

КЛЕТОЧНАЯ ДИФФЕРЕНЦИРОВКА
И ПРОЛИФЕРАЦИЯ

УДК 611.018.46:57.032

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ МЕЗЕНХИМНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ
КЛЕТОК КОСТНОГО МОЗГА НА РАЗНЫХ СТАДИЯХ
ИНДИВИДУАЛЬНОГО РАЗВИТИЯ

© 2017 г. О. В. Паюшина*, Н. Н. Буторина, О. Н. Шевелева, С. С. Бухинник,
А. А. Березина, С. Г. Рамазанова, Е. И. Домарацкая

Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН
119334 Москва, ул. Вавилова, д. 26

*E-mail: payushina@mail.ru

Поступила в редакцию 04.04.2016 г.
Окончательный вариант получен 04.11.2016 г.

Целью настоящей работы явился анализ изменений, происходящих в популяции мезенхимных стромальных клеток (МСК) костного мозга в ходе индивидуального развития организма. Для этого проведено сравнение основных характеристик МСК (содержания клоногенных клеток, иммунофенотипа, потенций к дифференцировке *in vitro* и *in vivo*) в пренатальном, раннем и позднем постнатальном онтогенезе крысы. Показано, что эффективность клонирования МСК костного мозга у 10-дневных и половозрелых крыс является сопоставимой и в сотни раз меньшей, чем у клеток кости 20-суточных плодов с зачатком костного мозга. Активность щелочной фосфатазы — одного из маркеров остеогенных клеток — обнаружена в большинстве колоний, образуемых МСК постнатального костного мозга, но не зародышевой кости. По экспрессии CD90, а также потенциям к адипогенезу *in vitro* стромальные клетки из кости плодов и костного мозга 9–10-дневных крыс были сопоставимы с МСК зрелого костного мозга, однако отличались от них малочисленностью клеток, несущих CD73, и меньшей способностью к остеогенезу в индукционной среде. Анализ судьбы МСК из исследуемых источников после трансплантации половозрелым крысам показал, что их эктопическая трансплантация в почку в составе тканевых фрагментов приводит к формированию костной ткани и кроветворной стромы, а в диффузионных камерах с МСК, предварительно прокультивированными *in vitro*, после пересадки в перитонеальную полость происходят остео- и хондрогенез. При этом значительных различий в потенциях МСК костного мозга к дифференцировке *in vivo* в зависимости от стадии индивидуального развития обнаружено не было. Таким образом, в ходе онтогенеза МСК костного мозга усиливают экспрессию CD73 и способность к остеогенезу *in vitro*, тогда как экспрессия ими CD90, а также потенции к адипогенезу в индукционной среде и дифференцировке в различных направлениях *in vivo* существенно не изменяются.

Ключевые слова: костный мозг, онтогенез, мезенхимные стромальные клетки, клональный рост, фенотип, дифференцировка

DOI: 10.7868/S0475145017040085

ВВЕДЕНИЕ

Исследование мезенхимных стромальных клеток (МСК) — мультипотентных стволовых и родоначальных клеток, способных к дифференцировке в клеточные элементы различных видов соединительных тканей — является одним из приоритетных направлений современной биологии, высокоактуальным с точки зрения как фундаментальной науки, так и медицинской практики. Основы экспериментального изучения МСК были заложены А.Я. Фриденштейном, выявившим их в строме костного мозга, селезенки и тимуса как колониеобразующие единицы фибробластов (КОЕ-Ф) (Friedenstein et al., 1976). В настоящее время для идентификации мультипо-

тентных МСК рекомендованы следующие критерии: 1) адгезивность к пластику; 2) наличие поверхностных антигенов CD73, CD90 и CD105 при отсутствии кроветворных маркеров; 3) способность к остео-, адипо- и хондрогенезу *in vitro* (Dominici et al., 2006).

Клетки со свойствами МСК обнаружены в большинстве тканей и органов (da Silva Meirelles et al., 2006; Covas et al., 2008), однако с первых работ Фриденштейна (Friedenstein et al., 1976) и по настоящее время одним из наиболее употребительных их источников для экспериментального исследования и клинического применения остается костный мозг. В этом органе МСК выступают не только в роли источника физиологической

и репаративной регенерации окружающих тканей (костной, хрящевой, жировой), но и в качестве организаторов кроветворной ниши. Они играют ключевую роль в поддержании гемопоэза, привлекая кроветворные клетки за счет продукции хемоаттрактантов, регулируя их пролиферацию и дифференцировку путем контактных взаимодействий и секреции цитокинов, а также дифференцируясь в различные элементы кроветворной стромы (Majumdar et al., 1998; Wagner et al., 2007). МСК костного мозга детально охарактеризованы с точки зрения их фенотипа, способности к пролиферации и дифференцировке, механизмов регуляторного влияния на гемопоэз, однако большинство работ, посвященных их изучению, выполнены на клетках половозрелого организма. Между тем есть некоторые данные, что в ходе индивидуального развития содержащаяся в костном мозге популяция МСК подвергается определенным изменениям. В частности, известно, что в пренатальном и раннем постнатальном периодах онтогенеза стромальные клетки костного мозга обладают большей, чем у взрослых доноров, пролиферативной активностью (Van Den Heuvel et al., 1991a; Hu et al., 2002; Zhang et al., 2009), но меньшей способностью поддерживать кроветворение (Van Den Heuvel et al., 1991b; Liu et al., 2011). Сообщалось, что МСК костного мозга плодов уступают соответствующим клеткам половозрелого организма по способности к хондрогенезу (Santiago-Torres et al., 2015), однако превосходят их по остеогенным потенциям (Guillot et al., 2008; Zhang et al., 2009). Впрочем, другие авторы не отмечают более выраженных потенций к остеогенной дифференцировке у МСК костного мозга в пренатальном онтогенезе по сравнению с постнатальным (Santiago-Torres et al., 2015). В целом работы по характеристике МСК костного мозга в пренатальном и раннем постнатальном развитии сравнительно малочисленны и не дают полной картины формирования популяции в онтогенезе. В связи с этим целью настоящей работы явился анализ изменений, происходящих в популяции МСК костного мозга в индивидуальном развитии. Для этого проведено сравнение основных характеристик МСК костного мозга крысы в пренатальном, раннем и позднем постнатальном онтогенезе.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе были использованы половозрелые самцы и самки крыс Wistar весом 200–300 г, полученные из питомника лабораторных животных “Столбовая” (Московская область), а также их 20-суточные плоды и 9–10-дневные крысы. Первым днем эмбриогенеза считали день обнаружения сперматозоидов во влагалищном мазке. Содержание животных и экспериментальные процедуры

проводили в соответствии с рекомендациями комиссии по биоэтике ИБР РАН.

Выделение и культивирование клеток. Костный мозг выделяли из бедренных и большеберцовых костей 9–10-дневных и половозрелых крыс, промывая диафизы средой α -МЕМ (HyClone, США). Фрагменты бедренных костей плодов с зачатком костного мозга обрабатывали 0.1%-ным раствором коллагеназы I типа (Sigma, США) при 37°C, последовательно отбирая фракции через 10, 30 и 70 мин инкубации. Клетки культивировали при 37°C и 5% CO₂ в среде α -МЕМ с 10% сыворотки плодов коровы с добавлением L-глутамина, антибиотика-антимикотика и пенициллина-стрептомицина (все – HyClone, США). Плотность посева клеток плодов составляла 1×10^3 клеток/мл для клонального анализа и $1-2 \times 10^5$ клеток/мл для пассирования, а клеток 9–10-дневных и половозрелых крыс – 1×10^6 клеток/мл для клонального анализа и $2-5 \times 10^6$ клеток/мл для пассирования. Среду сменяли через 7 суток. Для клонального анализа культуры клеток от плодов и 9–10-дневных крыс фиксировали через 8 суток после посева, от половозрелых животных – через 11–12 суток. Эффективность клонирования определяли подсчетом колоний, содержащих не менее 50 клеток, и выражали как число колониеобразующих единиц фибробластов (КОЕ-Ф) на 1×10^6 посаженных клеток. Фиксацию культур для иммуноцитохимического анализа проводили по достижении 50–70% конфлюэнтности.

Индукция дифференцировки *in vitro*. Остеогенную и адипогенную дифференцировку индуцировали на 1-м пассаже. Клетки рассеивали в 12-луночные пластины с плотностью 1×10^4 клеток/мл в остеогенную среду (α -МЕМ с 5% сыворотки плодов коровы с добавлением 10^{-8} М дексаметазона (Sigma, США), 50 мкг/мл 2-фосфо-L-аскорбата натрия (Fluka, Германия) и 10 мМ β -глицерофосфата натрия (Sigma, США)) либо с плотностью 3×10^4 клеток/мл в адипогенную среду (α -МЕМ с 10% сыворотки плодов коровы с добавлением 10^{-6} М дексаметазона, 0.2 мМ индометацина, 0.01 мг/мл инсулина и 0.5 мМ IBMX (все – Sigma, США)). Контролем к остеогенезу служили клетки, культивируемые в среде α -МЕМ с 5% сыворотки, к адипогенезу – в α -МЕМ с 10% сыворотки. Клетки культивировали с индукторами в течение 12–21 суток, меняя среду дважды в неделю.

Экспериментальная трансплантация. Эктопическую трансплантацию тканевых фрагментов бедренной кости плодов, костного мозга 9–10-дневных крыс, бедренной кости 10-дневных крыс с удаленным костным мозгом либо костного мозга половозрелых крыс осуществляли в надрез почки. Для этого левую почку реципиента выводили в боковой разрез кожи и мышц и с помощью бритвенного лезвия делали надрез паренхимы длиной

около 5 мм под углом 5° – 10° к поверхности почки. После остановки кровотечения под лоскут почечной ткани помещали трансплантируемые фрагменты кости или костного мозга, почку возвращали в исходное положение, на мышцы и кожу накладывали швы. В качестве реципиентов в каждом опыте было использовано от 3 до 11 половозрелых животных, каждое из которых получало по 2–3 тканевых фрагмента. Трансплантаты с окружающей почечной тканью фиксировали через 4, 7, 12, 21 или 35 суток после операции.

Для трансплантации МСК в диффузионных камерах использовали клетки 1-го пассажа. Суспензию, содержащую 1×10^6 клеток в 100 мкл среды α -MEM, вносили в диффузионные камеры (Millipore, США) и трансплантировали их в перитонеальную полость половозрелых крыс (по 3–5 камер 1–3 реципиентам в каждом опыте). Через 35, 42 или 49 суток камеры извлекали для фиксации.

Анализ результатов. Бедренные кости, эктопические трансплантаты и диффузионные камеры фиксировали смесью Ценкера или Карнуа с последующей декальцинацией 5%-ной трихлоруксусной кислотой, парафиновые срезы окрашивали гематоксилин-эозином. Гликозаминогликаны хрящевой ткани визуализировали, окрашивая срезы раствором альцианового синего в 3%-ной уксусной кислоте. Культуры клеток фиксировали 96%-ным этанолом или 4%-ным формалином на PBS. Для оценки активности щелочной фосфатазы проводили реакцию азосочетания прочного красно-фиолетового FRV с нафтолом AS-BI согласно протоколу фирмы-производителя (Sigma, США). Соли Ca^{2+} выявляли путем окрашивания культур ализариновым красным S (Sigma, США) при pH 4.1, включения нейтральных жиров – окрашиванием жировым красным O (Sigma) (Пирс, 1962). Ядра докрашивали гематоксилином.

Иммуноцитохимические реакции проводили с применением моноклональных антител мыши к CD73 (BD Pharmingen, США) и CD90 (Abcam, Великобритания) и вторых антител, меченных флуорохромом Alexa Fluor 488 (Invitrogen, США). Ядра окрашивали Hoechst 33342 (Sigma, США) или DAPI (Vector, США). Специфичность используемых антител подтверждали с помощью контрольной реакции без первых антител. Флуоресценцию анализировали под микроскопом Leica DM RXA2 (Германия).

Эксперименты повторяли по 2–5 раз, используя в каждом опыте клетки от 5–30 зародышей или от 2–5 половозрелых животных. Данные анализировали экспресс-методом статистической обработки с применением таблиц Стрелкова (Стрелков, 1999).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Гистологический анализ костного мозга на изученных стадиях онтогенеза. Анализ срезов бедренной кости 20-суточных плодов крысы показал, что на этом сроке развития ее эпифизы представлены хрящевой тканью, ближе к диафизу гипертрофированной; явно выраженная костномозговая полость отсутствует, весь объем диафиза занят сетью костных трабекул, между которыми расположены участки разрушающегося хряща, многочисленные мезенхимные клетки и небольшое число кроветворных (рис. 1а). У 9- или 10-дневных крыс в эпифизах присутствовали небольшие участки энхондрального окостенения, а в диафизе – тонкий, не до конца сформированный слой компактной костной ткани, имеющий сетчатую структуру с многочисленными полостями и выростами внутрь, и костномозговая полость с активным гемопоэзом (рис. 1б). Бедренная кость половозрелой крысы отличалась от таковой в раннем постнатальном онтогенезе практически полным окостенением эпифиза и мощным слоем компактной костной ткани по периметру диафиза; активность кроветворения в костномозговой полости оставалась на том же уровне или несколько возрастала (рис. 1в).

Клональный рост МСК в первичной культуре. В первичной культуре стромальные клетки, выделенные на всех изученных стадиях онтогенеза, формировали дискретные колонии клеток с морфологией фибробластов, иногда содержащих множественные жировые включения. Эффективность клонирования клеток костного мозга 10-дневных животных (11.17 ± 0.52 КОЕ-Ф на 1 млн клеток) была сопоставима с таковой у половозрелых крыс (от 10.16 ± 0.23 до 16.77 ± 1.13 КОЕ-Ф на 1 млн клеток), тогда как в популяции клеток зародышевой кости она варьировала от 4708.33 ± 342.13 до 9819.44 ± 862.75 КОЕ-Ф на 1 млн клеток.

Цитохимическая оценка активности щелочной фосфатазы как одного из маркеров остеогенных клеток выявила слабую или умеренную положительную реакцию лишь в 1–7% колоний, образуемых МСК из кости плодов. При этом активность фермента обычно присутствовала лишь в единичных клетках или их мелких группах в составе колонии. В то же время в культурах клеток костного мозга 10-дневных и половозрелых животных щелочная фосфатаза, как правило, обнаруживалась более чем в 90% колоний, причем во многих из них фермент содержался в большинстве клеток, а интенсивность реакции была высокой. Полученные результаты указывают на значительное усиление остеогенных потенциалов клоногенных стромальных клеток костного мозга в ходе онтогенеза.

Фенотипическая характеристика МСК. Иммуноцитохимическое окрашивание клеток в первичной культуре и на первом пассаже на поверхностные антигены CD73 и CD90 – маркеры, реко-

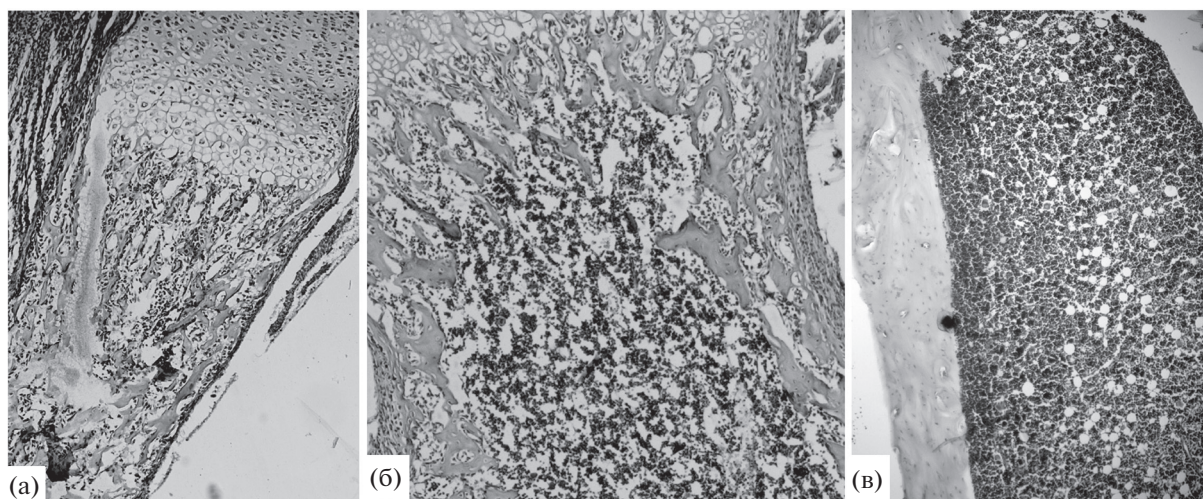


Рис. 1. Морфология бедренной кости крысы на разных сроках развития: (а) — 20 суток эмбриогенеза; (б) — 10 суток постнатального онтогенеза; (в) — половозрелые животные. Окраска гематоксилин-эозином. Увел.: об. $\times 4$, ок. $\times 10$.

мендуемые Международным обществом клеточной терапии для идентификации МСК (Dominici et al., 2006) — показало присутствие CD73 лишь на единичных клетках в некоторых из исследованных культур, полученных от плодов и 9- или 10-дневных крыс. При этом в культурах костного мозга половозрелых животных этот антиген был выявлен на 25–60% клеток (рис. 2а–2в). В то же время CD90 присутствовал на большинстве стромальных клеток, выделенных на всех изученных стадиях индивидуального развития (рис. 2г–2е).

Дифференцировка МСК в индукционных средах. Потенции МСК из развивающегося и зрелого костного мозга к остеогенной и адипогенной дифференцировке *in vitro* были оценены путем культивирования клеток на первом пассаже в соответствующих индукционных средах. В остеогенной среде клетки из зародышевой кости проявляли лишь слабые потенции к дифференцировке, что согласуется с вышеописанными данными о малом количестве клеток, содержащих щелочную фосфатазу (т.е. остеогенных) в колониях, образуемых КОЕ-Ф из этого источника. После 19–21 сут культивирования в присутствии индукторов они образовывали мелкие плотные скопления кубических клеток с интенсивной базофилией цитоплазмы, поверх которых иногда были различимы отложения внеклеточного матрикса. Большинство подобных скоплений частично или полностью окрашивались на щелочную фосфатазу, некоторые демонстрировали слабую реакцию на соли кальция (рис. 3а). В культурах костного мозга 9- или 10-дневных крыс очаги дифференцировки были крупнее, а степень их минерализации выше (рис. 3б). Наибольшей выраженности остеогенные потенции достигали у МСК костного мозга половозрелых крыс. Эти клетки формировали крупные,

часто сливающиеся друг с другом костные узелки с интенсивной реакцией на щелочную фосфатазу и большим количеством минерализованного матрикса (рис. 3в).

В адипогенной среде МСК из всех исследуемых источников образовывали многочисленные мультилокулярные адипоциты. Клетки с включениями нейтральных жиров, одиночные или расположенные рыхлыми кластерами, появлялись уже через 4–7 суток после начала индукции. После 10–14 суток культивирования в индукционной среде очаги дифференцировки представляли собой крупные скопления из десятков или сотен адипоцитов на разных стадиях накопления жира, имеющих фибробластоподобную, овальную или округлую форму (рис. 3г–3е). Судя по срокам образования жировых клеток, их числу и степени зрелости, адипогенные потенции МСК от зародышей, 9–10-дневных и половозрелых животных были сопоставимы. Следует отметить, что эти потенции проявлялись при культивировании клеток не только в адипогенной среде, но и в остеогенной, а также спонтанно в среде без индукторов.

Дифференцировка МСК *in vivo*. Способность содержащихся в костном мозге стромальных предшественников к дифференцировке *in vivo* была оценена с использованием двух моделей экспериментальной трансплантации — в составе тканевых фрагментов (табл. 1) или в диффузионных камерах после предварительного культивирования *in vitro* (табл. 2). Эктопическая трансплантация тканевых фрагментов позволяет оценивать потенции МСК в условиях их взаимодействия с микроокружением трансплантируемой ткани и заселяющими трансплантат клетками реципиента (Friedenstein et al., 1978; Tavassoli, 1984). В частности, это дает возможность анализировать способность

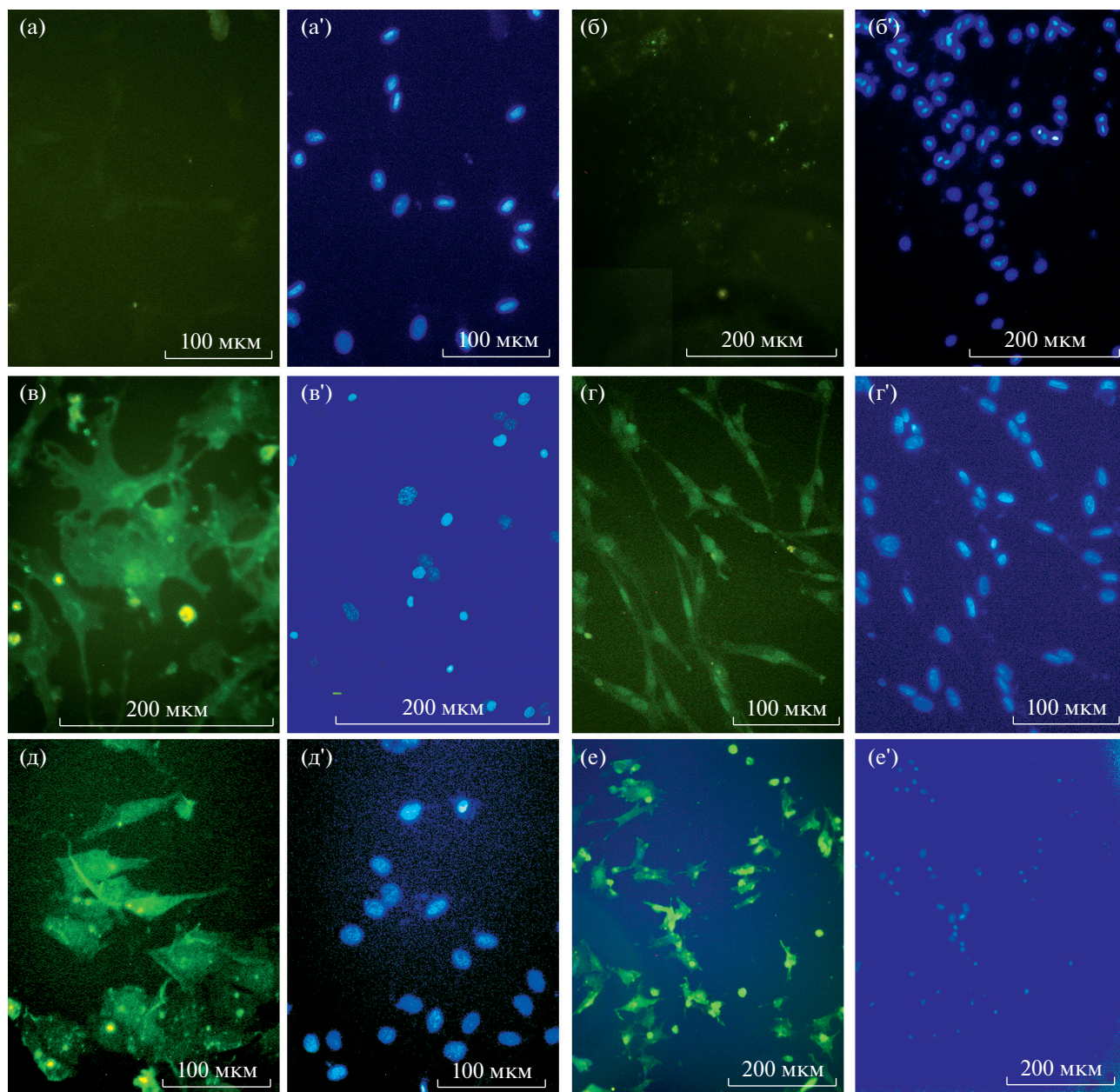


Рис. 2. Иммуноцитохимическое выявление маркеров МСК. CD73 в первичных культурах клеток: (а) – кости 20-суточных плодов; (б) – костного мозга 10-дневных крыс; (в) – зрелого костного мозга. CD90 в первичных культурах клеток: (г) – кости 20-суточных плодов; (д) – костного мозга 9-дневных крыс; (е) – зрелого костного мозга. (а', б', в', г', д', е') – окрашивание ядер Hoechst 33342. Масштабный отрезок: (а, а', г, г', д, д') – 100 мкм; (б, б', в, в', е, е') – 200 мкм.

стромальных клеток к поддержанию гемопоэза. Диффузионные камеры, в отличие от эктопических трансплантатов, представляют собой закрытую систему, предназначенную для анализа потенций трансплантируемых клеток в отсутствие контакта с другими клеточными элементами донорского или реципиентского происхождения.

После эктопической трансплантации бедренной кости плода в почку половозрелой крысы через 35 суток наблюдалось ее значительное утолщение,

свидетельствующее о продолжении процесса остеогенеза. В трансплантате образовывалась сеть костных трабекул, ячейки которой были заполнены соединительной тканью с очагами кроветворения и иногда с жировыми клетками; в той или иной степени сохранялись также остатки хрящевой ткани в эпифизах (рис. 4а). Выраженность гемопоэза варьировала между трансплантатами, в некоторых случаях присутствовала активно функционирующая кроветворная строма с множеством клеток различных гемопоэтических рядов (эритроидного,

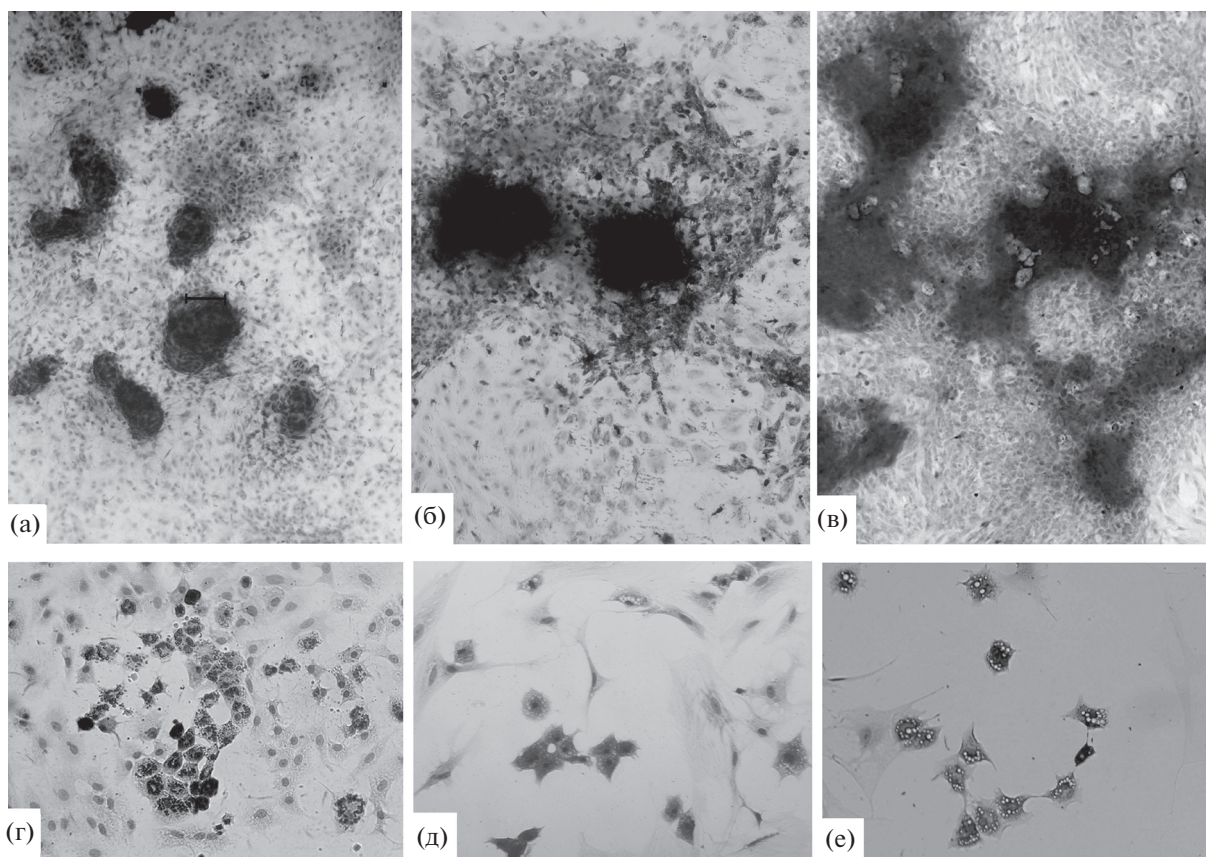


Рис. 3. Дифференцировка МСК *in vitro* в индукционных средах. Остеогенез: (а) – МСК из кости 20-суточных плодов, 19 суток индукции; (б) – МСК из костного мозга 9-дневных крыс, 20 суток индукции; (в) – МСК из зрелого костного мозга, 21 сутки индукции. Окраска ализариновым красным S. Адипогенез: (г) – МСК из кости 20-суточных плодов, 12 суток индукции; (д) – МСК из костного мозга 10-дневных крыс, 13 суток индукции; (е) – МСК из зрелого костного мозга, 12 суток индукции. Окраска жировым красным O. Ядра докрашены гематоксилином. Увел.: (а–в) – об. $\times 4$, ок. $\times 10$; (г–е) – об. $\times 10$, ок. $\times 10$.

гранулоцитарного и т.д.) и хорошо различимыми синусоидными капиллярами. В трансплантатах костного мозга 9- или 10-дневных крыс разрасталась соединительная ткань и образовывалась сеть костных балок. В большинстве случаев присутствовали очаги гемопоэза (рис. 4б). Аналогичная картина наблюдалась в трансплантатах костей 10-дневных крыс, из которых был предварительно удален костный мозг: в них не только разрасталась костная ткань, но и формировалась крове-

творная строма (рис. 4в). Сходные результаты были получены и при трансплантации фрагментов костного мозга половозрелых крыс. После 4 суток пребывания в организме реципиента в этих трансплантатах разрасталась соединительная ткань; после 7–12 суток начиналось образование костной ткани. Через 21 сутки после трансплантации очаги остеогенеза значительно увеличивались в размере, а в расположенной между ними строма в некоторых случаях появлялись немногочисленные кроветвор-

Таблица 1. Дифференцировка МСК в эктопических трансплантатах тканевых фрагментов

Трансплантируемая ткань	Всего трансплантатов	Число трансплантатов, содержащих:		
		костную ткань	кроветворную строма	жировую ткань
Кость 20-суточных плодов	5	5	3	1
Костный мозг 9–10-дневных крыс	10	8	7	2
Кость 10-дневных крыс	4	4	4	1
Костный мозг половозрелых крыс	11	10	6	2

Примечание. Трансплантаты анализировали после 35 суток пребывания в организме реципиента.

Таблица 2. Дифференцировка МСК после их интраперионеальной трансплантации в диффузионных камерах

Источник МСК	Всего камер	Число камер, содержащих:	
		хрящевую ткань	костную ткань
Кость 20-суточных плодов	10	3	1
Костный мозг 9–10-дневных крыс	10	0	1
Костный мозг половозрелых крыс	11	2	2

Примечание. Диффузионные камеры анализировали после 35–49 суток пребывания в организме реципиента.

ные клетки; через 35 суток в ней, как правило, наблюдался активный гемопоэз (рис. 4г). Следует отметить, что в трансплантатах постнатального костного мозга изредка также встречалась жировая ткань, но никогда не обнаруживалась хрящевая.

Таким образом, в эктопических трансплантатах независимо от источника МСК происходило образование костной ткани и кроветворной стромы, поддерживающей гемопоэз, однако степень его выраженности зависела от срока развития.

При трансплантации в перитонеальную полость реципиента в диффузионных камерах МСК из кости плодов в некоторых случаях образовывали хрящевую ткань, иногда занимающую существенную часть объема камеры (рис. 4д), реже встречались небольшие участки грубоволокнистой кости (рис. 4е). В диффузионных камерах с МСК, выделенными из костного мозга в раннем постнатальном онтогенезе, также иногда обнаруживались обособленные участки костной ткани (рис. 4ж), а в камерах с клетками из зрелого костного мозга – одновременно костная ткань, примыкающая к поверхности камеры, и хрящевая, расположенная глубже и местами демонстрирующая признаки дегенерации (рис. 4з).

ОБСУЖДЕНИЕ

Полученные данные свидетельствуют о том, что по фенотипу и потенциям к дифференцировке стромальные клетки, содержащиеся в тканях кости на поздних стадиях пренатального онтогенеза и костном мозге в раннем постнатальном онтогенезе, в целом соответствуют критериям МСК, однако отличаются от присутствующих в строме зрелого костного мозга крайне малым числом клеток, несущих антиген CD73, и меньшей способностью к остеогенной дифференцировке *in vitro*. Возможно, отсутствие на большинстве из них CD73, участвующего, по некоторым данным, в регуляции гемопоэза и лимфопоэза (Barry et al., 2001), отражает функциональную незрелость кроветворной стромы формирующегося костного мозга, на которую указывают и имеющиеся в литературе данные о ее низкой способности поддерживать пролиферацию и дифференцировку кроветворных клеток (Van Den Heuvel et al., 1991b; Liu et al.,

2011). С незрелостью МСК, проявляющейся в их неспособности в полной мере отвечать на стимулы к дифференцировке, может быть связана и слабая выраженность остеогенеза в культурах МСК развивающегося костного мозга по сравнению с клетками половозрелых крыс. Это наблюдение не согласуется с данными других авторов, полученными на МСК из костного мозга плодов человека (Guillot et al., 2008; Zhang et al., 2009), и выглядит достаточно неожиданным, учитывая активное формирование костной ткани на ранних стадиях индивидуального развития. Однако о том, что на этих стадиях онтогенеза остеогенные потенции МСК не достигают полной выраженности, свидетельствуют данные Ван Ден Хойвель и соавторов (Van Den Heuvel et al., 1991a), обнаруживших значительно меньшую долю колоний, содержащих щелочную фосфатазу, в культуре КОЕ-Ф костного мозга от новорожденных мышей по сравнению с половозрелыми.

Очевидно, при интерпретации результатов, полученных нами на культуре клеток из кости плодов, следует учитывать вклад МСК, содержащихся не только в зачатке костного мозга, но и в окружающих тканях – кости, хряще, надкостнице и т.п. Их присутствием может быть обусловлена не только исключительно высокая эффективность клонирования МСК из этого источника (в отличие от зрелого костного мозга, состоящего большей частью из кроветворных клеток, в костной и окружающих тканях преобладают способные к клональному росту механоциты), но в какой-то степени и их отличие от МСК постнатального костного мозга по потенциям к дифференцировке. В то же время сниженная по сравнению с клетками половозрелых животных способность к остеогенезу была отмечена нами и в культуре МСК костного мозга 9- или 10-дневных крыс, лишенной примеси прилежащих тканей.

Следует также отметить, что в экспериментах *in vivo* мы не обнаружили существенных различий в способности клеток костного мозга на разных стадиях онтогенеза к образованию костной ткани в организме реципиента. Строго говоря, при трансплантации бедренной кости плода (или выделенных из нее МСК) невозможно с уверенностью утверждать наличие потенций к остеогенезу *in vivo*

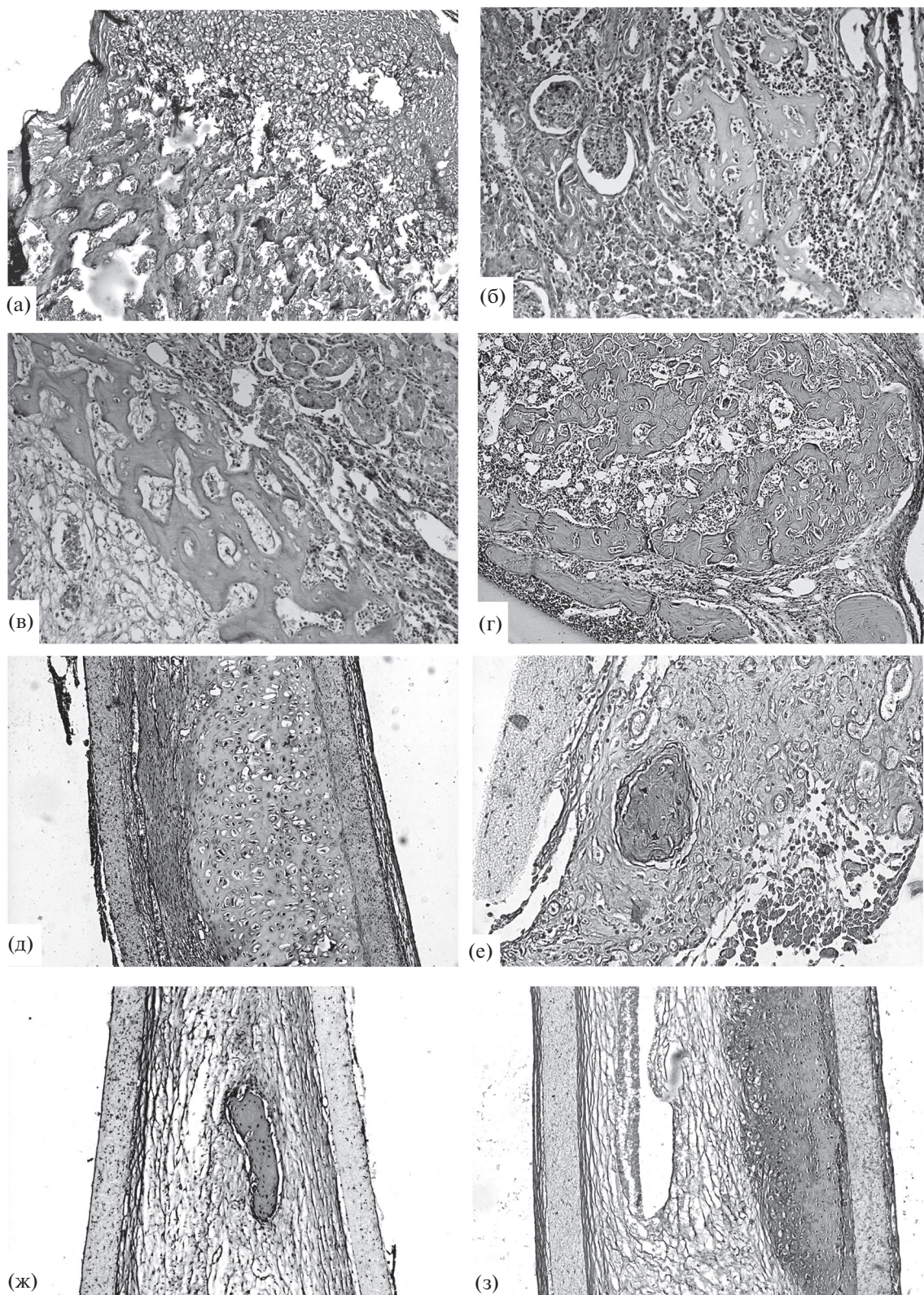


Рис. 4. Дифференцировка МСК *in vivo*. Эктопические трансплантаты: (а) — кости 20-суточных плодов; (б) — костного мозга 10-дневных крыс; (в) — кости 10-дневных крыс; (г) — зрелого костного мозга. Диффузионные камеры с МСК: (д, е) — кости 20-суточных плодов; (ж) — костного мозга 9-дневных крыс; (з) — зрелого костного мозга. (а–е) — 35 суток после трансплантации; (ж, з) — 49 суток после трансплантации. Окраска альциановым синим, гематоксилином и эозином. Увел.: (а, г, д, ж, з) — об. $\times 4$, ок. $\times 10$; (б, в, е) — об. $\times 10$, ок. $\times 10$.

у клеток, содержащихся в зачатке костного мозга — источником развивающейся в трансплантате костной ткани могут быть и клетки самой зародышевой кости. Однако результаты эктопической трансплантации костного мозга и лишенных его костей 9–10-дневных крыс, приведшей в обоих случаях к образованию как костной ткани, так и кроветворной стромы, свидетельствуют о сходстве потенциалов клеток, локализованных в развивающемся костном мозге и окружающей кости. Можно предположить, что аналогичная ситуация имеет место и в позднем пренатальном онтогенезе.

Не исключено, что различия в остеогенных потенциалах МСК костного мозга на разных сроках развития, отмеченные нами *in vitro*, но не обнаруживаемые при экспериментальной трансплантации, обусловлены их неодинаковой чувствительностью к индукторам, входящим в состав остеогенной среды. Известно, что МСК костного мозга плодов человека и взрослых людей различаются по сигнальным путям, используемым для инициации хондрогенеза. В связи с этим фетальные клетки не отвечают на трансформирующий фактор роста $\beta 3$ (TGF $\beta 3$), являющийся индуктором хондрогенеза для МСК зрелого костного мозга, однако, в отличие от последних, вступают в хондрогенную дифференцировку в ответ на костный морфогенетический белок 2 (BMP2) (Brady et al., 2014). Возможно, и для остеогенной дифференцировки МСК костного мозга крысы на ранних стадиях онтогенеза также требуются специфические индукторы, отличные от таковых для клеток половозрелых животных.

Остается неясным вопрос, являются ли обнаруженные нами различия в фенотипе и потенциалах МСК развивающегося и зрелого костного мозга следствием созревания клеток зародыша или их замещения популяцией МСК, свойственной половозрелому организму. Данные некоторых недавних исследований указывают на существование в кости и костном мозге последовательно сменяющих друг друга популяций примитивных и дефинитивных стромальных предшественников. Так, у мыши обнаружены две популяции родоначальных клеток, экспрессирующих фактор транскрипции Osterix: в пренатальном развитии — транзиторная, потомки которой обнаруживаются в костной ткани и строме костного мозга в период активного роста костей, а в раннем постнатальном онтогенезе — дефинитивная, дающая начало остеобластам и стромальным клеткам половозрелого организма (Mizoguchi et al., 2014). Предшественниками транзиторных стромальных клеток, экспрессирующих Osterix на ранних стадиях онтогенеза, являются хондрогенные клетки развивающейся кости (Ono et al., 2014). Вероятно, примитивные МСК, присутствующие в зачатке костного мозга плода и сохраняющиеся в раннем постнатальном онтогенезе, ответственны за быстрый

рост костей молодого организма, а приходящие им на смену дефинитивные клетки обеспечивают ремоделирование костной ткани во взрослом возрасте. Нельзя исключить и неодинакового регуляторного влияния этих популяций на кроветворные стволовые клетки, активно пролиферирующие в костном мозге на ранних стадиях индивидуального развития и покоящиеся на более поздних (Mizoguchi et al., 2014). Выяснение гистогенетических отношений между МСК костного мозга в пренатальном, раннем и позднем постнатальном онтогенезе, а также молекулярных механизмов изменений, претерпеваемых ими в ходе развития, требует дальнейших исследований.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Пурс Э. Гистохимия. М.: Изд-во ин. лит-ры, 1962. 962 с.
- Стрелков Р.Б. Таблицы Стрелкова и экспресс-метод статистической обработки данных. М.: ПАИМС, 1999. 96 с.
- Barry F., Boynton R., Murphy M. et al. The SH-3 and SH-4 antibodies recognize distinct epitopes on CD73 from human mesenchymal stem cells // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2001. V. 289. № 2. P. 519–524.
- Brady K., Dickinson S.C., Guillot P.V. et al. Human fetal and adult bone marrow-derived mesenchymal stem cells use different signaling pathways for the initiation of chondrogenesis // *Stem Cells Dev.* 2014. V. 23. № 5. P. 541–554.
- Covas D.T., Panepucci R.A., Fontes A.M. et al. Multipotent mesenchymal stromal cells obtained from diverse human tissues share functional properties and gene-expression profile with CD146+ perivascular cells and fibroblasts // *Exp. Hematol.* 2008. V. 36. № 5. P. 642–654.
- Dominici M., Le Blanc K., Mueller 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., 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., Chajlakjan R.K. et al. Origin of bone marrow stromal mechanocytes in radiochimeras and heterotopic transplants // *Exp. Hematol.* 1978. V. 6. № 5. P. 440–444.
- Guillot P.V., De Bari C., Dell'Accio F. et al. Comparative osteogenic transcription profiling of various fetal and adult mesenchymal stem cell sources // *Differentiation.* 2008. V. 76. № 9. P. 946–957.
- Hu Y., Ma L., Jiang X., Zhao C. Comparative study of human fetal and adult bone marrow derived mesenchymal stem cells // *Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi.* 2002. V. 23. № 12. P. 645–648.
- Liu M., Yang S.G., Xing W. et al. Comparison of hematopoietic supportive capacity between human fetal and adult bone marrow mesenchymal stem cells *in vitro* // *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi.* 2011. V. 19. № 4. P. 1028–1032.
- Majumdar M.K., Thiede M.A., Mosca J.D. et al. Phenotypic and functional comparison of cultures of marrow-derived

- mesenchymal stem cells (MSCs) and stromal cells // *J. Cell. Physiol.* 1998. V. 176. P. 57–66.
- Mizoguchi T., Pinho S., Ahmed J. et al.* Osterix marks distinct waves of primitive and definitive stromal progenitors during bone marrow development // *Dev. Cell.* 2014. V. 29. № 3. P. 340–349.
- Ono N., Ono W., Nagasawa T., Kronenberg H.M.* A subset of chondrogenic cells provides early mesenchymal progenitors in growing bones // *Nat. Cell. Biol.* 2014. V. 16. № 12. P. 1157–1167.
- Santiago-Torres J.E., Lovasz R., Bertone A.L.* Fetal vs adult mesenchymal stem cells achieve greater gene expression, but less osteoinduction // *World J. Stem Cells.* 2015. V. 7. № 1. P. 223–234.
- da Silva Meirelles L., Chagastelles P.C., Nardi N.B.* Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues // *J. Cell Sci.* 2006. V. 119. Pt 11. P. 2204–2213.
- Tavassoli M.* Hemopoiesis in ectopically implanted bone marrow // *Kroc. Found. Ser.* 1984. V. 18. P. 31–54.
- Van Den Heuvel R., Mathieu E., Schoeters G. et al.* Stromal cells from murine developing hemopoietic organs: comparison of colony-forming unit of fibroblasts and long-term cultures // *Int. J. Dev. Biol.* 1991a. V. 35. № 1. P. 33–41.
- Van Den Heuvel R., Schoeters G., Leppens H., Vanderborcht O.* Stromal cells in long-term cultures of liver, spleen, and bone marrow at different developmental ages have different capacities to maintain GM-CFC proliferation // *Exp. Hematol.* 1991b. V. 19. № 2. P. 115–121.
- Wagner W., Roderburg C., Wein F. et al.* Molecular and secretory profiles of human mesenchymal stromal cells and their abilities to maintain primitive hematopoietic progenitors // *Stem Cells.* 2007. V. 25. № 10. P. 2638–2647.
- Zhang Z.Y., Teoh S.H., Chong M.S. et al.* Superior osteogenic capacity for bone tissue engineering of fetal compared with perinatal and adult mesenchymal stem cells // *Stem Cells.* 2009. V. 27. № 1. P. 126–137.

Comparative Study of Bone Marrow Mesenchymal Stromal Cells at Different Stages of Ontogeny

O. V. Payushina*, N. N. Butorina, O. N. Sheveleva, S. S. Bukhinnik, A. A. Berezina, S. G. Ramazanova, and E. I. Domaratskaya

Koltzov Institute of Developmental Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119334 Russia

**e-mail: payushina@mail.ru*

Received April 4, 2016; in final form, November 4, 2016

The aim of this study was to analyze the changes that occur in the population of bone marrow mesenchymal stromal cells (MSCs) during the individual development of an organism. For this purpose, the basic characteristics of MSCs (the content of clonogenic cells, immunophenotype, and potencies to differentiate *in vitro* and *in vivo*) in the prenatal, early postnatal, and late postnatal ontogeny of the rat were compared. It is shown that the cloning efficiency of bone marrow MSCs in 10-day-old and adult rats is comparable and hundreds of times smaller than that of bone cells of 20-day-old fetuses with a bone marrow rudiment. The activity of alkaline phosphatase, a marker of osteogenic cells, was found in the majority of colonies formed by MSCs of postnatal bone marrow but not by the fetal bone. By the CD90 expression and potencies for *in vitro* adipogenesis, the stromal cells from the fetal bone and bone marrow of 9- to 10-day-old rats were comparable with those of the mature bone marrow MSCs but differed from them by the presence of numerous CD73-bearing cells and a weaker ability to osteogenesis in an inductive environment. The analysis of the fate of MSCs from the studied sources after their transplantation to adult rats showed that their ectopic transplantation as part of tissue fragments into the kidney results in the formation of bone tissues and hematopoietic stroma. In diffusion chambers with MSCs that were precultured *in vitro*, transplantation into the peritoneal cavity led to osteogenesis and chondrogenesis. However, no significant differences in the potencies of bone marrow MSCs for differentiation *in vivo* depending on the developmental stage have been found. Thus, during ontogeny, bone marrow MSCs enhance the expression of CD73 and the ability to osteogenesis *in vitro*, whereas the expression of CD90 and the potencies for adipogenesis in induction medium and differentiation in different directions *in vivo* do not change significantly.

Keywords: bone marrow, ontogeny, mesenchymal stromal cells, clonal growth, phenotype, differentiation