

Феномен формирования мезенхимальных островков из клеток костного мозга мышей в системе in vitro

Шахов В.П., Кокарев О.В., Попов С.В., Афанасьев С.А., Байков А.Н.

Phenomenon of mesenchymal islet formation from rat marrow cells in vitro

Shakhov V.P., Kokarev O.V., Popov S.V., Afanasyev S.A., Baikov A.N.

НИИ кардиологии ТНЦ СО РАМН, г. Томск

НИИ онкологии ТНЦ СО РАМН, г. Томск

Сибирский государственный медицинский университет, г. Томск

© Шахов В.П., Кокарев О.В., Попов С.В. и др.

В работе предпринята попытка экспериментально проверить возможность существования у мезенхимальных клеток костного мозга структурно-функциональных единиц, подобных гемопоэтическим и эритробластическим островкам. Проведены опыты по длительному (in vitro) культивированию адгезирующих элементов костного мозга мышей.

Установлено, что начиная с 6-х сут наблюдений в культуре формируются специфические клеточные образования, имеющие островковоподобную структуру. В центре располагается эпителиоидная клетка, окруженная округлыми элементами. К 12—14-м сут количество мезенхимальных островков достигает максимума (до $46,0 \cdot 10^6$ клеток), после чего постепенно снижается, и они практически исчезают к 24-м сут. Островки входят в состав мезенхимных колоний.

Авторами высказано предположение, что данные образования представляют собой структурно-функциональную единицу мезенхимопоэза, в которой протекают процессы пролиферации и дифференцировки мезенхимальных стволовых клеток и их ближайших потомков.

Ключевые слова: мезенхимальные островки, стволовые клетки, культура ткани, костный мозг, мезенхимопоэз.

An attempt to check experimentally the possibility of structure functional units existence in mesenchymal cells, similar to hemopoetic and erythroblastic islets, has been made. Experiments on long (in vitro) cultivation of adhesive rat marrow elements have been made.

It has been found that from the 6 day of observation there were specific cell formations with islet-like structure in the culture. An epithelioid cell surrounded by round elements was situated in the center. Up to 12-14 days the number of mesenchymal islets reached its maximum (up to $46,0 \cdot 10^6$ cells), after that it decreased gradually and up to 24 days it almost disappeared.

The islets were a part of mesenchymal colonies. The authors suppose that these formations are structure functional units of mesenchymopoiesis where proliferation and differentiation processes of mesenchymal stem cells and their closest sons proceed.

Key words: mesenchymal islets, stem cells, tissue culture, marrow, mesenchymopoiesis.

УДК 616 – 006.3:616.419–092.4

Введение

В биологических тканях с высоким пролиферативным потенциалом существуют сложные, специфические структуры, в которых организованно протекают процессы пролиферации и дифференцировки прогенераторных клеток-

предшественниц. Как правило, они состоят из центральной регуляторной клетки, которую окружают элементы с высоким пролиферативным потенциалом. Еще в исследованиях, выполненных М. Bessis (1963), было показано, что в костном мозге существуют специфические структурно-функциональные комплексы, состоящие из цен-

тральной клетки (макрофага) и окружающих ее эритроидных элементов различной степени зрелости [6]. В настоящее время считается, что в них происходит процесс созревания элементов красной крови, начиная от эритроидных колониеобразующих единиц и заканчивая ретикулоцитами [2]. При этом макрофаг выполняет роль своеобразного дирижера, контролирующего процессы пролиферации и дифференцировки окружающих его эритроидных элементов. Существование аналогичных клеточных систем было описано и для миелоидных клеток [7]. Ранее нами было установлено, что не только макрофаг, но и фибробласт может выполнять роль центральной регулирующей клетки [1, 3]. При этом гемопоэтические островки, введенные в селезенку летально облученных мышей, способны формировать колонии, включающие многочисленные островки различной степени зрелости [4]. Это свидетельствует о том, что происходит согласованная репликация не только гемопоэтического, но и стромального компонентов. Возможно, этот процесс происходит с участием мезенхимальных стволовых клеток (МСК), которые, как хорошо известно, способны образовывать и кроветворные, и стромальные элементы. По всей видимости, родоначальные клетки способны формировать структурно-функциональные комплексы в виде островково-подобных образований. Теоретически можно предположить, что МСК тоже способны образовывать подобные структуры. Однако проследить этот процесс *in situ* чрезвычайно сложно в силу того, что данная клеточная популяция во взрослом организме достаточно малочисленна [9]. В связи с этим мы поставили перед собой цель определить принципиальную возможность этого явления в условиях *in vitro* на культуре с высоким содержанием мезенхимальных клеток.

Материал и методы

Опыты были проведены на 20 мышах-самцах линии СВА массой 18—20 г. Условия их содержания и проведение экспериментов соответствовали «Правилам проведения работ с использованием экспериментальных животных» (Приложение к приказу Минздрава СССР № 755 от 12.08.1977 г.). Животных забивали методом смещения шейных

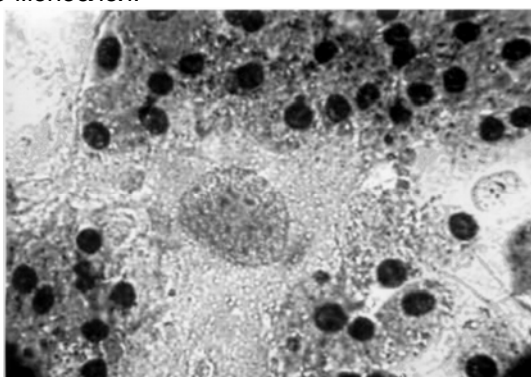
позвонков, после чего в стерильных условиях извлекали бедренную кость. Костный мозг вымывали с помощью шприца во флаконы. После получения гомогенной взвеси определяли клеточность и жизнеспособность с помощью трипанового синего [1]. Концентрацию клеток доводили до $1\text{--}2 \cdot 10^6/\text{мл}$ полной среды и разливали по 20 мл в пластиковые флаконы (50 мл) производства фирмы «Falcon». В качестве полной среды использовали: 80% среды DI-MEM, 20% эмбриональной телячьей сыворотки, 10^{-7} М дексаметазона, 250 мг/л L-глутамина, 50 мкг/мл аскорбат-2-фосфата, 5 мкг/мл инсулина, 100 ЕД/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина (все реактивы производства фирмы «Sigma»). Клетки культивировали в CO_2 -инкубаторе при температуре 37 °С, 100% влажности и 5% CO_2 . Через 3 сут надосадочную жидкость удаляли и заменяли свежей порцией полной среды. Дальнейшее культивирование продолжали в течение 24 сут с заменой среды через каждые 6 сут. Периодически проводили забор материала с проведением фазово-контрастной микроскопии, прижизненной окраской нейтральным красным, окраской по Романовскому—Гимзе, проведением цитохимической реакции на щелочную фосфатазу [1]. Статистическую обработку проводили по методу Стьюдента.

Результаты и обсуждение

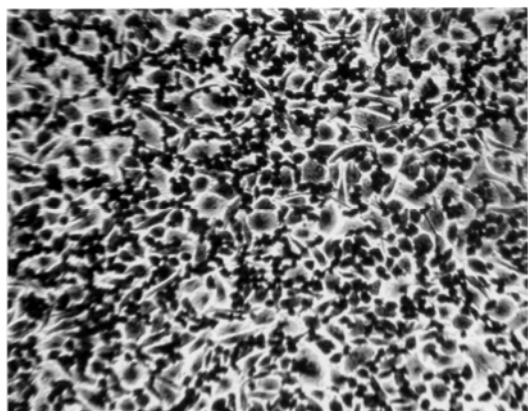
В процессе культивирования было установлено, что уже к 6-м сут преобладающими элементами были так называемые округлые клетки [7], которые к 12-м сут трансформировались в различные клеточные линии. Среди них преобладали фибробластоподобные ($28,3 \pm 3,4\%$) и округлые клетки ($21,2 \pm 2,2\%$). Были обнаружены хондроциты ($18,9 \pm 3,7\%$), мышечные элементы ($14,0 \pm 2,9\%$), нервные ($9,7 \pm 3,1\%$), эпителиоподобные ($4,1 \pm 1,2\%$) и недифференцированные клетки ($3,8 \pm 0,5\%$). Колонии в культуре стали формироваться начиная с 6-х сут ($4,3 \pm 3,3 \cdot 10^6$) и к 12—14-м сут их количество достигло максимума ($20,1 \pm 7,3 \cdot 10^6$), после чего они начинали сливаться и формировать монослой. Во многом аналогичные данные получены и другими авторами [5, 7, 8].

Известно, что мезенхимальные клетки способны в системе *in vitro* формировать мезенхи-

мальные островки (МО). В нашем исследовании начиная с 6-х сут в культуре наблюдались микроанатомические структуры, состоящие из крупной центральной клетки, окруженной короной округлых клеток (рис. 1). Было обращено внимание на то, что, во-первых, центральная клетка, по-видимому, не являлась ни макрофагом, ни фибробластом и имела эпителиоподобную структуру, а во-вторых, количество округлых клеток, формирующих корону вокруг эпителиоподобного элемента, варьировало от 3 до 50 кариоцитов. Наличие дозовой зависимости между количеством пассируемых клеток и количеством МО свидетельствует об их клональной природе (см. таблицу). По нашим данным, максимальное увеличение числа МО приходится на 12—14-е сут культивирования. МО входят в состав мезенхимальных колоний. Это чрезвычайно лабильные структуры, имеющие относительно короткий период жизни, и после созревания окружающих их клеток распадаются к 20—24-м сут наблюдения. Это время совпадает со временем исчезновения колоний и формированием клеточного монослоя.



а



б

Рис. 1. Мезенхимальный островок, ув. 900 (а); фрагмент колонии, состоящей из многочисленных мезенхимальных островков, окруженных клетками различной степени зрелости, выросших из адгезирующих клеток костного мозга мышей линии СВА на 14-е сут культивирования *in vitro*, ув. 200 (б). Окраска по Романовскому—Гимзе

Дозовая зависимость между количеством вводимых в культуру клеток и числом образовавшихся мезенхимальных островков на 6, 12 и 24-е сут инкубации ($\bar{X} \pm m$)

Количество вводимых клеток, $10^6/\text{мл}$	Время культивирования, сут		
	6	12	24
1,2	$0,1 \pm 0,02$	$17,0 \pm 0,9$	0
3,1	$0,8 \pm 0,1$	$39,3 \pm 2,1^*$	$0,3 \pm 0,1$
5,7	$1,5 \pm 0,9^*$	$46,0 \pm 1,9^*$	$1,4 \pm 0,7^*$

* $p_t < 0,05$.

С позиции биологической целесообразности это вполне оправданно, так как ограничивает процесс появления в организме чрезмерного количества прогенераторных клеток с высоким пролиферативным потенциалом. По аналогии с уже выявленными структурами — эритроидными и гемопоэтическими островками — можно предположить, что МО также представляют собой структурно-функциональную единицу, в которой под контро-

лем центральной клетки протекают процессы пролиферации и дифференцировки мезенхимальных стволовых клеток или их коммитированных потомков. Вопрос о возможности существования подобных структур в живом организме как в эмбриогенезе, так и постнатальном периоде в норме и патологии остается открытым и требует самостоятельного и более углубленного изучения.

Выводы

1. Представленные данные свидетельствуют о том, что мезенхимальные островки могут образовываться в системе *in vitro*.

2. Эти образования состоят из центральной эпителиоидной клетки, окруженной округлыми кариоцитами в количестве от 3—6 до 18—20.

3. Период жизни мезенхимальных островков *in vitro* короток и не превышает 18 сут, совпадает с периодом формирования и созревания колоний. Этого времени достаточно для образования более дифференцированных элементов.

Литература

1. Гольдберг Е.Д., Дыгай А.М., Шахов В.П. Методы культуры ткани в гематологии. Томск: Изд-во Том. ун-

Экспериментальные и клинические исследования

- та, 1992. 287 с.
2. Захаров Ю.М., Рассохин А.Г. Эритробластический островок. М.: Медицина, 2002. 240 с.
3. Шахов В.П. К вопросу о роли гемопоэтических островков в развитии феномена стимуляции костномозгового кроветворения при стрессе // Гематол. и трансфузиол. 1988. Т. 33. № 5. С. 19—21.
4. Шахов В.П., Карлов А.В., Шахова С.С., Курилов И.Н. Репликация гемопоэтических островков в культуре ткани *in vivo* // Цитология. 1999. Т. 41. № 3. С. 324—325.
5. Шумаков В.И., Онищенко Н.А., Крашенинников М.Е. и др. Дифференцировка стромальных стволовых клеток костного мозга в кардиомиоцитоподобные клетки у различных видов млекопитающих // Бюллетень эксп. биол. и мед. 2003. Т. 135. № 4. С. 461—465.
6. Bessis M.C. Cytological aspects of hemoglobin production // The Harvey Lectures, ser. 58. N.Y. — London: Academic Press. 1963. P. 21.
7. Crocker P., Gordon S. Isolation and characterization of resident stromal macrophages and haematopoietic cells clusters from mouse bone marrow // J. Exp. Med. 1985. V. 162. № 9. P. 993—1014.
8. Grigoriadis A.E., Heersche J., Aubin J.E. Differentiation of muscle, fat, cartilage and bone from progenitor cells present in bone-derived clonal cell population: effect of dexamethasone // J. Cell. Biol. 1988. V. 106. P. 27—38.
9. Pittenger M.F., Mackay A.M., Beck S.C. et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells // Science. 1999. V. 284. P. 143.

Поступила в редакцию 08.12.2003 г.