин-попередників (КЮФ) кісткового мозку людини при клонуванні *in vitro*. Встановлено, що КЮФ чутливі до дії фідеру лише в перші 3 доби з моменту експлантації. За фідерний ефект відповідає неприлипаюча фракція клітин кісткового мозку. Основну роль в дії фідеру на КЮФ відіграють прямі міжклітинні контакти. За їх відсутності стромальні клітини — попередники кісткового мозку втрачають здатність до колонієутворення *in vitro*.

V. S. Astakhova, E. V. Taran, L. M. Panchenko

INTERACTION BETWEEN FEEDER AND HUMAN BONE MARROW STROMAL PRECURSOR CELLS DURING CLONING

Summary

It has been studied interaction between feeder cells and human bone marrow colony forming units of fibroblasts (CFUf) during cloning *in vitro*. It has been determined that CFUf is sensitive to action of feeder only in 1—3 days after explantation. Nonadhesive fraction of bone marrow cells is responsible for feeder effect. Direct cell-cell interactions play the principal role in the influence of feeder on CFUf. In their absence bone marrow CFUf loses the ability to form the colony.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Canalis E.* Bone related growth factors // *Triangl.*—1988.—27, N 12.—P. 11—19.
2. *Фриденштейн А. Я., Лурия Е. А.* Клеточные основы кроветворного микроокружения.—М.: Медицина, 1980.—214 с.
3. *Фриденштейн А. Я., Лалыкина К. С.* Индукция костной ткани и остеогенные клетки-предшественники.—М.: Медицина, 1973.—223 с.
4. *Астахова В. С.* Устойчивость стромальных клеток — предшественников костного мозга человека при хранении в различных условиях // *Гематология и трансфузиология.*—1987.—№ 8.—С. 40—43.
5. *Кулагина Н. Н., Лурия Е. А., Астахова В. С., Генкина Е. Н.* К методике клонирования стромальных клеток костного мозга человека // *Пробл. гематологии и переливания крови*—1981.—№ 11.—С. 39—41.
6. *Астахова В. С.* Сравнительная оценка ксенофидеров при клонировании стромальных фибробластов костного мозга человека // *Бюлл. эксперим. биологии и медицины.*—1982.—№ 10.—С. 111—113.
7. *Астахова В. С.* Клонирование стромальных фибробластов костного мозга человека с использованием ксеногенного фидера // *Стволовая клетка и опухолевый рост: Сб. науч. трудов.*—Киев: Наук. думка, 1985.—С. 120—123.
8. *Астахова В. С., Таран Е. В., Панченко Л. М.* Гетерогенность линии стромальных клеток—предшественников костного мозга человека // *Биополимеры и клетка.*—1992.—8, № 4.—С. 43—47.
9. *Чайлахян Р. К., Герасимов Ю. В., Фриденштейн А. Я.* Перенос костно-мозгового микроокружения клонами стромальных механоцитов // *Бюлл. эксперим. биологии и медицины.*—1978.—№ 12.—С. 705—707.
10. *Астахова В. С., Настенко Е. П., Оксамытная Е. Г.* Показатели клонирования и архитектоника стромальных фибробластов костного мозга человека при заболеваниях различного генеза // *Биополимеры и клетка.*—1994.—10, № 2.—С. 11—16.
11. *Mori K., Izumi H., Seto U.* Stimulation and support of haemopoietic stem cell proliferation by irradiated stroma cell colonies in bone — marrow cell culture *in vitro* // *J. Radiat. Res.*—1981.—22.—P. 109—115.
12. *Горская Ю. Ф., Фриденштейн А. Я., Голованова Т. А.* Влияние ростовых факторов на образование стромальных КОК-ф колоний в культурах костномозговых клеток мышей // *Бюлл. эксперим. биологии и медицины.*—1991.—№ 12.—С. 615—617.

УкрНИИ травматологии и ортопедии, Киев

Получено 07.06.94