

КЛЕТОЧНАЯ ДИФФЕРЕНЦИРОВКА И ПРОЛИФЕРАЦИЯ

УДК 577.17:591.82:57.053

НЕАДГЕЗИВНЫЕ ПОПУЛЯЦИИ В КУЛЬТУРАХ МЕЗЕНХИМНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК ИЗ КРОВЕТВОРНЫХ ОРГАНОВ КРЫСЫ И МЫШИ¹

© 2008 г. Э. И. Буеверова, Е. В. Брагина, Е. А. Молчанова

Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН

119334 Москва, ул. Вавилова, д. 26

E-mail: bueverova_e@mail.ru

Поступила в редакцию 11.02.08 г.

Окончательный вариант получен 05.05.08 г.

Проведенное изучение адгезивных свойств полипотентных мезенхимных стромальных клеток, определяемых по содержанию колониеобразующих единиц фибробластов костного мозга половозрелых крыс и мышей в популяциях клеток прикрепившихся и не прикрепившихся к культуральному пластику от 2 ч до 7 сут *in vitro*, выявило сходство, и различие между ними. В обоих случаях происходит максимальное увеличение числа колониеобразующих единиц фибробластов в составе адгезивной популяции на 7-е сут культивирования *in vitro*, но колониеобразующие единицы фибробластов костного мозга мыши из неадгезивной популяции этого срока практически отсутствовали. Число колоний из неадгезивной популяции костного мозга крысы на 7-е сут культивирования, напротив, значительно возросло, и эта неадгезивная популяция при более длительном времени культивирования стала источником последующих неадгезивных субпопуляций, содержащих колониеобразующие единицы фибробластов. Показано, что в суспензии клеток, выделенных из печени 17-суточных плодов крысы, спустя 7 сут культивирования *in vitro* также остается фракция не прикрепившихся к пластику колониеобразующих единиц фибробластов. В неадгезивных субпопуляциях колониеобразующие единицы фибробластов костного мозга сохранялись до 42 сут, а эмбриональной печени – до 30 сут. Обнаружено, что особенностью стромальных клеток-предшественников неадгезивных субпопуляций костного мозга крысы является сокращение времени формирования колоний до 7 сут (т.е. они формируются в 1.5–2 раза быстрее, чем в первичной культуре). Показано, что суммарное число колониеобразующих единиц фибробластов костного мозга из всех неадгезивных клеточных субпопуляций примерно в 6 раз превосходило таковое адгезивной популяции первичной культуры, а эмбриональной печени – в 7.4 раза. В связи с тем, что костный мозг млекопитающих остается предпочтительным источником мезенхимных стромальных клеток, использование неадгезивных субпопуляций в представленной культуральной системе позволит значительно повысить выход стромальных родоначальных клеток.

Ключевые слова: костный мозг, эмбриональная печень, мезенхимные стромальные клетки, неадгезивные клеточные субпопуляции.

Биологический и клинический интерес к мезенхимным стромальным клеткам (МСК) привел к интенсивным исследованиям их свойств, таких как пролиферативная способность, высокая степень гетерогенности, возможность самоподдержания, различные дифференцировочные потенциалы, а также адгезия к субстрату (Bianco et al., 2001; Baksh et al., 2004; Bobis et al., 2006; Kolf et al., 2007). Впервые эти клетки были выделены и описаны Фриденштейном с соавторами; они же более тридцати лет назад предложили метод выращивания *in vitro* колоний-клонов костномозговых фиб-

робластоподобных клеток, позволивший анализировать свойства и численность родоначальных клеток кроветворной стромы костного мозга и других кроветворных органов (Fridenstein et al., 1970, 1978; Fridenstein, 1976; Фриденштейн, Лурия, 1980). Этот метод и теперь широко используется в изучении МСК разного происхождения (Yamada et al., 2000; Smith et al., 2004; Peister et al., 2004; Marom et al., 2005; Phinney, Prockop, 2007). МСК выявляют *in vitro* как клетки, образующие колонии фибробластов – КОКФ, или колониеобразующие единицы фибробластов – КОЕ-Ф, что терминологически равноценно. Одним из основных критериев МСК является адгезия к пластику в стандартных культуральных условиях (Dominici et al., 2006). Это свойство используется для выделения

¹ Работа поддержана Российским фондом фундаментальных исследований (проект № 06-04-48209) и Программой Президиума РАН “Молекулярная и клеточная биология”.

МСК из взвеси костномозговых клеток и дальнейшего роста в культуре. Данные многих авторов указывают на различное время, необходимое для прикрепления КОЕ-Ф к поверхности культурального флакона. По одним сведениям, практически все КОЕ-Ф прикрепляются в первые 90 мин культивирования, по другим – от 2 ч до 3–7 сут (Фриденштейн и др., 1973; Лациник, Епихина, 1973; Фриденштейн, Лурия, 1980; Castro-Malaspina et al., 1980; Vacek et al., 1990; Deryugina et al., 1995; Phinney et al., 1999; Yamada et al., 2000; Tanaka-Douzon et al., 2001; Hung et al., 2002; Peister et al., 2004).

В ряде ранних экспериментов мы наблюдали, что в начальные сроки культивирования костного мозга крысы, мыши и морской свинки к поверхности культуральных флаконов прикрепляется небольшая часть КОЕ-Ф, а оставшиеся в суспензии клетки не теряют клоногенной способности в последующих пересевах (неопубл. данные). Цель настоящей работы – определить численность КОЕ-Ф в популяции остающихся в суспензии клеток костного мозга половозрелых крыс и мышей в зависимости от продолжительности инкубации с 2 ч до 7 сут *in vitro*, а также содержание КОЕ-Ф в неадгезивных клеточных субпопуляциях костного мозга и эмбриональной печени крыс при более длительном культивировании.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Исследования выполнены на самках крыс Wistar неинбредного разведения весом 200–270 г, на 17-суточных зародышах крыс этой же породы, а также на самках мышей линии (СВА × С57BL/6) × F1 весом 22–24 г. Взвесь клеток, выделенную из костного мозга крыс, мышей и эмбриональной печени крыс, пропускали через капроновый фильтр, а клетки эмбриональной печени отмывали при трехкратном центрифугировании (1000 об/мин) в течение 5 мин. Число ядродержащих клеток подсчитывали в гемоцитометре. Суспензию костного мозга или эмбриональной печени (по 10 мл) в конечной концентрации 1×10^6 клеток в 1 мл питательной среды эксплантировали в пластиковые флаконы с площадью дна 25 см^2 (“Corning”, США) и культивировали в термостате при 37°C в атмосфере 5%-го CO_2 в воздухе. Состав питательной среды: α -MEM (“Sigma”, США) с добавлением 10% инактивированной эмбриональной телячьей сыворотки (“Sigma”, США), 1% раствора L-глутамина в концентрации 20 мМ (“Sigma”, США), 100 МЕ/мл пенициллина и 50 мкг/мл стрептомицина.

В одной группе экспериментов подсчитывали число колоний фибробластов из костного мозга половозрелых крыс и мышей в зависимости от времени культивирования. Через 2, 4 ч и 1, 2, 3, 4, 7 сут после эксплантации суспензии костномозговых клеток среду с неприкрепившимися клетками переносили в новые пластиковые флаконы, а

во флаконы с прикрепившимися клетками заливали свежеприготовленную полную ростовую среду. Каждые 7 сут культивирования адгезивных и неадгезивных клеточных популяций на всех сроках наблюдения проводили смену ростовой среды, после чего прикрепившиеся за это время клетки культивировали до образования дискретных колоний на 11–14-е сут роста и фиксировали. В другой группе опытов клеточные суспензии костного мозга половозрелых крыс и печени 17-суточных плодов крысы в первичной культуре инкубировали 7 сут, после чего не прикрепившиеся за это время к пластику клетки переносили в новые флаконы, а прикрепившиеся после смены ростовой среды культивировали до образования колоний. В дальнейшем по аналогии с предыдущей схемой неадгезивные клетки костного мозга и клетки эмбриональной печени каждые 7 и 5–6 сут роста соответственно переносили в новые флаконы и продолжали культивировать до истощения популяции КОЕ-Ф. Выросшие колонии фиксировали метанолом или 96%-ным этанолом и окрашивали по Гимза. Число колоний на флакон подсчитывали с помощью бинокулярной лупы. Опыты проводили в 2–3-кратной повторности, на каждую точку наблюдений подсчитывали колонии в 10–12 культуральных флаконах. Результаты обрабатывали статистически, для оценки достоверности различий использовали *t*-критерий Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Оценка адгезивных свойств МСК из костного мозга половозрелых крыс и мышей в зависимости от продолжительности инкубации в первичной культуре. Как следует из рис. 1, при культивировании взвеси костного мозга крысы в течение 2, 4 ч, а также 1, 2, 3, 4 и 7 сут после эксплантации в культуру число КОЕ-Ф в составе адгезивных популяций (АП) возросло с 48.25 ± 9.06 до 151.5 ± 11.11 колоний на флакон. В неадгезивных популяциях (НП) колонии, образованные КОЕ-Ф после переноса суспензии не прикрепившихся к пластику клеток в новые флаконы, присутствовали в значительном числе на всех сроках наблюдения, достигая максимального на 7-е сут (103.8 ± 8.19 колоний на флакон).

При сравнении числа КОЕ-Ф в АП и НП костномозговых клеток крысы при продолжительности времени адгезии к пластику с 2 ч до 4 сут *in vitro* следует, что неадгезивная популяция на каждую точку наблюдения превышала адгезивную на 6.48–27.04 % и только на 7-е сут АП по числу колоний превысила НП (на 18.7%). Таким образом, существенная часть популяции МСК костного мозга крысы в продолжение 7 сут *in vitro* остается в суспензии, что характеризует ее пониженную адгезию к пластику.

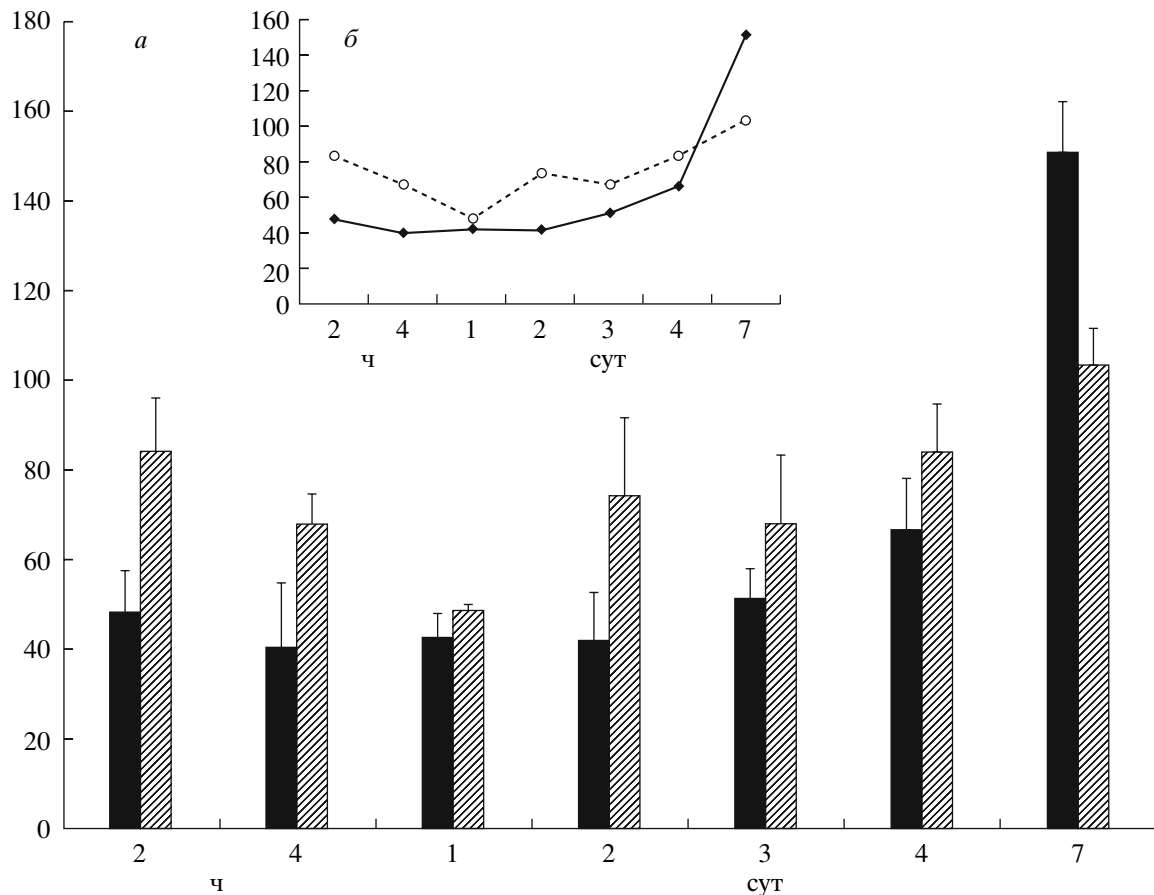


Рис. 1. Колониеобразование в адгезивных (■, —◆—) и неадгезивных (▨, - - ◊ - -) популяциях костного мозга половозрелых крыс Wistar в зависимости от времени адгезии КОЕ-Ф к поверхности пластика в первичной культуре (а) и то же, представленное графически (б).

Здесь и на рис. 2: по оси абсцисс – время культивирования; по оси ординат – число КОЕ-Ф на флакон.

При культивировании МСК костномозговых клеток мышей в течение 2 ч – 7 сут выявлены единичные КОЕ-Ф в АП, культивируемой 4 ч и 1 сут *in vitro*, но начиная со 2-х и по 7-е сут число КОЕ-Ф возрастало с 30.6 ± 5.86 до 81.7 ± 5.57 колоний на флакон (рис. 2). Наибольшее число КОЕ-Ф в НП наблюдали через 2 ч инкубации (33.2 ± 5.16 колоний на флакон) с постепенным снижением их до единичных колоний к 7-м сут культивирования *in vitro*. Сопоставление адгезивных свойств КОЕ-Ф из костного мозга крысы и мыши выявило и сходство, и различие между ними в зависимости от времени прикрепления клеток к поверхности пластика (рис. 1, 2). В обоих случаях происходит максимальное увеличение числа КОЕ-Ф в АП на 7-е сут культивирования. Число же колоний в НП костного мозга мыши убывает до единичных, т. е. практически вся популяция стромальных клеток-предшественников из эксплантированной в культуру суспензии костного мозга мыши к этому времени прикрепляется к пластику. Число колоний в НП костного мозга крысы на 7-е сут культивирования *in vitro*, напротив, значительно возрастает.

Сравнение АП и НП КОЕ-Ф из костного мозга крысы и мыши на каждую точку наблюдения свидетельствует о неодинаковом взаимодействии костномозговых клеток крысы и мыши с пластиком. Такие отличия адгезивных свойств КОЕ-Ф определяются вариабельностью методов выделения МСК из костного мозга (Jones et al., 2002; Hung et al., 2002; Meirelles, Nardi, 2003; Mageed et al., 2007) и согласуются с видовыми и генетическими особенностями мыши (Friedenstein et al., 1976; Wang, Wolf, 1990; Phinney et al., 1999; Tropel et al., 2004), крысы (Simmons et al., 1991; Javazon et al., 2001), морской свинки (Friedenstein, 1976), кролика (Friedenstein, 1976; Ashton et al., 1980; Nathan et al., 2003), обезьяны (Kramvis et al., 1984; Izadpanah et al., 2005) и человека (Castro-Malaspina et al., 1980; Colter et al., 2000; Gronthos et al., 2003). Специфичность МСК разного происхождения подтверждена при изучении пролиферативной активности МСК человека, крысы и мыши в зависимости от плотности посева при эксплантировании костномозговых клеток в культуру. Обнаружена способность МСК из костного мозга крысы и человека быст-

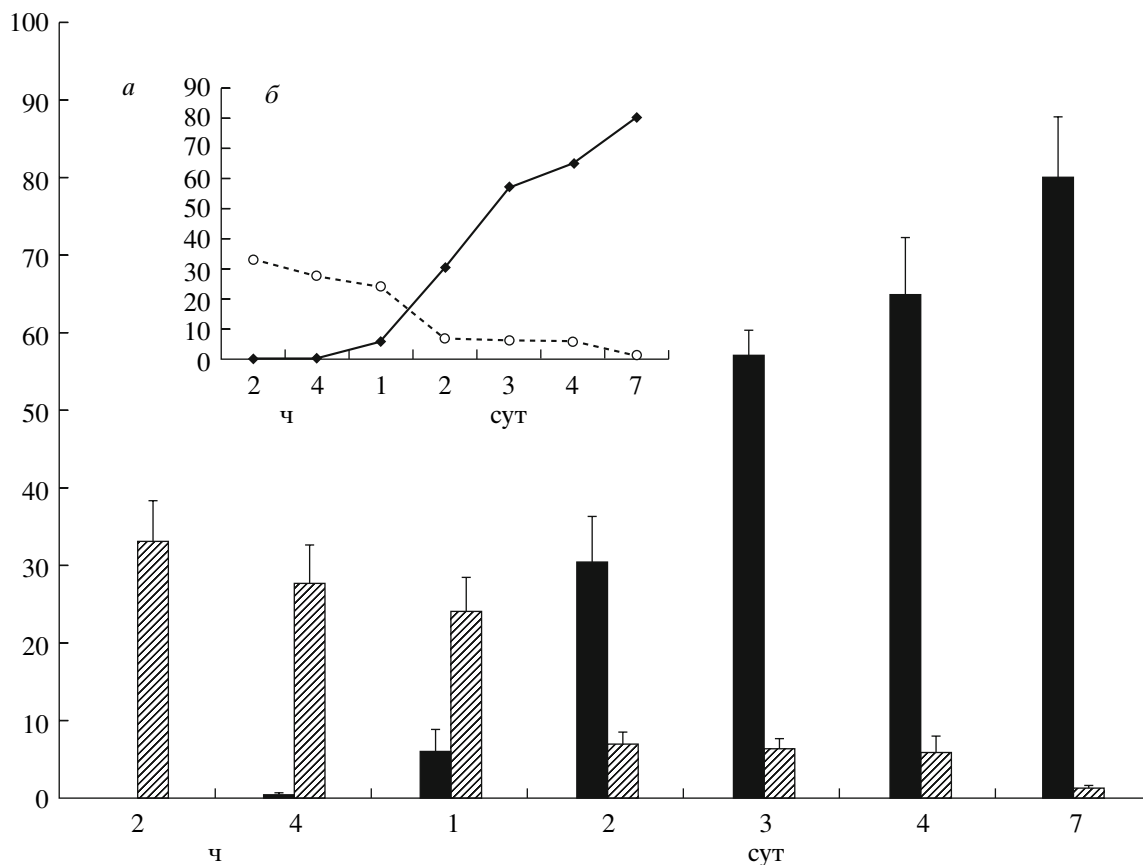


Рис. 2. Колониеобразование в адгезивных (■, —●—) и неадгезивных (▨, - -○- -) популяциях костного мозга половозрелых мышей СВА/C57BL в зависимости от времени адгезии КОЕ-Ф к поверхности пластика в первичной культуре (а) и то же, представленное графически (б).

рее размножаться при низкой плотности посева, чем МСК из костного мозга мыши, кроме того сильно отличающиеся в разных линиях (Phinney et al., 1999; Colter et al., 2000; Sekiya et al., 2002; Piester et al., 2004). Для МСК крысы характерна большая чувствительность к низкой плотности посева, чем для таковых человека (Javazon et al., 2001).

Неадгезивные субпопуляции МСК из костного мозга половозрелых крыс и печени 17-суточных плодов крысы при длительном культивировании. Исходя из того что КОЕ-Ф костного мозга крысы остаются в НП на 7-е сут *in vitro* (рис. 1), представляло интерес выяснить, сохраняются ли они при более длительных сроках культивирования. Контролем в этих экспериментах служила первичная культура костного мозга крысы, в которой после 7 сут роста неприкрепившиеся клетки со средой переносили в новые флаконы, а прикрепившиеся за это время клетки после смены среды продолжали инкубировать до образования колоний, в результате чего произошло разделение популяции КОЕ-Ф на адгезивные (52.55%) и неадгезивные КОЕ-Ф (47.45%) (рис. 3, а). В длительной культуре перенос суспензии неадгезивных клеток в новые флаконы проводили каждые

7 сут в течение 6 нед. В работе представлены два типа культур стромальных костномозговых клеток крысы: первичная, основу которой составляет стандартная культура, включающая АП-фракцию прикрепившихся к пластику клеток и НП-фракцию неприкрепившихся клеток; и культура, полученная из первичной НП, ставшая источником КОЕ-Ф всех последующих НП, обозначенных нами как неадгезивные клеточные субпопуляции (НС). НП первичной культуры является одновременно первой неадгезивной клеточной субпопуляцией (НС1), т. е. НП = НС1, последующие субпопуляции были обозначены как НС2, НС3, НС4, НС5, НС6. Выявленные НС содержали клоногенные фракции МСК без присутствия каких-либо ростовых факторов и цитокинов. Важно отметить, что особенностью КОЕ-Ф всех НС костного мозга является сокращение времени формирования колоний до 7 сут по сравнению с 11–14 сут в первичной адгезивной культуре, т.е. скорость роста этих колоний увеличивается в 1.5–2 раза. Клональный рост КОЕ-Ф из НС в течение 42 сут инкубации представлен на рис. 3, а. Пик числа КОЕ-Ф отмечен в НС2 (273.87 ± 16.10 колоний на флакон), после чего они постепенно убывают до не-

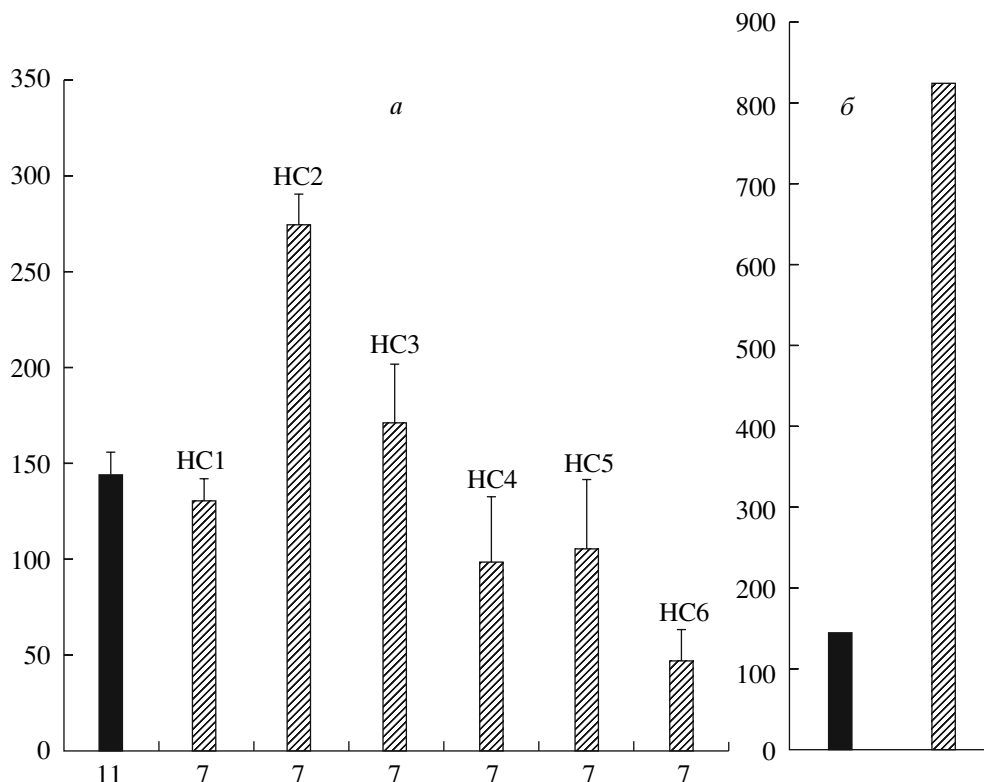


Рис. 3. Динамика численности неадгезивных клеточных субпопуляций КОЕ-Ф костного мозга половозрелых крыс Wistar в длительных культурах (а) и сравнение адгезивной популяции КОЕ-Ф с суммарным числом КОЕ-Ф неадгезивных субпопуляций (б).

Здесь и на рис. 4: по оси абсцисс – время образования колоний, сут; по оси ординат – число КОЕ-Ф на флакон. Условные обозначения: (■) – адгезивная и (▨) – неадгезивные клеточные субпопуляции (HC1 – HC6).

многочисленных колоний в HC6, что свидетельствует об истощении их пула к 42-м сут культивирования *in vitro*.

Оказалось, что суммарное число колоний, образованных КОЕ-Ф костного мозга из всех шести клеточных HC, примерно в шесть раз превосходит число КОЕ-Ф из контрольной первичной АП (рис. 3, б). Таким образом, в первичной культуре костного мозга крысы во время смены среды на 7-е сут роста удаляли суспензию не прикрепившихся к пластику клеток, содержащую популяцию МСК, которая способна при дальнейшем культивировании дать такое число дискретных колоний.

Известно, что в пренатальном развитии МСК обнаруживают в различных тканях и органах, в первую очередь в печени, являющейся источником ранних гемопоэтических клеток (Van den Heuvel et al., 1987; Versele et al., 1987; Anker et al., 2003). Учитывая, что МСК эмбриональной печени и костного мозга имеют общее происхождение и, вероятно, представляют единую популяцию клеток в ходе онтогенеза, а также принимая во внимание, что наибольшее число КОЕ-Ф наблюдается там, где происходит интенсивное крове-

творение, в последующих экспериментах определяли содержание КОЕ-Ф в клеточных HC печени плодов крыс на 17-е сут пренатального развития (рис. 4, а).

Оказалось, что, подобно костномозговым клеткам крысы, популяция КОЕ-Ф, не прикрепившихся к пластику в первичной культуре эмбриональной печени, также стала источником субпопуляций неадгезивных клеток. Согласно данным, представленным на рис. 4, а, динамика численности колоний МСК в HC печени плодов крысы отличается от костномозговых HC: HC1 (370.14 ± 22.88 колоний на флакон) и HC2 (386.00 ± 22.23 колоний на флакон) близки по числу КОЕ-Ф и содержат большую долю КОЕ-Ф HC. Время колониеобразования в HC1 печени плодов сокращается до 5, а в HC2 – до 6 сут *in vitro* по сравнению с 7-суточным сроком во всех HC костного мозга. В HC3 и HC4 происходит снижение клонального роста КОЕ-Ф до крайне низкого числа колоний, которое завершается к 30-м сут эксперимента, т.е. на 12 сут быстрее, чем в костномозговой культуре. Суммарное число колоний, образованных КОЕ-Ф печени плодов из всех четырех клеточных HC, в 7.4 раза больше, чем в контрольной АП первич-

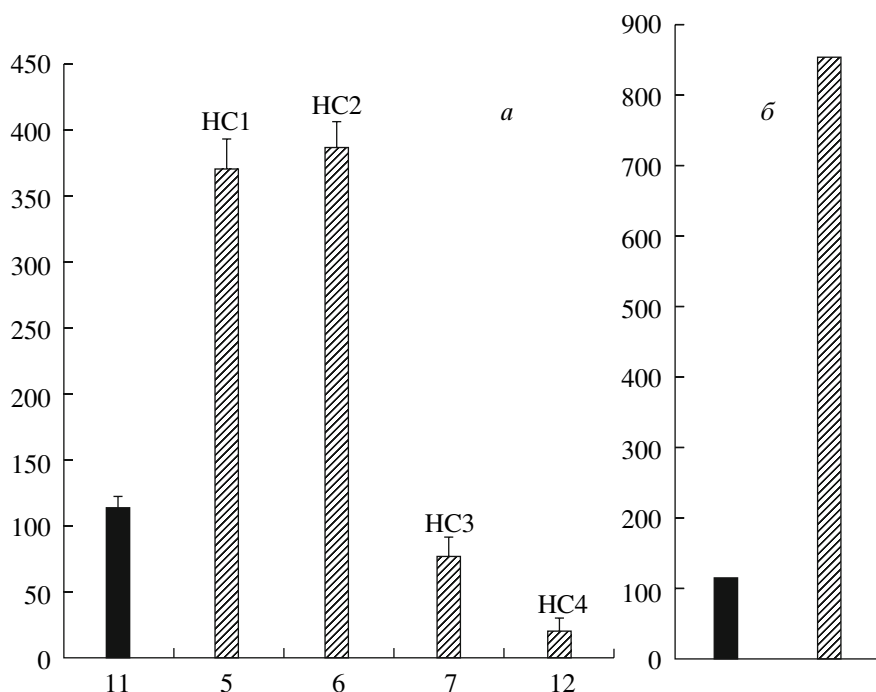


Рис. 4. Динамика численности неадгезивных клеточных субпопуляций КОЕ-Ф из печени 17-суточных плодов крысы Wistar в длительных культурах (а) и сравнение адгезивной популяции КОЕ-Ф с суммарным числом КОЕ-Ф неадгезивных субпопуляций (б).

ной культуры (рис. 4, б). Сравнение общего числа колоний из всех НС костного мозга и печени плодов крысы (рис. 3, а; 4, а) обращает внимание на их количественное сходство при эксплантации взвеси кроветворных клеток в первичные культуры с одинаковой концентрацией ядродержащих клеток (1×10^6 кл/мл) в обоих случаях, но при различной продолжительности роста культуры. Таким образом, мы показали длительное сохранение КОЕ-Ф из популяции неадгезивных клеток в представленных культурах костного мозга и печени плодов крысы.

Морфология колоний. Колонии из НС definitiva костного мозга крысы гетерогенны по размеру и рыхлые по структуре, в то время как колонии печени плодов крысы отличаются большей гомогенностью по размерам и более плотной упаковкой клеток в составе колоний (рис. 5). Морфологически колонии из клеточных НС костного мозга состоят преимущественно из веретеновидных или отросчатых фибробластоподобных клеток различного размера с незначительным присутствием макрофагов. Среди разнообразного состава колоний, выросших из НС эмбриональной печени, основными были вытянутые или распластаные фибробластоподобные клетки, также присутствовали колонии эпителиоподобных полигональных клеток, единичные макрофаги и многоядерные клетки. Клетки, составляющие колонии, выросшие из НС как кост-

ного мозга, так и печени плодов, обладали морфологическим сходством с таковыми АП первичных культур, описанных нами ранее (Паюшина и др., 2004); некоторые отличия наблюдались только в размерах колоний, форме, упаковке в них клеток и морфологических параметрах.

Разделение НП первичной культуры на несколько субпопуляций в зависимости от времени культивирования не привело к получению гомогенной популяции МСК, высокая степень гетерогенности КОЕ-Ф в популяции неадгезивных клеток первичной культуры сохранялась также и во всех НС до истощения пула КОЕ-Ф в длительных культурах и костного мозга, и печени плодов крысы.

ОБСУЖДЕНИЕ

Адгезия к поверхности культуральных флакотов (пластик, стекло, белки внеклеточного матрикса и т.д.) является свойством родоначальных стромальных клеток-предшественников и способом, необходимым для их изоляции из суспензии кроветворных клеток после эксплантации *in vitro*, а также существенным свойством для пролиферации клеток, способных дать начало различным типам дифференцировки. Но в связи с гетерогенностью популяции МСК, отражающей неоднородность исходных клоногенных клеток, которые представляют собой смесь клеток различной

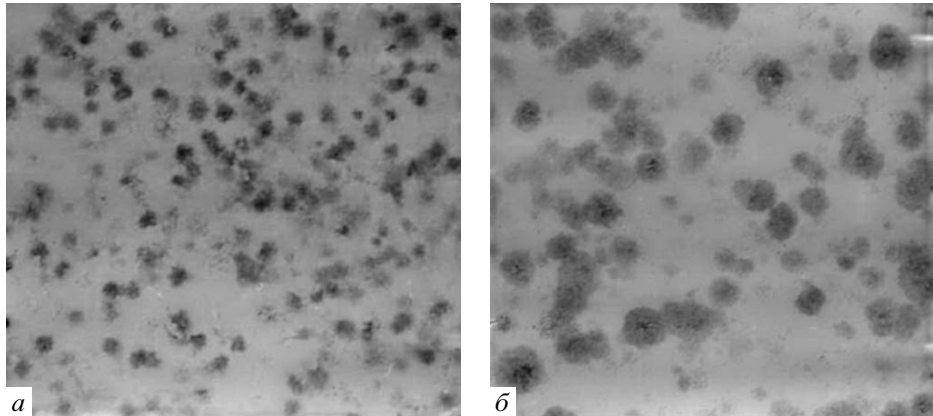


Рис. 5. Культуральные флаконы, содержащие колонии фибробластов, образованные КОЕ-Ф из неадгезивной клеточной субпопуляции НС2 костного мозга половозрелой крысы (а) и печени крысы на 17-е сут пренатального развития (б).

степени зрелости, пролиферативных потенциалов, морфологических, функциональных и других характеристик, эти клетки имеют неодинаковую способность к адгезии. По некоторым данным, наиболее ранние предшественники стромальных клеток с более высокой пролиферативной активностью и дифференцировочной способностью обладают сниженной адгезией к культуральному пластику по сравнению с более поздними (Yamada et al., 2000; Tanaka-Douzono et al., 2001; Dominici et al., 2004). В наших опытах активация пролиферации МСК в НС костного мозга крысы выражалась в ускорении времени образования колоний (в 1.5–2 раза по сравнению с первичной культурой), а сохранение КОЕ-Ф в НС до 42-х сут культивирования *in vitro* предполагает присутствие в них более ранних стромальных клеток-предшественников, характеризующихся сниженной адгезивностью и, соответственно, несущих на своей поверхности меньше рецепторов клеточной адгезии. Возможным объяснением сохранения МСК в НС может быть следующее предположение: при размножении потомков этих клеток в суспензии последние, становясь более зрелыми, экспрессируют на своей поверхности большее число рецепторов, способствующих адгезии к пластику. Попытки объяснить присутствие КОЕ-Ф в НС тем, что прикрепившиеся к субстрату КОЕ-Ф могут переходить в суспензию, находясь под контролем локальных контактных взаимодействий при росте культуры, требуют экспериментального подтверждения.

Роль белков внеклеточного матрикса, синтезируемых на поверхности клеток и присутствующих в ростовой среде, уровень экспрессии адгезивных молекул на поверхности МСК (ICAM-1, ICAM-2, VCAM-2, цепи интегринов $\alpha 1-\alpha 5$, αv , $\beta 1$, $\beta 3$, $\beta 4$ и др.), влияющих на контакт с культуральным пластиком (Majumdar et al., 2003), и определе-

ние специфических рецепторов адгезии МСК в субпопуляциях культур костного мозга и эмбриональной печени, описанных в нашей работе, являются задачами дальнейших исследований.

В ряде опубликованных работ изучали НП в культурах клеток костного мозга и сравнивали их с АП. Авторы (Deryugina et al., 1995; Yamada et al., 1997) идентифицировали предшественники костномозговых фибробластных стромальных клеток мыши (клетки, иницирующие строму – SIC) в популяции не прикрепившихся к пластику клеток после 4-часовой инкубации *in vitro* с их последующим клональным анализом. В такой культуре изучали действие цитокинов на пролиферацию и дифференцировку SIC, а также исследовали экспрессию поверхностных антигенов этих клеток. Высказано предположение о том, что SIC не идентичны КОЕ-Ф, так как последние адгезировали к культуральному пластику в течение 1–2 ч (Фриденштейн и др., 1973; Castro-Malaspina et al., 1980; Piersma et al., 1985), в то время как SIC находились в НП 4 ч культивирования *in vitro*. Авторы другой публикации считают, что SIC и КОЕ-Ф являются различными стадиями дифференцировки в фибробластном клеточном компартменте: КОЕ-Ф – зрелые стромальные фибробластные клетки, а SIC – более ранние их предшественники (Yamada et al., 2000; Tanaka-Douzono et al., 2001).

В отличие от многочисленных экспериментов, в которых показана необходимость контакта КОЕ-Ф с субстратом для инициации их роста *in vitro*, предложен метод, отличающийся от стандартного. Суть его заключается в том, что МСК, выделенные из костного мозга человека, обнаружили способность пролиферировать в суспензионной культуре, но только при добавлении цитокинов в различных комбинациях (Baksh et al., 2003). После 3-недельного роста в такой культуре максимальное значение общего числа клеток и

КОЕ-Ф было получено в присутствии факторов steel и интерлейкина-3 (SCF + IL-3) при различных концентрациях. Показано, что в цитокинозависимой суспензионной культуре МСК этого срока присутствует значительное число стромальных клеток-предшественников, способных поддерживать остеогенный дифференцировочный потенциал.

В этой работе авторы обсуждали возможность выделения МСК из биологических жидкостей, включая пуповинную и периферическую кровь, и их способность к росту при определенных контролируемых условиях *in vitro*. Это и было подтверждено экспериментально (He et al., 2007) с помощью изучения малочисленного числа мультипотентных МСК, циркулирующих в периферической крови (PBMSCs) различных видов животных, включая морскую свинку, кролика, мышшь, крысу и человека, в соответствии с основными критериями МСК, установленными Международным обществом клеточной терапии (He et al., 2007).

Согласно исследованиям, проведенным на монослойных культурах костного мозга человека, МСК из пересаженных с каждой сменой среды НП имели одинаковую скорость клеточной пролиферации и сходные потенции к остео-, хондро- и адипогенной дифференцировке с МСК, первоначально прикрепившимися к пластику. На 21-е сут культивирования *in vitro* были собраны и подсчитаны все клетки АП и НП и оказалось, что в последних общее число клеток превышало в среднем на 36.6% таковое выросших в первичной адгезивной культуре. Авторы предлагают использовать клеточную НП культуры костного мозга человека в качестве дополнительного источника МСК для клинического применения в тканевой инженерии и клеточной терапии (Wan et al., 2006).

В результате экспериментов, представленных в нашей работе, было установлено, что МСК, выделенные из костного мозга половозрелых и печени 17-суточных плодов крыс Wistar спустя 7 сут культивирования *in vitro*, остаются в суспензии не прикрепившихся к пластику клеток, обладая высококлоногенной способностью. При более длительных сроках культивирования эта НП дала начало последующим НС при переносе клеточной суспензии в новые культуральные флаконы. Возникает аналогия еженедельных пересевов НС, мобилизующих переход от более ранних предшественников стромальных клеток к более зрелым, с длительными костномозговыми культурами Декстера. В них пролиферация гемопоэтических стволовых клеток происходит циклически после еженедельной смены среды и вызывается механическим разобщением части стволовых клеток с адгезивным подслоем (Dexter et al., 1977, 1984). Возможность постепенного и поэтапного истощения пула стромальных клеток-предшественников адгезией к пластику в описанной системе дли-

тельного культивирования МСК из кроветворных органов крысы в пре- и постнатальном периодах может стать основой экспериментального анализа иерархических отношений внутри популяции МСК *in vitro*.

Суммарное число колоний КОЕ-Ф костного мозга из всех субпопуляций примерно в 6 раз превосходило численность КОЕ-Ф АП первичной культуры, а суммарное число всех неадгезивных КОЕ-Ф эмбриональной печени – в 7.4 раза. Таким образом, пополнение числа адгезивных стромальных клеток-предшественников происходит из клеточных НС при пересеве, потенцирующем рост КОЕ-Ф, способных к адгезии, что сохраняет МСК первичной культуры. Исходя из полученных нами данных можно заключить, что НС кроветворных органов крысы могут являться дополнительным ресурсом МСК *in vitro*, которые способны дать значительное число дискретных колоний, состоящих из нескольких тысяч фибробластов. Последние можно использовать при получении клонов или диплоидных штаммов для наращивания клеточной массы. В связи с тем что костномозговые клетки млекопитающих остаются предпочтительным источником МСК, использование НС в представленной нами культуральной системе позволит значительно повысить выход стромальных родоначальных клеток. Анализ идентичности пролиферативного и дифференцировочного потенциалов неадгезивной и адгезивной субпопуляций полипотентных МСК из кроветворных органов крысы, а также изучение роли специфических рецепторов адгезии МСК к пластику при формировании адгезивной субпопуляции является предметом наших дальнейших исследований.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Лациник Н.В., Епихина С.Ю. Адгезивные свойства клеток кроветворных и лимфоидной ткани, образующих колонии фибробластов в монослойных культурах // Бюл. эксперим. биологии и медицины. 1973. № 12. С. 86–89.
- Паюшина О.В., Буеверова Э.И., Сатдыкова Г.П. и др. Сравнительное исследование мезенхимных стволовых клеток, выделенных из костного мозга и эмбриональной печени мыши и крысы // Изв. АН. Сер. биол. 2004. № 6. С. 659–664.
- Фриденштейн А.Я., Лурия Е.А. Клеточные основы кроветворного микроокружения. М.: Медицина, 1980. 216 с.
- Фриденштейн А.Я., Чайлахян Р.К., Лациник Н.В. и др. Стромальные клетки, ответственные за перенос микроокружения в кроветворной и лимфоидной ткани // Пробл. гематологии и переливания крови. 1973. № 10. С. 14–23.
- Anker P.S. *in't*, Noort W.A., Scherjon S.A. *et al.* Mesenchymal stem cells in human second-trimester bone marrow, liver, lung and spleen exhibit a similar immunophenotype but a heterogeneous multilineage differentiation potential // Haematologica / J. Hematol. 2003. V. 88. № 8. P. 845–852.

- Ashton B.A., Allen T.D., Howlett C.R. et al. Formation of bone and cartilage by marrow stromal cells in diffusion chambers *in vivo* // Clin. Orthoped. 1980. V. 151. P. 294–307.
- Baksh D., Davies J.E., Zandstra P.W. Adult human bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells are capable of adhesion-independent survival and expansion // Exp. Hematol. 2003. V. 31. № 8. P. 723–732.
- Baksh D., Song L., Tuan R.S. Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation and application in cell and gene therapy // J. Cell. Mol. Med. 2004. V. 8. № 3. P. 301–316.
- Bianco P., Riminucci M., Gronthos S., Robey P.G. Bone marrow stromal stem cells: nature, biology, and potential applications // Stem Cells. 2001. V. 19. № 3. P. 180–192.
- Bobis S., Jarocha D., Majka M. Mesenchymal stem cells: characteristics and clinical applications // Folia Histochem. Cytobiol. 2006. V. 44. № 4. P. 215–230.
- Castro-Malaspina H., Gay R.E., Resnick G. et al. Characterization of human bone marrow fibroblast colony-forming cells (CFU-F) and their progeny // Blood. 1980. V. 56. P. 289–301.
- Colter D.C., Class R., DiGirolamo C.M., Prockop D.J. Rapid expansion of recycling stem cells in cultures of plastic-adherent cells from human bone marrow // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2000. V. 97. № 7. P. 3213–3218.
- Deryugina E.I., Ratnikov B.I., Bourdon M.A. et al. Identification of a growth factor for primary murine stroma as macrophage colony-stimulating factor // Blood. 1995. V. 86. P. 2568–2578.
- Dexter T.M., Allen T.D., Lajtha L.G. Conditions controlling the proliferation of haemopoietic stem cells *in vitro* // J. Cell Physiol. 1977. V. 91. P. 335–344.
- Dexter T.M., Spooner E., Simmons P., Allen T.D. Long-term marrow culture: An overview of techniques and experience // Kroc. Found Ser. 1984. V. 18. P. 57–96.
- Dominici M., Pritchard C., Garlits J.E. et al. Hematopoietic cells and osteoblasts are derived from a common marrow progenitor after bone marrow transplantation // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2004. V. 101. № 32. P. 11761–11766.
- Dominici M., Le Blanc K., Slaper-Cortenbach I. et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International society for cellular therapy position statement // Cytotherapy. 2006. V. 8. № 4. P. 315–317.
- Friedenstein A.J. Precursor cells of mechanocytes // Int. Rev. Cytol. 1976. V. 47. P. 327–359.
- Friedenstein A.J., Chailakhyan R.K., Lalykina K.S. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells // Cell Tiss. Kinet. 1970. V. 3. P. 393–403.
- Friedenstein A.J., Gorskaya J.F., Kulagina N.N. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs // Exp. Hematol. 1976. V. 4. № 5. P. 267–274.
- Friedenstein A.J., Ivanov-Smolenski A.A., Chailakjan R.K. et al. Origin of bone marrow stromal mechanocytes in radiochimeras and heterotopic transplants // Ibid. 1978. V. 6. № 5. P. 440–444.
- Gronthos S., Zannettino A.C.W., Hay S.J. et al. Molecular and cellular characterization of highly purified stromal stem cells derived from human bone marrow // J. Cell Sci. 2003. V. 116. P. 1827–1835.
- He Q., Wan C., Li G. Concise review: multipotent stromal cells in blood stem cells // Stem Cells. 2007. V. 25. P. 69–77.
- Hung S.-C., Chen N.-J., Hsieh S.-L. et al. Isolation and characterization of size-sieved stem cells from human bone marrow // Ibid. 2002. V. 20. P. 249–258.
- Izadpanah R., Joswig T., Tsien F. et al. Characterization of multipotent mesenchymal stem cells from the bone marrow of rhesus macaques // Stem Cells Devel. 2005. V. 14. № 4. P. 440–451.
- Javazon E.H., Colter D.C., Schwarz E.J., Prockop D.J. Rat marrow stromal cells are more sensitive to plating density and expand more rapidly from single-cell-derived colonies than human marrow stromal cells // Stem Cells. 2001. V. 19. P. 219–225.
- Jones E.A., Kinsey S.E., English A. et al. Isolation and characterization of bone marrow multipotential mesenchymal progenitor cells // Arthritis Rheum. 2002. V. 46. № 12. P. 3349–3360.
- Kolf C.M., Cho E., Tuan R.S. Biology of adult mesenchymal stem cells: regulation of niche, self-renewal and differentiation // Arthres Res. Therapy. 2007. V. 9. № 1. P. 1–10.
- Kramvis A., Garnett H.M. Growth and morphological characteristics of vervet monkey bone marrow derived adherent cells // Int. J. Cell Cloning. 1984. V. 2. P. 304–315.
- Mageed A.S., Pietryga D.W., DeHeer D.H., West R.A. Isolation of large numbers of mesenchymal stem cells from the washings of bone marrow collection bags: characterization of fresh mesenchymal stem cells // Transplantation. 2007. V. 83. № 8. P. 1019–1026.
- Majumdar M.K., Keane-Moore M., Buyander D. et al. Characterization and functionality of cell surface molecules on human mesenchymal stem cells // J. Biomed. Sci. 2003. V. 10. № 2. P. 228–241.
- Marom R., Shur J., Solonon R., Benayahu D. Characterization markers of osteogenic marrow stromal cells // J. Cell. Physiol. 2005. V. 202. P. 41–48.
- Meirelles L.S. da, Nardi N.B. Murine marrow-derived mesenchymal stem cell: isolation, *in vitro* expansion, and characterization // Br. J. Haematol. 2003. V. 23. № 4. P. 702–711.
- Nathan S., Das De S., Thambyah A. et al. Cell-based therapy in the repair of osteochondral defects: a novel use for adipose tissue // Tiss. Engin. 2003. V. 9. № 4. P. 733–744.
- Peister A., Mellad J.A., Larson B.L. et al. Adult stem cells from bone marrow (MSCs) isolated from different strains of inbred mice vary in surface epitopes, rates of proliferation, and differentiation potential // Blood. 2004. V. 103. P. 1662–1668.
- Phinney D.G., Prockop D.J. Concise review: Mesenchymal stem/multipotent stromal cells (MSCs). The state of transdifferentiation and modes of tissue repair – current views // Stem Cells. 2007. V. 25. P. 2896–2902.
- Phinney D.G., Kopen G., Isaacson R.L., Prockop D.J. Plastic adherent stromal cells from the bone marrow of commonly used strains of inbred mice: variations in yield, growth, and differentiation // J. Cell Biochem. 1999. V. 72. № 4. P. 570–585.

- Piersma A., Brockbank K.G.M., Ploemacher R.E. et al.* Characterization of fibroblastic stromal cells from murine bone marrow // *Exp. Hematol.* 1985. V. 13. № 4. P. 237–243.
- Sekiya I., Larson B.L., Smith J.R. et al.* Expansion of human adult stem cells from bone marrow stroma: conditions that maximize the yields of early progenitors and evaluate their quality // *Stem Cells.* 2002. V. 20. P. 530–541.
- Simmons D.J., Seitz P., Kidder L. et al.* Partial characterization of rat marrow stromal cells // *Calcif Tiss. Int.* 1991. V. 48. P. 326–334.
- Smith J.R., Pochampally R., Perry A. et al.* Isolation of a highly clonogenic and multipotential subfraction of adult stem cells from bone marrow stroma // *Stem Cells.* 2004. V. 22. P. 823–831.
- Tanaka-Douzono M., Suzu S., Yamada M. et al.* Detection of murine adult bone marrow stroma-initiating cells in Lin(-)c-fms(+)-c-kit(low)VCAM-1(+) cells // *J. Cell. Physiol.* 2001. V. 189. P. 45–53.
- Tropel P., Noel D., Platet N. et al.* Isolation and characterization of mesenchymal stem cells from adult mouse bone marrow // *Exp. Cell Res.* 2004. V. 295. № 2. P. 395–406.
- Vacek A., Bueverova E.I., Rotkovska D. et al.* Decrease in the number of progenitors of fibroblasts (CFU-F) in bone marrow of rats after a 14-day flight onboard the Cosmos–2044 Biosatellite // *Folia Biologica.* 1990. V. 26. P. 194–197.
- Van den Heuvel R.L., Versele S.R.M., Schoeters G.E.R., Vanderborcht O.L.J.* Stromal stem cells (CFU-F) in yolk sac, liver, spleen and bone marrow of pre- and postnatal mice // *Br. J. Haematol.* 1987. V. 66. № 1. P. 15–20.
- Versele S.R., Van den Heuvel R.L., Schoeters G.E.R., Vanderborcht O.L.J.* Proliferation activity of stromal stem cells (CFU-F) from hemopoietic organs of pre- and postnatal mice // *Radiat. Res.* 1987. V. 111. № 2. P. 185–191.
- Wan C., He O., McCaigue M. et al.* Nonadherent cell population of human marrow culture is a complementary source of mesenchymal stem cells (MSCs) // *J. Orthoped. Res.* 2006. V. 24. P. 21–28.
- Wang Q.-R., Wolf N.S.* Dissecting the hematopoietic microenvironment. VIII. Clonal isolation and identification of cell types in murine CFU-F colonies by limiting dilution // *Exp. Hematol.* 1990. V. 18. № 4. P. 355–359.
- Yamada M., Suzu S., Wakimoto N. et al.* Properties of primary murine stroma induced by macrophage colony-stimulating factor // *J. Cell Physiol.* 1997. V. 173. P. 1–9.
- Yamada M., Suzu S., Tanaka-Douzono M. et al.* Effect of cytokines on the proliferation/differentiation of stroma-initiating cells // *Ibid.* 2000. V. 184. P. 351–355.

Nonadhesive Populations in Cultures of Mesenchymal Stromal Cells from Hematopoietic Organs in Mouse and Rat

E. I. Bueverova, E. B. Bragina, and E. A. Molchanova

Kol'tsov Institute of Developmental Biology, Russian Academy of Sciences, ul. Vavilova 26, Moscow, 119991

e-mail: bueverova_e@mail.ru

Abstract—The study of adhesive properties of multipotent mesenchymal stromal cells evaluated from fibroblast colony-forming units in the bone marrow of adult mice and rats in populations of cells attached and unattached to plastic substrate after 2 h to 7 days in culture demonstrated both similarities and differences. The increase in the fibroblast colony-forming units in the adhesive population peaked on day 7 of in vitro culture in both cases; however, nearly no fibroblast colony-forming units were observed in the nonadhesive population from the mouse bone marrow in this period. Conversely, the number of colonies from the rat bone marrow nonadhesive population on day 7 of culture considerably increased, and this nonadhesive population in long-term culture became the source for subsequent nonadhesive subpopulations containing fibroblast colony-forming units. After 7 days of in vitro culture, the suspension of cells isolated from the liver of 17-day-old rat fetuses also contained a fraction of unattached fibroblast colony-forming units. In the nonadhesive subpopulations from the bone marrow and fetal liver, fibroblast colony-forming units were observed up to day 48 and 30, respectively. Stromal cell precursors of nonadhesive subpopulations from the rat bone marrow featured a period of colony formation reduced to 7 days (i.e., they were formed 1.5–2 times faster compared to the primary culture). The total number of fibroblast colony-forming units from all nonadhesive subpopulations was roughly 6 and 7.4 times that of the adhesive population of the primary culture from the bone marrow and fetal liver, respectively. Considering that the mammalian bone marrow remains the preferred source of mesenchymal stromal cells, using nonadhesive subpopulations in the presented culture system can considerably increase the yield of stromal precursor cells.

Key words: bone marrow, fetal liver, mesenchymal stromal cells, nonadhesive cell populations.