

ГЕТЕРОГЕННОСТЬ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК-ПРЕДШЕСТВЕННИКОВ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ КОСТНОГО МОЗГА КРЫС

© *Е. Б. Анохина, Л. Б. Буравкова*

*ГНЦ Институт медико-биологических проблем РАН, Москва;
электронный адрес: buravkova@imbp.ru*

Строма костного мозга содержит мезенхимные стволовые клетки (МСК), являющиеся предшественниками по крайней мере для клеток тканей, образующихся из мезенхимы. Исследования биологии МСК выявляют ряд вопросов и противоречий, которые диктуют необходимость дальнейшей характеристики МСК. Целью настоящей работы являлась сравнительная характеристика первичных культур и субкультур стромальных клеток-предшественников, выделенных из костного мозга крыс. Получены длительно культивируемые стромальные клетки-предшественника из костного мозга 5 животных. Проведена их сравнительная морфологическая, иммунофенотипическая и функциональная (способность к остеогенной дифференцировке) оценка. Показано, что полученные культуры характеризуются высокой степенью морфологической гетерогенности. Описаны морфологические различия клеток в культуре. Показано, что степень гетерогенности культур стромальных клеток снижалась на поздних пассажах. Обнаружено, что полученные от разных животных культуры не различались по исследованным фенотипическим маркерам (CD90, CD44, CD54, CD106, CD45 и CD11b), но характеризовались разной морфологией, а также демонстрировали неодинаковую способность к остеогенной дифференцировке при длительном культивировании, что указывает на необходимость использования более специфических маркеров и применения функциональных тестов для идентификации МСК.

Ключевые слова: культуры мезенхимных стволовых клеток, стромальные клетки-предшественники, гетерогенность.

Известно, что популяция клеток стромы костного мозга, оказывающих регуляторный эффект на пролиферацию и дифференцировку гемопоэтических стволовых клеток, чрезвычайно гетерогенна. Наряду с фибробластами, адипоцитами, эндотелиальными и стромальными клетками она содержит популяцию клеток, находящихся в недифференцированном состоянии и обладающих способностью к самообновлению и дифференцировке. Эти клетки являются предшественниками для клеточных элементов негемопоэтического ряда и называются мезенхимными стволовыми клетками (МСК) или — в некоторых источниках — мезенхимными клетками-предшественниками (mesenchymal precursor cells — MPC) (Minguell et al., 2001; Roufosse et al., 2004). Впервые эти клетки были выделены и описаны Фриденштейном и сотрудниками (Friedenstein et al., 1976). Полагают, что помимо костного мозга МСК или МСК-подобные клетки локализуются также в ряде других тканей, например в жировой, и могут быть выделены из них (Fibbe, 2002; Roufosse et al., 2004; Тепляшин и др., 2005a). К настоящему моменту проведено большое количество экспериментов, демонстрирующих возможность дифференцировки МСК в клетки различных тканей.

Однако исследования биологии клеток стромы костного мозга выявляют ряд вопросов и противоречий (Чертков, Дризе, 2005). Так, экспериментально показано, что строма костного мозга содержит совокупность детерминированных предшественников, способных к несколь-

ким направлениям дифференцировки в клетки тканей, образующихся из мезенхимы, таких как костная, хрящевая и жировая ткани (Barry, Murphy, 2004; Roufosse et al., 2004); при этом неоднозначной является возможность их дифференцировки в клетки тканей — производных других зародышевых листков (Orkin, Morrison, 2002). Согласно данным других экспериментов, стволовые клетки стромы костного мозга обладают гораздо большей пластичностью и способны образовывать клетки тканей немезенхимного происхождения (Woodbury et al., 2000; Jiang et al., 2002; Roufosse et al., 2004; Тепляшин и др., 2005b). Некоторые исследователи объясняют это существованием среди МСК особой малочисленной популяции клеток — мультипотентных клеток-предшественников взрослого организма (multipotent adult precursor cell — MAPC), которые аналогичны по своим потенциалам эмбриональным стволовым клеткам, локализуются в различных тканях взрослого организма и выделяются совместно с МСК (Jiang et al., 2002; Orkin, Morrison, 2002; Barry, Murphy, 2004).

В любом случае большинство исследователей сходятся в том, что популяция МСК отличается высокой степенью гетерогенности (Bianco et al., 2001; Prockop et al., 2001; Barry, Murphy, 2004; Peister et al., 2004; Roufosse et al., 2004). Поскольку набор маркеров, используемых в настоящее время для идентификации МСК, недостаточно специфичен их использование лишь отчасти облегчает решение вопроса о том, имеем ли мы дело с

популяцией, одинаковой по составу и характеристикам клеток на разных этапах культивирования и при получении их от разных доноров одним и тем же, но неспецифическим методом. Последний основан на адгезии стромальных клеток к подложке, что делает невозможным получение гомогенной популяции клеток. И если неспецифичность метода получения МСК и их гетерогенность обуславливают невозможность получения каждый раз одинаковой популяции клеток на данном этапе культивирования, то это может являться фактором, порождающим некоторые противоречия в вопросе о пластичности МСК.

Целью настоящей работы явилась сравнительная характеристика нескольких культур стромальных клеток-предшественников, называемых также МСК, полученных от разных животных на различных этапах культивирования, и оценка их морфологической и функциональной гетерогенности. Моделью для исследования МСК являлись стромальные клетки, выделенные из костного мозга крыс.

Материал и методика

В работе использовали среды α -MEM, DMEM (ICN, США) с добавлением 2 мМ L-глутамин, 1 мМ пирувата натрия, 100 ед./мл пенициллина, 100 мг/мл стрептомицина, 10 мМ HEPES-буфера и 10 % эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС; все фирмы Gibco, США). Для выделения фракции ядросодержащих клеток использовали Фиколл-Пак (Amersham Biosciences, Швеция). Для культивирования клеток использовали культуральные флаконы и чашки Петри (Nunc, Дания). В некоторых случаях поверхность пластика покрывали желатином. Отмывку клеток от среды осуществляли 20 мМ PBS (Gibco, США), трипсинизацию проводили раствором, содержащим 0.02 % трипсина и 0.05 % ЭДТА (Gibco, США). Оценку жизнеспособности МСК проводили с использованием набора AnnexinV-FITC Kit (Immunotech, Франция) согласно инструкции фирмы-производителя. Направленную остеогенную дифференцировку МСК осуществляли в среде с добавлением 10^{-8} М дексаметазона (Sigma, США), 10 мМ глицерол-2-фосфата (Sigma, США) и 0.2 мМ 2-фосфо-L-аскорбиновой кислоты (Fluka, Германия). Экспрессию щелочной фосфатазы оценивали с помощью набора Alkaline Phosphatase (Sigma, США) согласно инструкции фирмы-производителя. Иммунофенотипическую характеристику МСК проводили с помощью метода проточной цитофлуориметрии (цитофлуориметр Epics XL, Beckman Coulter, США) с использованием моноклональных антител, меченных флуоресценцизиотиоцианатом (FITC) или фикоэритрином (PE) (BD Bioscience, США), к маркерам CD90, CD44, CD54, CD106, CD45, CD11b и CD62L согласно инструкции фирмы-производителя.

Стромальные клетки-предшественники выделяли из бедренных и больших берцовых костей молодых беспородных крыс. МСК получали из диафизов трубчатых костей, используя описанную ранее методику (Javazon et al., 2001). Диафизы промывали культуральной средой под давлением с помощью шприца с иглой большого диаметра. Далее полученную костномозговую суспензию клеток с тканевыми фрагментами дезагрегировали различными способами — механически (ресуспендированием) или энзиматически (инкубацией с трипсином с

последующей отмывкой). Наиболее простым и доступным способом дезагрегации оказалось ресуспендирование. Затем из суспензии клеток костного мозга в градиенте Фиколла выделяли фракцию ядросодержащих клеток, что не являлось обязательным этапом при получении первичной культуры. Клетки, полученные из одной кости (бедренной или берцовой), помещали в культуральный флакон (25 см²) и оставляли в CO₂-инкубаторе в течение 2 сут. Затем удаляли неприкрепившиеся клетки, первичную культуру отмывали и добавляли свежую культуральную среду. При достижении 80—90 % монослоя в островках клеток первичной культуры клетки пересевали. Плотность посадки клеток составляла 500—1500 клеток/см². Среду во флаконах с культивируемыми клетками меняли каждые 3—4 сут. Клетки культивировали при 37 °С в атмосфере 5 % CO₂. Культивирование продолжали на поздних пассажах (до 50-го). Были получены и проанализировали культуры МСК от 5 крыс (культуры 1—5).

Морфологические характеристики МСК оценивали визуально с помощью фазово-контрастного микроскопа Axiovert 25 (Zeiss, Германия), сопряженной с ним камеры и программы Asus Life. Оценку пролиферативной активности культур МСК проводили путем подсчета числа клеток в фиксированных полях зрения в течение срока роста культуры с помощью программы Sigma Scan.

Для иммунофенотипической характеристики клетки трипсинизировали, инактивировали средой, содержащей трипсин и 10 % ЭТС, производили отмывку и подсчет клеток. Затем $1 \cdot 10^5$ — $5 \cdot 10^5$ клеток в 100 мкл фосфатного буфера окрашивали мечеными антителами согласно инструкции фирмы-производителя.

Результаты и обсуждение

Через 1—2 сут после посадки суспензии на пластик прикрепившиеся клетки в первичных культурах располагались одиночно или группами из нескольких клеток. Эти клетки пребывали в состоянии покоя в течение 1-х сут культивирования, а затем начинали делиться, образуя островки. Клетки в первичных культурах были схожи морфологически. Они имели небольшой размер и вытянутую форму (палочковидную или веретеновидную), а в большом количестве случаев — несколько отростков. Клетки характеризовались гомогенной цитоплазмой и крупным ядром. При дальнейшем культивировании первичной культуры клетки распластывались по поверхности пластика, увеличиваясь в размерах. При этом они сохраняли вытянутую форму и отростки. Цитоплазма на периферии становилась оптически менее плотной. По мере увеличения количества клеток в культуре их отростки плотнее примыкали друг к другу, так что границы отдельных клеток не всегда были четко различимы. Таким образом, морфологическая гетерогенность стромальных клеток в первичной культуре была выражена слабо (рис. 1). При отсутствии стадии выделения фракции мононуклеаров в градиенте Фиколла суспензия клеток содержала большое количество клеток крови, которые отмывались в последующем, не оказывая существенного влияния на морфологию и скорость пролиферации прикрепившихся фибробластоподобных клеток.

При пассировании первичной культуры и получении субкультур на разных этапах культивирования популяция МСК демонстрировала высокую степень гетероген-

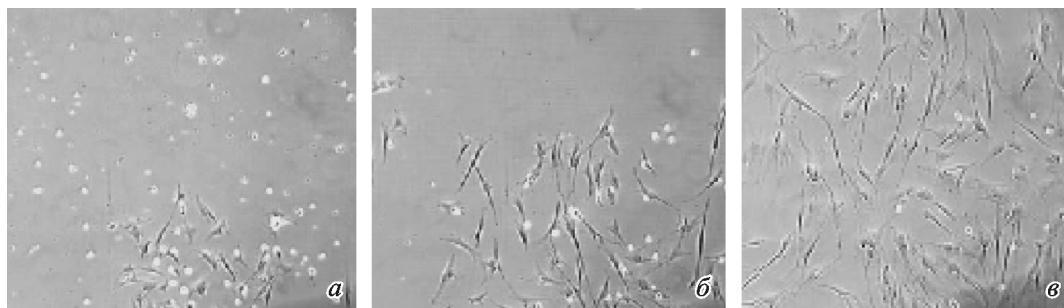


Рис. 1. Проплиферация стромальных клеток в первичной культуре на 2-е (а), 3-и (б) и 5-е (в) сут после выделения. Об. 10×.

ности, которая выражалась в существовании в культуре клеток разных типов, различающихся по морфологии, степени и адгезии к пластику и скорости пролиферации. Эта гетерогенность проявлялась в одних случаях уже на 1-м пассаже, а в других — на более поздних. Во многих рассматриваемых культурах встречались клетки того или иного морфологического типа, но в разном соотношении и на разных этапах культивирования.

В культурах МСК встречались следующие морфологические типы.

1. Клетки, имеющие веретеновидную или треугольную (звездчатую) форму, с небольшим количеством от-

ростков, гомогенную цитоплазму. Размер короткой оси таких клеток составлял 20—60 мкм (рис. 2, а). Такие клетки имели высокую скорость пролиферации (в логарифмической фазе роста время удвоения составляло 16—17 ч) и легко снимались с поверхности пластика трипсином. Только в одной из полученных культур такие клетки доминировали начиная с 5—7-го пассажа. В клетках звездчатой формы хорошо идентифицировалось ядро с отчетливо видимыми ядрышками.

2. Клетки, имеющие плотный перинуклеарный участок цитоплазмы, смещенный к краю клетки. Оставшаяся менее плотная часть цитоплазмы расплывалась по

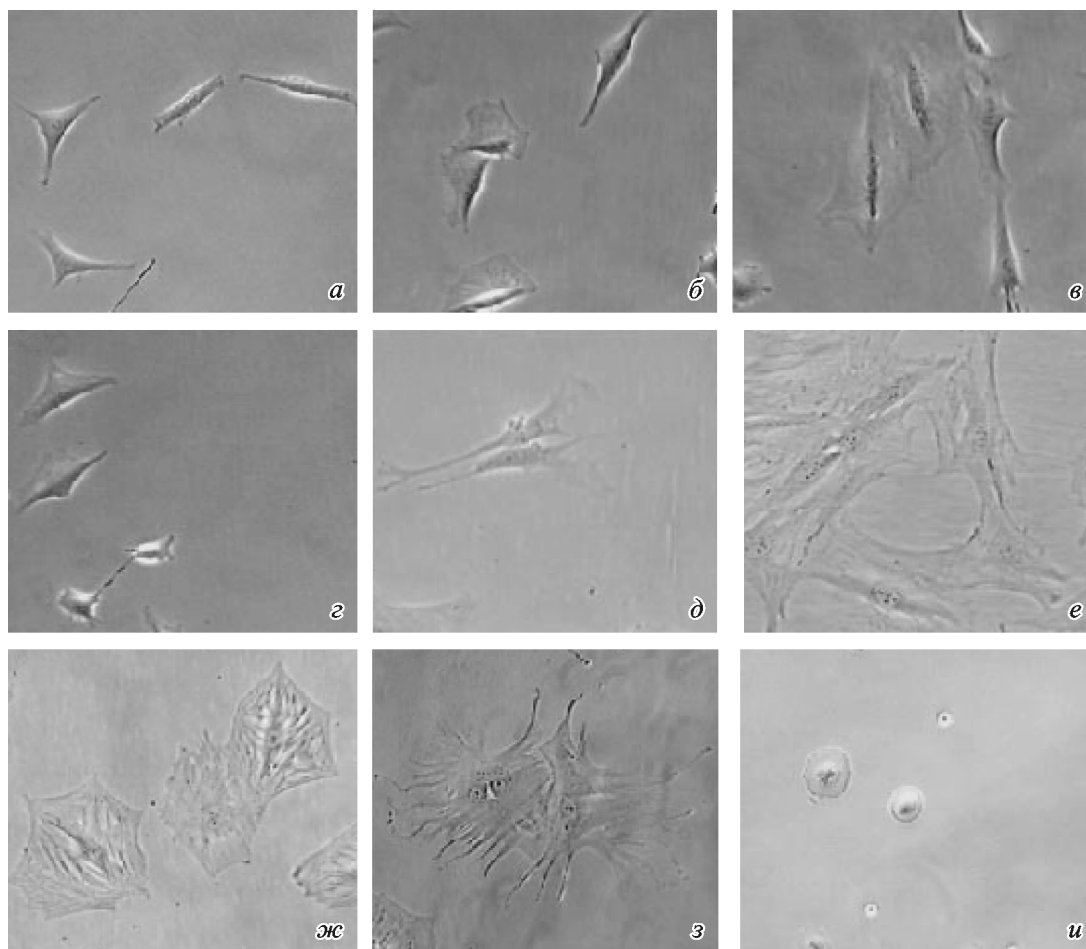


Рис. 2. Морфологические различия клеток в культурах мезенхимных стволовых клеток (МСК). а—е — быстро пролиферирующие клетки; ж—и — медленно пролиферирующие клетки. Об. 20×.

пластику, образуя полукруглый вырост. Размер короткой оси таких клеток составлял 40—80 мкм (рис. 2, б). Скорость пролиферации этих клеток также была высокой, время удвоения в логарифмической фазе роста составляло 16—17 ч.

3. Клетки, имеющие плотный участок цитоплазмы в форме веретена, располагающийся в центре (рис. 2, в). Периферия цитоплазмы таких клеток прозрачная, менее плотная, более распластанная. Эти клетки имели различную форму (веретеновидную, более или менее округлую), их размеры варьировали в больших пределах (размер короткой оси составлял 60—200 мкм), часто в них отчетливо различалось крупное ядро с ядрышками. Интересно, что скорость пролиферации этих клеток и их размер коррелировали с выраженностью «веретена» плотного участка цитоплазмы. Клетки с четко выраженным «веретеном» имели меньший размер и более высокую скорость пролиферации, в то время как клетки, в которых целостность «веретена» нарушалась и цитоплазма становилась неравномерной по плотности, делились медленнее и имели более крупные размеры. В ряде случаев в цитоплазме таких клеток наблюдалась зернистость. Морфология клеток этого типа была четко различима в монослойной культуре, в то время как у клеток второго типа при образовании монослоя характер прикрепления к пластику менялся и менее плотные участки цитоплазмы (выросты) у большинства клеток исчезали.

4. Клетки небольшого размера, диаметром 20—40 мкм, округлые, с небольшим количеством отростков, имеющие гомогенную цитоплазму (рис. 2, г). Очень часто такие клетки можно было наблюдать в процессе митоза, когда они оставались соединенными цитоплазматическим мостиком.

5. Клетки, имеющие один отросток с одной стороны и «бахромчатый» край — с другой. Такие клетки имели крупное ядро, зернистую цитоплазму (рис. 2, д) и встречались в культуре относительно редко.

6. Клетки фибробластоподобной формы, с более или менее неравномерной по плотности цитоплазмой, варьирующие по размеру (60—100 мкм), с хорошо заметным крупным ядром с ядрышками. Такие клетки пролиферировали активно, перекрывая периферические участки цитоплазмы друг у друга (рис. 2, е).

7. Клетки, варьирующие по размеру (60—200 мкм) и иногда достигающие гигантских размеров, распластанные, имеющие полигональную, округлую или неправильную форму, негомогенную цитоплазму, в которой плотные участки чередовались с более прозрачными (рис. 2, ж). Такие клетки демонстрировали высокую степень адгезии к пластику и пролиферировали медленно, перекрывая периферические участки цитоплазмы соседних клеток. Следует заметить, что удаление из среды культивирования сыворотки или снижение ее содержания до нескольких процентов увеличивало долю таких клеток в культуре.

8. Клетки чаще всего крупные, имеющие неправильную форму и большое количество отростков, часто располагающихся на противоположных полюсах клетки (рис. 2, з). Такие клетки имели негомогенную цитоплазму, часто были многоядерными. Пролиферативная активность таких клеток была снижена, при делении они наползали друг на друга.

9. Клетки малого диаметра, округлой формы. Такие клетки встречались редко и не появлялись на поздних пассажах (рис. 2, и).

Существование в культуре МСК различных морфологических типов было показано рядом исследователей. Отмечено, что, хотя культуры МСК из костного мозга крыс отличаются от культур, полученных из костного мозга человека, для МСК крыс характерно наличие тех же морфологических типов клеток, что и для МСК человека (Javazon, 2001). По крайней мере клетки трех типов характерны для МСК как человека, так и крыс: клетки веретеновидной формы, крупные распластанные клетки и округлые клетки небольшого размера (Bianco et al., 2001; Colter et al., 2001; Javazon, 2001). Последние, согласно данным ряда исследователей (Colter et al., 2000, 2001), представляют собой пул наиболее активно делящихся клеток, способных дифференцироваться в другие клеточные типы. Крупные эпителиоидные клетки рассматриваются большинством исследователей как «зрелые» МСК, которые представляют собой определенную стадию развития МСК, своего рода переживающие клетки, вероятно вступившие на путь дифференцировки. С другой стороны, с использованием GFP было показано, что у крыс в колониях отсортированных зрелых МСК появлялись быстро пролиферирующие клетки небольшого размера (Javazon, 2001). Для МСК человека это показано не было, что в совокупности с другими показателями говорит о специфичности МСК крыс (Javazon, 2001). Другие авторы также приводят классификации, отражающие существование в культуре МСК клеток нескольких типов, различающихся размерами и морфологией (Sekiya, 2002; Тепляшин, 2005).

Время появления (пассажа) того или иного клеточного типа в культуре МСК, а также соотношение разных морфологических типов варьировали в культурах, полученных от разных животных. Факторы, определяющие этот факт, остаются невыясненными. Так, например, модификации метода выделения МСК, состава среды культивирования, а также поверхности культурального пластика с помощью желатина не приводили к существенным различиям получаемых культур клеток-предшественников и не определяли морфологический состав культуры МСК. Было охарактеризовано пять культур МСК, полученных от разных животных и поддерживаемых в течение нескольких месяцев. Во всех случаях первичные культуры выглядели сходным образом, морфологическая гетерогенность внутри них не была выраженной. Однако полученные от разных крыс субкультуры на ранних пассажах характеризовались морфологической неоднородностью и отличались друг от друга (хотя и не во всех случаях) по соотношению клеток того или иного типа. Степень неоднородности клеток в каждой из культур с течением времени снижалась, однако сами культуры, полученные от разных животных, отличались друг от друга по морфологии доминирующего клеточного типа. Так, на поздних пассажах в культуре 1 доминировали клетки первого, второго и четвертого типов (рис. 3, а), в культуре 2 — третьего типа (рис. 3, б), в культуре 3 — пятого типа (рис. 3, в) и т. д.

Таким образом, на ранних пассажах гетерогенность МСК была выражена в большей степени и заключалась в существовании в культуре по крайней мере нескольких клеточных типов, в то время как на поздних пассажах степень гетерогенности снижалась и после длительного культивирования культуры состояли преимущественно из однотипных клеток. Показано, что культуры МСК человека также становятся гомогенными после многократного пассирования в условиях высокой плотности посад-

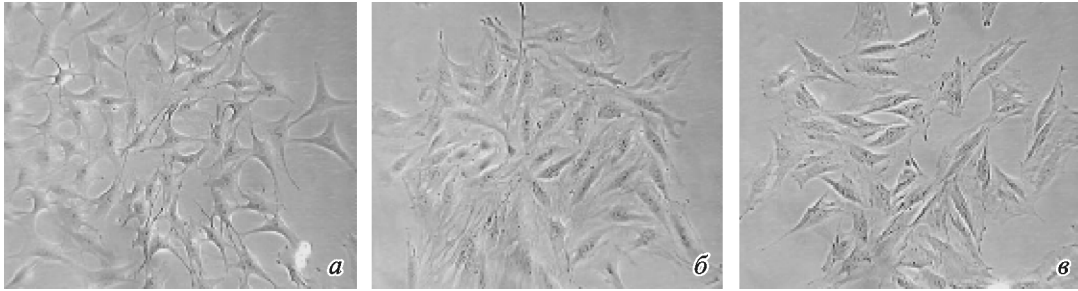


Рис. 3. Морфологические различия культур МСК, полученных от разных животных.
а — культура 1, б — культура 2, в — культура 3. Об. 20×.

ки и в этом случае могут терять потенциал к дифференцировке (Colter et al., 2001). С другой стороны, показано, что дифференцировочный потенциал МСК человека сохраняется в течение длительного времени (Fibbe, 2002). Гомогенные культуры МСК крыс демонстрировали сохранение остеогенного дифференцировочного потенциала на поздних пассажах в течение длительного времени.

Полученные от разных крыс культуры на поздних пассажах состояли преимущественно из однотипных клеток, имеющих постоянную высокую скорость пролиферации, однако отличались друг от друга по морфологии. Этот факт может являться следствием видовых особенностей МСК крыс, ведь межвидовые различия культур МСК общепризнаны (Colter et al., 2000; Javazon, 2001). С другой стороны, морфологические различия культур МСК, полученных от разных животных, могут быть и результатом неспецифичности метода выделения МСК, вследствие чего случайным образом процентное соотношение различных субпопуляций МСК оказывается разным при каждом выделении, а позже та или иная субпопуляция начинает доминировать. Морфологические различия культур МСК, полученных от разных животных одного вида, не описаны, хотя есть данные о том, что, например, МСК, полученные от разных линий мышей, варьируют по скорости пролиферации, фенотипическим характеристикам и дифференцировочному потенциалу, что может объяснять ряд противоречий, выявленных в экспериментах на таких клетках (Peister et al., 2004).

Для всех культур было характерно наличие периодов торможения пролиферации на определенных этапах культивирования. Как правило, пролиферация замедлялась к

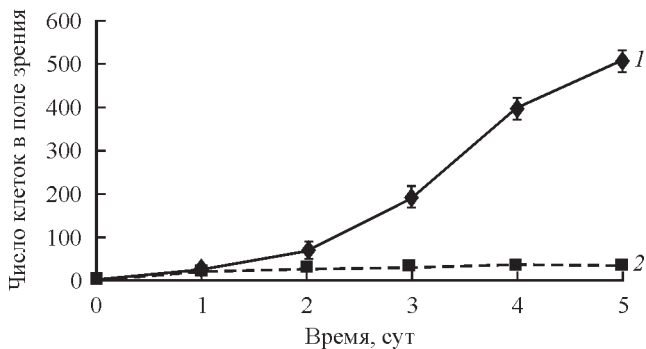


Рис. 4. Характерная динамика пролиферации быстро (1) и медленно (2) пролиферирующих МСК (репрезентативные данные, полученные для 16-го пассажа культуры 1; отражают пролиферативную активность клеток всех полученных культур при их длительном культивировании).

4—5-му пассажу. В этот период в культурах наблюдалось большое число крупных распластанных клеток, имеющих полигональную, округлую или неправильную форму и неоднородную по плотности цитоплазму. Время восстановления скорости пролиферации варьировало у разных культур. Скорость пролиферации была стабильной и высокой на поздних пассажах, время удвоения в логарифмической фазе роста составляло 16—17 ч. Клетки, посаженные с плотностью 500—1500 клеток/см², в этом случае достигали монослоя через 5—7 сут культивирования (рис. 4).

Плотность посадки клеток не оказывала существенного влияния на скорость пролиферации. При маленькой плотности посадки (≤ 100 клеток/см²) единичные клетки образовывали колонии в виде отдельных островков, формировали монослой в пределах островка и начинали уплотняться внутри островка быстрее, чем занимали соседние участки пластика. При большой плотности посадки (≥ 3000 клеток/см²) клетки распределялись по поверхности пластика более равномерно. Следует отметить, что в литературе есть данные об увеличении скорости пролиферации МСК крыс в ответ на маленькую плот-

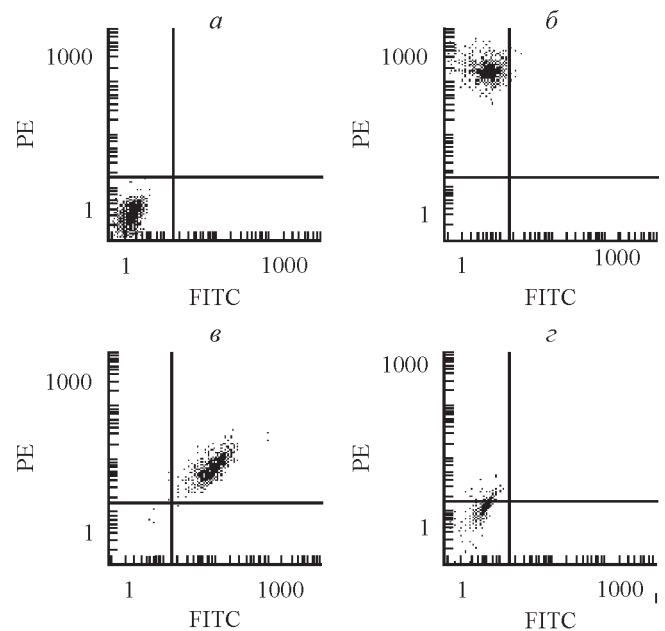


Рис. 5. Экспрессия маркеров МСК (репрезентативные данные). По осям — интенсивность флуоресценции антител, меченных флуоресцеинизотиоцианатом (FITC, по горизонтали) или фикоэритрином (PE, по вертикали). а — изотипический контроль, б — CD90-PE и CD45-FITC, в — CD54-PE и CD44-FITC, г — CD106-PE и CD11b-FITC.

Доля клеток, %, экспрессирующих исследуемые маркеры популяции МСК

Культура	Фенотипические маркеры					
	CD90	CD45	CD54	CD44	CD106	CD11b
1	96.7—100.0	0—1.28	91.9—99.7	98.8—99.9	1.28—76.50	0.20—1.81
2	100	0—1.67	96—100	97.6—100.0	3.0—97.1	0.27—4.37
3	100	0—0.03	99.4—99.7	98.8—99.8	9.0—63.3	1.83—6.23
4	99.7	1.87	99.6	99.3	39.2	7.21
5	99.9—100.0	0.45—0.61	96.5—99.7	98.2—99.8	3.62—34.70	1.25—1.75

ность посадки (Colter et al., 2000; Javazon et al., 2001; Sekiya et al., 2002).

При проведении иммунофенотипической характеристики полученных культур использовали антитела как к позитивным маркерам МСК, таким как CD90, CD44, CD54 и CD106, так и к негативным маркерам — CD45 и CD11b (рис. 5). Было показано, что полученные культуры имеют схожие иммунофенотипические характеристики и практически одинаковую долю клеток, экспрессирующих анализируемые маркеры (см. таблицу), за исключением маркера CD106, варьирующего в широких пределах во всех культурах.

Способность МСК к дифференцировке в остеогенном направлении оценивали по степени экспрессии клетками щелочной фосфатазы после их инкубирования в остеогенной среде в течение 2 нед. Клетки культуры, полученной от одного из животных (культура 1), не давали окраски на щелочную фосфатазу на поздних пассажах. Клетки других культур (2 и 3) окрашивались на щелочную фосфатазу, что свидетельствовало о способности дифференцироваться в остеогенном направлении при длительном культивировании (рис. 6).

В связи с этим интересным является тот факт, что клетки всех выделенных культур имели схожие иммунофенотипические характеристики по маркерам, которые обычно используются для идентификации МСК, т. е. наличие таких маркеров, как CD90, CD44, CD54 и CD106, и отсутствие маркеров, характерных для гемопоэтических клеток, определялось в том числе на клетках, не проявляющих способности дифференцироваться в

остеогенном направлении. Эти данные свидетельствуют о том, что анализ экспрессии 7 исследуемых маркеров (4 положительных и 3 отрицательных) не позволяет с достаточной полнотой охарактеризовать фенотип клеток-предшественников. Таким образом, фенотипическая характеристика и идентификация МСК требует использования более специфичного набора маркеров.

Мы не проводили работу по выделению, фенотипической и функциональной характеристике отдельных субпопуляций клеток, однако существуют данные об иммунофенотипической гетерогенности МСК, а также о неодинаковой способности отдельных клеточных типов внутри популяции МСК дифференцироваться в остеогенном направлении. Так, показано, что быстроделящиеся клетки небольшого диаметра имеют маркеры, не найденные на зрелых МСК, и не несут ряда эпитопов, характерных для зрелых МСК (Colter et al., 2001). Показано также, что способность к остеогенной дифференцировке неодинакова у клеток этих двух типов (Colter et al., 2001), и это позволяет предположить различный дифференцировочный потенциал также и у клеток других типов. Эксперименты демонстрируют, что при окрашивании на щелочную фосфатазу колонии МСК демонстрируют вариабельность: окрашивается целиком, только в центральной области или не окрашивается (Bianco et al., 2001). Таким образом, морфологическая гетерогенность подтверждается иммунофенотипически и функционально. Однако нет подробных данных о возможности перехода одного клеточного типа в другой, а также о факторах, влияющих на соотношение клеток различных типов в культуре.

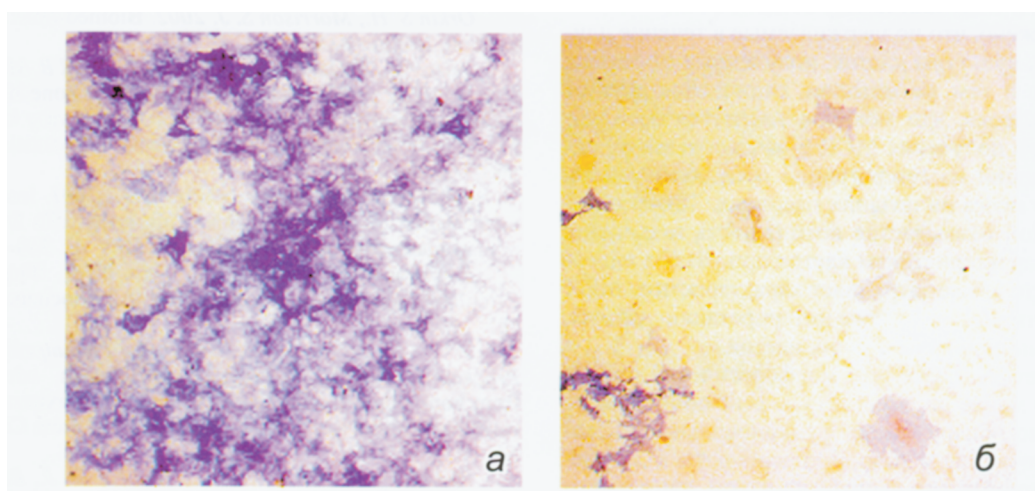


Рис. 6. Окраска культивируемых МСК на щелочную фосфатазу.

a — клетки в остеогенной среде, *б* — контроль (спонтанная дифференцировка); показаны результаты одного из репрезентативных экспериментов для одной из культур МСК. Об. 10×.

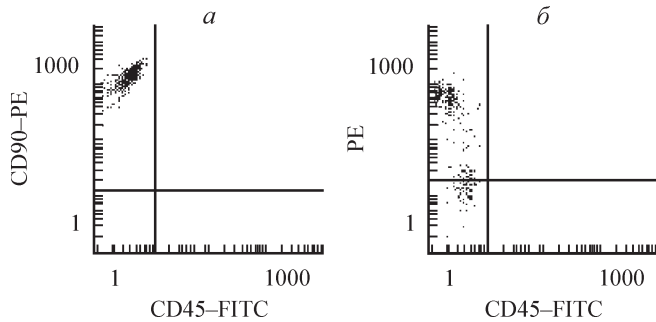


Рис. 7. Изменения паттерна экспрессии CD90 МСК в культуре 1 при длительном культивировании.

а, б — 18-й и 47-й пассажи соответственно; по осям — то же, что и на рис. 5.

Интересно, что на поздних пассажах МСК экспрессировали те же маркеры. Однако в отношении маркера CD90 в случае культуры 1 отмечалось снижение уровня его экспрессии основной частью клеток, а также появление популяций клеток с низкой степенью экспрессии CD90 (рис. 7). Этот факт говорит о необходимости контроля за фенотипическими характеристиками МСК, поскольку экспрессия тех или иных маркеров может изменяться при их длительном культивировании.

Таким образом, из костного мозга крыс были получены и охарактеризованы различные культуры МСК. Показано, что популяции МСК свойственна высокая степень гетерогенности, которая проявляется не только в пределах культуры, выделенной от одного животного, но и при сравнении культур, выделенных от разных животных, что затрудняет характеристику МСК и оценку их пластичности. При этом ранние пассажи характеризовались высокой степенью гетерогенности, в то время как на поздних пассажах клетки были преимущественно однотипными. Морфологически гомогенные культуры, с одной стороны, могут быть более предпочтительными для оценки воздействия того или иного фактора на популяцию клеток, поскольку однородность культуры облегчала бы интерпретацию результатов. С другой стороны, необходимо учитывать вероятность изменения кариотипа, а также длительное пребывание клеток в среде культивирования с различными ростовыми факторами, которые могут изменять чувствительность клеток к тому или иному воздействию.

Было обнаружено, что поддерживаемые в течение длительного периода культуры клеток, полученные от разных животных одним и тем же методом, отличались друг от друга морфологически, что может объясняться неспецифичностью метода получения МСК и «выщеплением» одной из субпопуляций из гетерогенной популяции клеток стромы костного мозга на поздних пассажах. Таким образом, сомнительной оказывается возможность получения идентичных по характеристикам клеток при разных способах выделения, что также затрудняет характеристику МСК и оценку их пластичности, а также интерпретацию данных, полученных с использованием таких клеток.

Следует отметить также, что морфологически разные культуры тем не менее не различались фенотипически по ряду маркеров, но обнаруживали функциональные различия, свидетельствующие о разной способности к дифференцировке в остеогенном направлении при длительном культивировании. Это требует подбора более специфических маркеров, а также диктует необходимость проведения функциональных тестов для идентификации МСК.

Работа выполнена при поддержке программы фундаментальных исследований ОБН РАН.

Список литературы

- Тепляшин А. С., Коржикова С. В., Шарифуллина С. З., Чутикова Н. И., Ростовская М. С., Савченкова И. П. 2005а. Характеристика мезенхимных стволовых клеток человека, выделенных из костного мозга и жировой ткани. Цитология. 47 (2) : 130—135.
- Тепляшин А. С., Чутикова Н. И., Коржикова С. В., Шарифуллина С. З., Ростовская М. С., Топчиашвили З. А., Савченкова И. П. 2005б. Сравнительный анализ двух клеточных популяций с фенотипом, подобным мезенхимным стволовым клеткам, выделенных из разных участков подкожно-жировой клетчатки. Цитология. 47 (7) : 637—643.
- Чертков И. Л., Друзе Н. И. 2005. Дифференцировочный потенциал стволовых клеток (проблема пластичности). Вестн. РАМН. 10 : 37—44.
- Barry F. P., Murphy M. J. 2004. Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization. Int. J. Biochem. Cell Biol. 36 : 568—584.
- Bianco P., Riminucci M., Gronthos S., Robey P. G. 2001. Bone marrow stromal cells: nature, biology and potential applications. Stem Cells. 19 : 180—192.
- Colter D. C., Class R., DiGirolamo C. M., Prockop D. J. 2000. Rapid expansion of recycling stem cells in cultures of plastic-adherent cells from human bone marrow. PNAS. 97 : 3213—3218.
- Colter D. C., Sekiya I., Prockop D. J. 2001. Identification of a subpopulation of rapidly self-renewing and multipotential adult stem cells in colonies of human marrow stromal cells. PNAS. 98 : 7841—7845.
- Fibbe W. E. 2002. Mesenchymal stem cells. A potential source for skeletal repair. Ann. Rheumatic Diseases. 61 : 29—31.
- Friedenstein A. J., Gorskaja J. F., Kulagina N. N. 1976. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. Exp. Hematol. 4 : 267—274.
- Javazon E. H., Colter D. C., Schwartz E. J., Prockop D. J. 2001. 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. 19 : 219—225.
- Jiang Y., Jahagirdar B. N., Reinhardt R. L., Schwartz R. E., Keene C. D., Ortiz-Gonzalez X. R., Reyes M., Lenvik T., Lund T., Blackstad M., Du J., Aldrich S., Lisberg A., Low W. C., Largaespada D. A., Verfaillie C. M. 2002. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. Nature. 418 : 41—49.
- Minguell J. J., Erices A., Conget P. 2001. Mesenchymal stem cells. Exp. Biol. Med. 226 : 507—520.
- Orkin S. H., Morrison S. J. 2002. Biomedicine: stem-cell competition. Nature. 418 : 25—27.
- Peister A., Mallat J. A., Larson B. L., Hall B. M., Gibson L. F., Prockop D. J. 2004. 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. 103 : 1662—1668.
- Prockop D. J., Sekiya I., Colter D. C. 2001. Isolation and characterization of rapidly self-renewing stem cells from cultures of human marrow stromal cells. Cytotherapy. 3 : 393—396.
- Roufosse C. A., Direkze N. C., Otto W. R., Wright N. A. 2004. Circulating mesenchymal stem cells. Int. J. Biochem. Cell Biol. 36 : 585—597.
- Sekiya I., Larson B. L., Smith J. R., Pochampally R., Cui J. G., Prockop D. J. 2002. Expansion of human adult stem cells from bone marrow stroma: conditions that maximize the yields of early progenitors and evaluate their quality. Stem Cells. 20 : 530—541.
- Woodbury D., Schwartz E. J., Prockop D. J., Black I. B. 2000. Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. J. Neurosci. Res. 61 : 364—370.

HETEROGENEITY OF STROMAL PRECURSOR CELLS ISOLATED FROM RAT BONE MARROW

E. B. Anokhina, L. B. Buravkova

SSC RF Institute of Biomedical Problems RAS, Moscow;
e-mail: buravkova@impb.ru

Bone marrow stroma contains mesenchymal stem cells (MSC) which are precursor for at least mesenchyma-derived cells. Recent investigations revealed a lot of questions concerning MSC biology that should be further refined. The aim of this study was the comparative analysis of rat bone marrow stroma cells cultures. Mesenchymal precursor cells isolated from rat bone marrow were passed up to 50 times. Comparative morphological and immunophenotypical analysis of these cultures was carried out as well as their ability to osteogenic differentiation was studied. The isolated cultures contained morphologically different types of cells and thus showed a high heterogeneity level. Morphology of these cell types was described. The heterogeneity level was reported to decrease over time. It was found out that subcultures isolated from different rats shared the same immunophenotype characteristics (CD90⁺, CD44⁺, CD54⁺, CD106⁺, CD45⁻, CD11b⁻), but differed in their morphology as well as in ability to osteogenic differentiation. Thus MSC identification requires more specific marker and functional tests to be used.

Key words: mesenchymal precursor cells, bone marrow, heterogeneity, mesenchymal stem cells.
