

6. Сушельницкий С. И., Стойка Р. С., Кусень С. И. Влияние эпидермального фактора роста и инсулина на специфическое связывание трансформирующего фактора роста β клетками линий NRK-49F и A-549 // Цитология.— 1991.— 33, № 3.— С. 80—87.
7. Влияние трансформирующего фактора роста β -типа и его комбинаций с эпидермальным фактором роста и инсулином на субстратнезависимую пролиферацию нормальных и опухолевых клеток / С. И. Сушельницкий, Р. С. Стойка, С. И. Гарасько и др. // Там же.— 1989.— 31, № 7.— С. 767—774.
8. Стойка Р. С., Сушельницкий С. И., Кусень С. И. Влияние трансформирующего фактора роста β на интенсивность синтеза ДНК клеток в зависимости от их типа и условий культивирования // Там же.— 1990.— 32, № 2.— С. 132—139.
9. *Density-dependent* regulation of growth of BSC-1 cells in cell culture: Control of growth by serum factors/R. W. Holley, R. Armour, J. H. Baldwin et al. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.— 1977.— 74, N 12.— P. 5046—5050.
10. Rosenfeld R. G., Dollar L. A., Conover C. A. Density-associated loss of functional receptors for somatomedin-C/insulin-like growth factor I. (SM-C/IGF-I) on cultured human fibroblast monolayers // J. Cell. Physiol.— 1984.— 121, N 4.— P. 419—424.
11. Стойка Р. С., Кусень С. И. Трансформирующий фактор роста β — новый тип ингибитора пролиферации нормальных и опухолевых клеток // Молекуляр. биология.— 1990.— 24, № 4.— С. 897—908.

Львов, отделение Ин-та биохимии
им. А. В. Палладина АН Украины

Получено 04.01.92

УДК 617.3—076:616.419

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

ГЕТЕРОГЕННОСТЬ ЛИНИИ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК-ПРЕДШЕСТВЕННИКОВ КОСТНОГО МОЗГА ЧЕЛОВЕКА

Изучали свойства колониеобразующих единиц фибробластов (КОЕф) при культивировании с фидером кролика. Линия стромальных клеток-предшественников костного мозга гетерогенна по своему пролиферативному потенциалу, что проявляется в различном отношении КОЕф к фидеру. Имеются две фракции КОЕф: фидерзависимая, дающая в культурах колонии только при добавлении фидера, и фидернезависимая, способная образовывать колонии в отсутствие фидера. Под воздействием фидера одна часть КОЕф, дающая в обычных условиях кластер, совершает несколько дополнительных делений и вырастает до колонии, другая часть КОЕф не способна образовывать в этих условиях колонии. Гетерогенность КОЕф с одной стороны, обусловлена свойствами самих КОЕф, а именно: их пролиферативным потенциалом, с другой — связана с влиянием микроокружения, создаваемого непрлипающей фракцией костномозговых клеток.

Введение. Стромальные клетки-предшественники костного мозга человека и животных, именуемые колониеобразующими единицами фибробластов (КОЕф), имеют свойства стволовых клеток, являются остеогенными клетками-предшественниками и создают кроветворное микроокружение для созревания стволовых кроветворных клеток [1—3]. Экспериментально доказано, что образование участков костномозгового кроветворения во взрослом организме наступает после того, как стромальные клетки-предшественники построят костную ткань, которая затем заселяется стволовыми кроветворными клетками. На решающую роль стромы костного мозга в кроветворении указывает также вторичная аплазия костного мозга в результате радиационного поражения. Эта форма аплазии связана с гибелью стромальных элементов костного мозга в месте поражения [3].

Основным способом изучения свойств стромальных клеток-предшественников костного мозга человека является метод клонирования *in vitro*. Как установлено ранее, добавление в культуральную среду фидера, представляющего собой ластально облученные клетки костного мозга, значительно повышает эффективность клонирования КОЕф. Причем наиболее эффективным из изученных оказался фидер из кле-

© В. С. АСТАХОВА, Е. В. ТАРАН, Л. М. ПАНЧЕНКО, 1992

ток костного мозга кролика [4]. Стимулирующее действие фидера кролика на КОЕФ костного мозга человека оказалось значительно выше, чем аутологичного и аллогенного. Его применение позволило на два порядка снизить плотность эксплантации клеток костного мозга человека. При этом эффективность клонирования КОЕФ костного мозга человека повысилась в 50 и более раз [1]. Ранее при клонировании стромальных клеток-предшественников костного мозга человека ксеногенный фидер не применяли и механизм его действия на КОЕФ неизвестен.

Цель настоящего исследования состояла в выяснении особенностей роста колоний стромальных клеток-предшественников костного мозга человека в присутствии фидера кролика, а также в нахождении ответов на следующие вопросы:

1) какие изменения в росте колоний КОЕФ наблюдаются при добавлении ксеногенного фидера?

2) какая из фракций костномозговых клеток, прилипающая или неприлипающая, ответственна за фидерный эффект?

3) гомогенна или гетерогенна популяция КОЕФ костного мозга человека?

Материалы и методы. Исследование проведено на костном мозге, полученном из грудной, крыла подвздошной кости, головки и большого вертела бедренной кости ортопедических больных. Спонгиозную кость брали во время реконструктивно-восстановительных операций и помещали в стерильную пробирку. Клетки костного мозга извлекали из спонгиозной кости вымыванием в среде 199 на магнитной мешалке в течение 30 мин. Количество клеток в суспензии определяли при помощи камеры Горяева. Культивирование проводили в чашках Петри и во флаконах Ру в течение 12—14 сут. В качестве культуральной среды использовали среду 199 с добавлением 20% сыворотки крови человека АВ (IV) группы. Выросшие культуры фиксировали этанолом и окрашивали по Романовскому—Гимза. Скопление фибробластов, содержащее более 50 клеток, считали колонией. Скопление менее 50 клеток нами учитывалось как кластеры. Кроме того, отдельно фиксировали количество однослойных и многослойных колоний.

Результаты и обсуждение. Величины эффективности клонирования КОЕФ костного мозга человека, полученные при культивировании с фидером кролика и без него, представлены в табл. 1. Как показали исследования, в пяти из проведенных девяти опытов рост колоний при культивировании без фидера отсутствовал: в культурах отмечены единичные фибробласты, не образующие колоний. В остальных четырех слу-

Таблица 1
Эффективность клонирования КОЕФ костного мозга человека при различных условиях культивирования

№ опыта	Эффективность клонирования КОЕФ (10 ⁴ ядерных клеток)	
	С фидером кролика	Без фидера
1	32,05±0,55	0,25
2	44,45±8,81	0,23
3	20,5±5,1	0
4	21,6±0,39	0
5	0,15±0,15*	0
6	47,86±3,12	0,4
7	56,03±4,85	0
8	33,05±15,75	0
9	14,75±5,25	0,2

* В культуре много кластеров, содержащих до 50⁰ клеток.

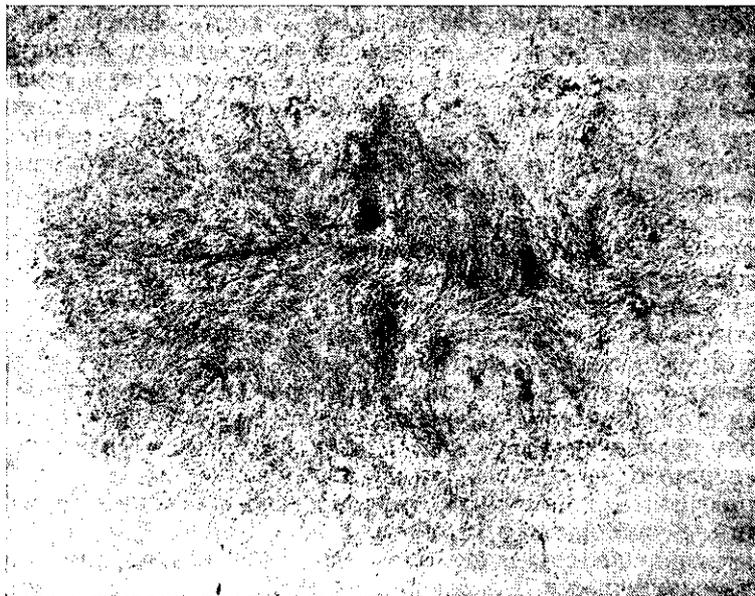
Таблица 2
Характеристика роста колоний КОЕФ в культуре при клонировании с фидером кролика и без него

№ опыта	Количество колоний при клонировании с фидером		Количество колоний и кластеров при клонировании без фидера	
	Общее	Из них многослойных	Общее	Из них с числом клеток 2 ⁷
1 ⁰	73	4	66	4
2	273 ⁰	40	243	42
3	239	55	261	59
4	99	0	101	0
5	187	0	133 ⁰	0
6	179	7	195	1
8	85	7	99	9

чаях эффективность клонирования не превышала 1 на 10^5 ядерных клеток. В таких культурах наблюдались кластеры и единичные фибробласты, не образующие колоний. Это соответствует данным отечественной и зарубежной литературы.

При культивировании клеток костного мозга человека с фидером кролика эффективность клонирования была на два порядка выше, во флаконах вырастали крупные многослойные колонии (рисупок), что свидетельствует о стимулирующем влиянии фидера на КОЕф костного мозга человека.

Для выяснения вопроса о степени стимулирования КОЕф клетками фидера нами проведена вторая серия экспериментов, в которой куль-



Колония стромальных клеток-предшественников костного мозга человека. Окраска по Романовскому - Гимза. Ув. в 30 раз

тивирование осуществляли также с фидером и без него в параллельных флаконах. Подсчитывали общее количество колоний, число многослойных колоний и количество кластеров. Результаты опытов представлены в табл. 2. Как видно, количество колоний при культивировании с фидером кролика равно сумме колоний и кластеров, вырастающих при культивировании без фидера. При этом число многослойных колоний при культивировании с фидером соответствует количеству колоний, содержащих более 2^7 клеток при росте без фидера.

Известно, что в описываемой системе культивирования присутствуют две фракции костномозговых клеток: прилипающая и неприлипающая. Для ответа на вопрос, какая из этих фракций ответственна за фидерный эффект, нами выполнена следующая серия опытов. Клетки культивировали без фидера в двух параллельных флаконах. В одном из флаконов после 2-4 экспозиции удаляли неприкрепившиеся клетки, меняли среду и в дальнейшем культивировали, как обычно. При сравнении характера роста оказалось, что во всех опытах во флаконах с удаленной неприлипающей фракцией не вырастали ни колонии, ни кластеры; определялись лишь единичные клетки, не образующие колоний. Во флаконах с не удаленной неприлипающей фракцией вырастали однослойные колонии и кластеры с эффективностью клонирования от 0,25 до 1 на 10^5 ядерных клеток.

Фидерный эффект, как свидетельствуют наши опыты, обусловлен неприлипающей фракцией клеток костного мозга, удаление которой приводило к полной потере способности КОЕф образовывать колонии.

И ранее высказывалось предположение о том, что неприлипающая фракция костномозговых клеток при плотности эксплантации $5 \cdot 10^5$ ядерных клеток на 1 см^2 дна культурального флакона оказывает фидерный эффект [2]. Опыты, проведенные нами в более жестких условиях при плотности эксплантации $5 \cdot 10^3$ клеток на 1 см^2 дна культурального флакона, т. е. на два порядка ниже, это полностью подтвердили.

Как следует из экспериментов с костным мозгом человека, имеются две фракции стромальных клеток-предшественников: фидерзависимая, дающая в культурах колонии только при добавлении фидера, и фидернезависимая, способная образовывать колонии и при отсутствии фидера. Причем имеются индивидуальные колебания. У одних лиц в костном мозге присутствуют обе фракции клеток — фидерзависимая и фидернезависимая, у других — только фидерзависимая фракция. При отсутствии фидера стромальные клетки-предшественники костного мозга таких людей не способны образовывать колоний при культивировании *in vitro*. Это, с нашей точки зрения, и есть основной причиной того, что во всех исследованиях как отечественных, так и зарубежных по клонированию КОЕф без фидера были получены низкие и нестабильные величины эффективности этого процесса [5—7, 8—10].

Если представить условную «идеальную» колонию, где все клетки делятся равномерно и с одинаковой скоростью, что, естественно, не соответствует действительности, а является собой только удобную модель для математического описания процесса, то количество клеток в колонии будет определяться по формуле $N=2^n$, где N — общее число клеток колонии; n — число генераций. Под генерацией в данном случае понимается потомство разделившихся клеток, так как исходная клетка, делясь, дает первую генерацию из двух клеток, они в свою очередь — вторую генерацию из четырех, те третью — из восьми и т. д. Отсюда нетрудно посчитать, какое минимальное число генераций должен пройти наименьший кластер, чтобы стать колонией. Если за колонию принимать скопление, состоящее более чем из 50 клеток, то n для кластера будет меньше шести, а для колоний $n \geq 6$.

Результаты наших исследований свидетельствуют о том, что количество колоний, выросших в культурах с добавлением фидера, соответствует сумме колоний и кластеров, полученных из клеток того же костного мозга, выросшего без фидера. Следовательно, под воздействием летально облученных клеток костного мозга кролика стромальная клетка-предшественница, дающая в обычных условиях кластер, совершает несколько дополнительных делений и вырастает до колонии.

Количество многослойных колоний в культурах с добавлением фидера соответствует числу колоний, содержащих более 2^7 клеток при культивировании того же костного мозга без фидера. Из этого следует, что клетка-предшественница, образующая без стимуляции колонию с числом клеток менее 2^7 , а тем более кластер, не способна образовывать многослойную колонию даже после стимуляции фидером. Добавление фидера в культуру для образования многослойных колоний должно вызывать как минимум четыре дополнительных генерации. Значит, многослойная колония не может состоять менее чем из 2^{11} клеток. И действительно, при подсчете клеточности нам не удалось обнаружить многослойной колонии, состоящей менее чем из 2000 фибробластов. Поэтому предложенную математическую модель можно считать адекватно описывающей изучаемый процесс колониеобразования. В связи с этим в данных условиях культивирования фидер в одинаковой степени стимулирует процессы роста и деления потомков разных КОЕф одной и той же культуры.

На основании проведенных исследований можно условно выделить два типа роста колоний КОЕф: фидернезависимый, где эффект фидера выражается в стимуляции уже имеющихся колоний и кластеров к дальнейшему росту; и фидерзависимый, где влияние фидера вызывает ка-

чественные изменения в самих КОЕФ, что проявляется в способности образовывать колонии только в присутствии фидера. Следует отметить, что промежуточные формы между этими типами роста не обнаружены. Следовательно, тот или иной тип роста при культивировании без фидера определяется не только свойствами самих КОЕФ, но и особенностями микроокружения, создаваемого неприкрепившимися клетками. Именно с последним связан, очевидно, и факт избирательного действия различных видов ксеногенного фидера на КОЕФ костного мозга человека: клетки костного мозга кролика и крысы стимулируют рост КОЕФ, а морской свинки — угнетают пролиферацию и дифференцировку КОЕФ в культуре [11].

Таким образом, установлено, что линия стромальных клеток-предшественников костного мозга человека гетерогенна. Гетерогенность этой линии костномозговых клеток КОЕФ обусловлена, с одной стороны, свойствами самих КОЕФ, а именно: их пролиферативным потенциалом, а с другой — связана с влиянием микроокружения, создаваемого неприлипающей фракцией костномозговых клеток. Дальнейшее изучение взаимодействия КОЕФ человека с неприлипающей фракцией костномозговых клеток *in vitro* поможет раскрыть механизм фидерного эффекта, а также выяснить закономерности регенерации стромы костного мозга в различных условиях, в том числе и при радиационных поражениях, что имеет немаловажное практическое значение.

В заключение представляется возможным сделать следующие выводы.

1. Линия стволовых стромальных клеток костного мозга человека является гетерогенной, что проявляется в различном пролиферативном потенциале КОЕФ и в их реакции на действие фидера.

2. Фидер кролика одинаково влияет на рост различных КОЕФ одной и той же культуры, повышает пролиферативный потенциал КОЕФ, что количественно соответствует четырем дополнительным генерациям «идеальной» колонии.

3. Фидерзависимый тип роста колоний в культуре обеспечивается особенностями влияния неприлипающей фракции костномозговых клеток на КОЕФ человека.

Summary. It has been studied the characteristics of the colony forming units of fibroblast (CFUf) by cultivation with rabbit feeder. The line of stromal precursor cells of human bone marrow is heterogenic as to its proliferative potential that is manifested with various attitude of CFUf to feeder. There are 2 fractions of CFUf: feeder dependent, forming the colonies in culture, forming the colonies in culture only with the addition of feeder and feeder independent forming the colonies without feeder. One part of CFUf forming in ordinary condition clusters, makes some additional divisions and grows to a colony, the second part of CFUf has no ability to form colonies in such condition. The heterogeneity of CFUf causes on the one hand the properties of CFUf itself, that is their proliferative potential, and on the other hand depends on the influence of microenvironment, creating by unadhesive fraction of bone marrow cells.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

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 клеточного 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, Н. 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. Гепкина // Пробл. гематологии и переливания крови.— 1981.— № 11.— С. 39—41.

Киев. НИИ ортопедии МЗ Украины

Получено 14.02.92

УДК 617.3—076:616.419

В. С. Астахова

КЛОНИРОВАНИЕ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК-ПРЕДШЕСТВЕННИКОВ ИЗ ПУЛЬПЫ ЗУБА ЧЕЛОВЕКА

Используя методику клонирования, в многослойных культурах получены колонии фибробластоподобных клеток с эффективностью клонирования 9—15 на 10^5 ядерных клеток пульпы. Колонии были гетерогенными по величине и содержанию клеток.

Вопросы регенерации тканей зуба являются ведущей проблемой теоретической стоматологии. В последнее время большое внимание уделяется исследованию пульпы как возможного источника репаративных



Рис. 1. Однослойная колония фибробластоподобных клеток пульпы зуба человека. Окраска по Романовскому — Гимза. Ув. в 30 раз

процессов зубов [1]. Из рассмотрения зуба в качестве специализированного костного органа следует, что его пульпа является аналогом костного мозга. Известно, что остеогенные клетки-предшественники, происходящие из стромальных стволовых клеток костного мозга, обе-

© В. С. АСТАХОВА, 1992