

DUGOTRAJNA KULTURA KOŠTANE SRŽI

SILVANA STANOVIĆ I MILIVOJ BORANIĆ

Institut »Ruđer Bošković«, Zagreb

Primljeno 11. kolovoza 1998.

Dugotrajna kultura koštane srži eksperimentalni je model hematopoeze koji *in vitro* reproducira uvjete hematopoetskog mikrokružja *in vivo*. U dugotrajnoj kulturi postiže se proliferacija i diferencijacija primitivnih matičnih hematopoetskih stanica mezenhinskog podrijetla. Dugotrajnu kulturu koštane srži čine adherentni stromalni sloj i slobodne stanice u tekućem dijelu (supernatantu) kulture. U dugotrajnoj se kulturi hematopoeza zbiva bez egzogenih poticatelja rasta jer njih stvara stromalni sloj. Izgled i razvitak strome, proliferacija i diferencijacija progenitorskih stanica i proizvodnja citokina razlikuju se u dugotrajnoj kulturi normalne i patološki promijenjene koštane srži. Dugotrajna se kultura koštane srži upotrebljava u fundamentalnim istraživanjima hematopoeze, u farmakološkim ispitivanjima učinaka lijekova i imunocitokina na hematopoezu, za čišćenje autotransplantata koštane srži od preostalih leukemijskih stanica te za prijenos gena. Također je prikladan laboratorijski model za *in vitro* ispitivanje karcinogenih i drugih štetnih činitelja iz okoline koji utječu na krvotvorno tkivo pri profesionalnom ili habitualnom izlaganju.

Cljučne riječi:
antineoplastičke tvari, hematopoeza, oštećenje hematopoeze, stanična kultura, stanična proliferacija i diferencijacija

Dugotrajna kultura koštane srži (LTBMC)¹ laboratorijska je tehnika koja *in vitro* vrlo vjerno reproducira uvjete hematopoeze i hematopoetskog mikrokružja *in vivo*. Postupak za dugotrajno uzgajanje ljudske koštane srži pronađen je 1980. godine (1). Upotrebljava se u kliničkoj i eksperimentalnoj hematologiji.

Opis modela dugotrajne kulture koštane srži

Tehnikom dugotrajnog kultiviranja koštane srži postiže se proliferacija i diferencijacija prastanica, primitivnih hematopoetskih matičnih stanica (LTC-IC) koje se u stromalnom

¹ Abecedni popis skraćenica dan je na kraju teksta (str. 272–3).

okružju dugotrajne kulture diferenciraju u pluripotentne progenitorske stanice CFU-blast i usmjerene progenitorske stanice. Većina CFU-blasta miruje u G₀-fazi staničnog ciklusa i nije osjetljiva na kemoterapijske inhibitore S-faze staničnog ciklusa. Pripadaju populaciji primitivnih matičnih stanica koštane srži koje izražavaju membranski biljeg specifičan za matične stanice, CD34 (2).

Dugotrajna kultura koštane srži može biti jednostupanjska ili dvostupanjska. Jednostupanjska se dugotrajna kultura koštane srži razvija iz uzorka koštane srži koji se zasije u bočicu za kultiviranje i redovito dohranjuje medijem. Upotrebljava se hranjivi medij Iscove-Dulbecco koji sadržava aminokiseline, vitamine, glukozu, puferski sustav te ione kalcija i selen. Mediju se dodaje 15% fetalnog telećeg seruma i 15% konjskog seruma i 10⁻⁶ M hidrokortizona (3). U kulturi se iz zasijanih stanica formira stromalni sloj, a zatim otočići hematopoeze. Hematopoeza se u jednostupanjskoj dugotrajnoj kulturi ljudske koštane srži može održavati *in vitro* 8–12 tjedana bez dodavanja hematopoetskih faktora rasta. Opstanak, razvitak i napredak kulture ovise o formiranju adherentne, stromalne populacije stanica.

Dvostupanjska se dugotrajna kultura postiže zasijavanjem uzorka koštane srži na adherentni sloj stromalnih stanica koji se pripremio unaprijed. Kultura ljudske koštane srži u kojoj se stvorio stromalni sloj – a to je otprilike dva tjedna nakon zasijavanja – ozrači se s 15 Gy da se inaktiviraju hematopoetske stanice i spriječi rast fibroblasta. Preostaje stromalni sloj koji će obavljati pomoćničku funkciju hematopoetskog mikrookružja. Na nj se zasije drugi uzorak koštane srži istog ili drugog davatelja. Prema tome, dvostupanjska LTBMC može biti autologna ili alogenična. Kao stromalni hranjivi sloj za ljudsku koštanu srž može poslužiti i mišja fibroblastna stanična linija. Konfluentni sloj mišjih fibroblasta ozrači se s 80 Gy da se zakoči daljnja stanična proliferacija i zasije se uzorak ljudske koštane srži (4). To je heterogenična LBTMC.

Adherentni sloj stromalnih stanica. Adherentna stanična populacija čini stromalni sloj koji drži krvne stanice na okupu, proizvodi hematopoetske činitelje rasta (citokine) i neposrednim dodiranjem pomaže diobu, diferencijaciju i sazrijevanje hematopoetskih progenitorskih stanica (3, 5).

Razvoj stromalnog sloja može se pratiti inverznim mikroskopom. Prvi se tjedan stroma sastoji od pojedinačnih, vretenastih stanica s adheriranim agregatima malih stanica. Drugi se tjedan pojavljuju krpice adherentnog sloja sastavljene od makrofaga i fibroblasta, s uklopljenim agregatima malih stanica. Opisane tvorbe podsjećaju na oblutke (engl. *cobblestone*). To su žarišta hematopoeze iz kojih se u supernatant odvajaju krvotvorne stanice na različitim stupnjevima diferencijacije. Treći se tjedan u stromi počnu umnožavati masne stanice i adherentni sloj dostiže konfluenciju. Nakon 5–6 tjedana postepeno prestaje proizvodnja krvotvornih stanica koje se odvajaju u supernatant i u kulturama preostaje samo adherentni sloj koji postepeno involuira (3).

Protočnim razvrstavačem stanica (citometrom) analizirane su stanice koje čine adherentni stromalni sloj. Na samom početku kultivacije, nakon zasijavanja koštane srži zdravih osoba, na dno kultivacijskih bočica priljube se mononuklearne stanice među kojima se citometrom mogu razlučiti dvije osnovne stanične populacije: u limfo citnoj ogradi 22% stanica, a u mijelomonocitnoj ogradi 78%. Sljedeći se dan u kulturi javlja treća homogena populacija stanica sa svojstvima fibroblasta i makrofaga koja čini 34% adherentnog sloja, a četvrtog se dana mogu naći četiri homogene stanične populacije: limfocitna, mijelomonocitna, fibroblastna i makrofagna. Do četrnaestog dana kultiviran-

ja postepeno se u stromi povećava udio fibroblasta, a smanjuje udio mijelomonocitnih stanica. Stvaranje makrofaga relativno je stabilno; oni čine 10–30% stanične populacije stromalnog sloja. Poslije dva tjedna kultiviranja adherentni je stromalni sloj definitivno razvijen, dostiže konfluenciju i ostaje nepromijenjen sljedećih tjedana. Čine ga: limfocitna skupina stanica s membranskim biljezima CD45⁺,VIM2⁻,CD14⁻ (11%), mijelomonocitne stanice CD45⁺,VIM2⁺,CD14⁻ (16%), skupina makrofagnih stanica CD45⁺,VIM2⁺,CD14⁺ (21%) i skupina fibroblastnih stanica CD45⁻,VIM2⁻,CD14⁻; kolagen III⁺ (52%).

Drugi su tjedan, dakle, fibroblasti glavna stanična populacija adherentnog sloja. Limfocitne i mijelomonocitne stanice koje se tada također nalaze u adherentnom sloju podrijetlom su iz prvobitno zasijane stanične populacije koštane srži ili su nastale diferencijacijom nezrelih prekursora (6).

Prema jednim autorima, endotelne stanice čine 5–20% adherentnih stanica, a drugi ih nisu uspjeli naći. Adipocita obično ima u zrelijim LTBMČ, a njihova nazočnost ovisi o količini i omjeru fetalnog telećeg i konjskog seruma, o koncentraciji hidrokortizona i o drugim uvjetima kultivacije. Sastav je adherentnog sloja vrlo sličan stromi koštane srži *in vivo* (7).

Akcesorne stanice. Staničnu populaciju akcesornih (pomoćničkih) stanica čine T-limfociti i monociti. Pomoćničke su stanice nužne za proliferaciju matičnih prastanica (LTC-IC) iz kojih zapravo poraste dugotrajna kultura koštane srži. T-limfociti stvaraju faktore rasta IL-1, IL-6, IL-9, IL-10, GM-CSF, IFN γ , LIF i TNF α . S druge strane, aktivnost T-limfocita reguliraju interleukini IL-1 do IL-10, GM-CSF, G-CSF, IFN α , IFN β , IFN γ , TGF β i TNF α (7).

Koncentracija IL-6 i LIF u dugotrajnoj kulturi koštane srži zdravih davatelja ovisi o sastavu zasijane stanične populacije. Dugotrajne kulture cjelokupne populacije mononuklearnih stanica koštane srži stvaraju IL-6 i LIF, a kulture pročišćenih progenitorskih stanica CD34⁺ nemaju tu sposobnost. Stoga se kultiviranjem svih mononuklearnih stanica među kojima je koncentracija stanica CD34⁺lin⁻ svega 2% dobije tri do pet puta veći ukupan broj stanica GM-CFU i LTC-IC nego kad se kultivira jednak broj pročišćenih matičnih stanica među kojima 95% čine CD 34⁺lin⁻ stanice (8).

Ekstracelularni matriks. Izvanstanična potka (ekstracelularni matriks) koja se razvije u LTBMČ sastoji se od kolagena I, III, IV, V i VI, laminina, fibronektina, trombospondina, hemonektina i proteoglikana (7, 9).

Kolageni I, III, IV, V i VI omogućuju prianjanje hematopoetskih stanica. Porodica kolagena ima 19 članova, a svi sadržavaju istovrsnu strukturu trostrukih domena u obliku uzvojnice (10). Granulocitne i eritrocitne progenitorske stanice sposobne su čvrsto se vezati za kolagen I, pa se ovaj protein smatra važnim za zadržavanje progenitorskih stanica u koštanoj srži. Zrele mijeloidne stanice i monociti slabije prianjaju za kolagen I nego nezrele stanice (11). U dugotrajnoj kulturi koštane srži kolageni I, IV, V i VI smješteni su ekstracelularno. *In vivo*, kolagen IV nalazi se u endotelnoj bazalnoj membrani, a kolageni V i VI uglavnom između hematopoetskih stanica koje proliferiraju. Kolagen III uglavnom je smješten intracelularno, u adherentnim stanicama strome. Od pet vrsta kolagena prisutnih u koštanoj srži, kolagen VI je najjače adhezivan. Sposobnost sinteze kolagena VI u koštanoj srži potvrđena je analizom ekstrakta stromalnih stanica iz dugotrajne kulture metodom Western blot. Mogući stanični adhezivski receptori za kolagen VI na hematopoetskim stanicama jesu četiri transmembranska proteoglikana koji imaju strukturu heparansulfata. Nazvani su sindekani 1, 2, 3 i 4. Budući da kolagena I i VI ima posvuda u ljudskom organizmu, specifičnost vezanja

krvotvornih stanica za stromu koštane srži ovisi i o nazočnosti drugih adhezijskih receptora na krvotvornim stanicama. Ti se receptori izražavaju u pojedinim razdobljima razvoja krvotvornih stanica i imaju raznovrsnu specifičnost (10).

Fibronektin je ubikvitarna molekula izvanstanične potke koja također omogućuje prihvaćanje hematopoetskih stanica za stromalne stanice u LTBMK. Nezrele stanice crvene loze čvrsto adheriraju na fibronektinsku potku, ali se tijekom dozrijevanja afinitet za fibronektin smanjuje budući da stanice gube fibronektinske receptore. Stoga retikulociti izlaze iz koštane srži u cirkulaciju (9).

Trombospondin ima u ljudskoj koštanoj srži funkciju citoadhezijskog proteina za pluripotentne progenitorske stanice (CFC-GEMM) i za stanice usmjerene k eritropoezi, granulocitopoezi i megakariocitopoezi. Zreli granulociti i eritrociti postepeno gube sposobnost vezanja za trombospondin vjerojatno zbog regulacije trombospondinskog receptora nadolje tijekom stanične diferencijacije (9). Nedavno su klonirana tri različita trombospondina (TSP 1 do 3) (12).

Hemonektin je glikoprotein koji ima ulogu adhezijske molekule za granulocite (9).

Proteoglikane (PG) – heparanski, dermatinski i hondroitinski sulfat i polimorfni membranski proteoglikan CD44 – sintetiziraju u dugotrajnoj kulturi ljudske koštane srži stromalne stanice. Poticanjem sinteze PG *in vitro* pojačava se proliferacija hematopoetskih stanica, a PG pomažu i diferencijaciju prekursorskih stanica. Postranični lanci heparanskog sulfata vežu GM-CSF i IL-3 i predočuju ih progenitorskim hematopoetskim stanicama u biološki aktivnom obliku. Proteoglikan CD44 polimorfni je protein stanične membrane koji ima funkciju staničnog receptora na limfocitima T i B, neutrofilima i tumorskim stanicama. Važan je u interakcijama koje se zbivaju u ekstracelularnom matriksu jer mu je specifični ligand hijaluronska kiselina, jedna od sastavnica stanične membrane. U mikrookružju limfnog čvora sudjeluje u aktivaciji limfocita i zadržavanju stanica unutar čvora (9).

Neadherentne stanice. U početku dugotrajne kulture stanica koštane srži brzo se smanjuje ukupan broj svih neadherentnih stanica – zrelih i progenitorskih. Nakon 2–3 tjedna ukupan broj neadherentnih stanica smanjuje se na 10–30% prvobitno zasijane stanične populacije, a broj progenitora GM-CFU smanjuje se na 8–10% početne vrijednosti. Za to se vrijeme razvija stromalni sloj. Nakon početnog smanjivanja broja progenitorskih stanica GM-CFU, rast i sazrijevanje granulocitne loze u dugotrajnoj kulturi koštane srži dostiže stalnu razinu na kojoj se održava od 4. do 12. tjedna. Osim usmjerenih matičnih stanica GM-CFU, u supernatantima dugotrajnih kultura nalaze se promijelociti, metamijelociti, mijelociti, nesegmentirani i segmentirani granulociti i makrofazi. Eritrocitne su progenitorske stanice uglavnom prisutne u prva tri tjedna kultiviranja (3). Stromalne stanice u dugotrajnoj kulturi ne izlučuju eritropoetin, pa u završnom razdoblju kultiviranja slabi proizvodnja eritrocitnih progenitorskih stanica i zrelih eritrocita (13).

Podrijetlo stanica koje tvore mikrookružje

Makrofazi, cirkulirajući monociti i T-limfociti koštane srži potječu od pluripotentnih hematopoetskih matičnih stanica. Podrijetlo stromalnih stanica nije posve jasno. O fibroblastima se zna da potječu od adherentnih progenitorskih stanica koje nisu sposobne fagocitirati (dakle ne pripadaju makrofagnoj lozi). Fibroblastni progenitori stvaraju *in vitro* fibroblastne kolonije (CFU-F). Razlikuju se od primitivnih matičnih stanica koje stvaraju kolonije hematopoetskih stanica (CFU-C) i vjerojatno imaju drukčije podrijetlo. Stanice

CFU-F izražavaju antigen na koji se veže monoklonsko protutijelo STRO-1, a taj antigen izražavaju i stanice iz kojih se razvijaju adipociti i endotel. S druge strane, stanice CFU-F imaju neke fenotipske značajke hematopoetskih progenitora, npr. izražavaju obilježje CD34. Ima podataka da u dugotrajnim kulturama koštane srži koja je uzeta od bolesnika s alogeničnim presatkom hematopoetski mikrookoliš potječe od primatelja, izuzevši makrofage, a krvotvorne stanice od presatka. To bi doista upućivalo na nezavisno podrijetlo hemopoetskih i stromalnih stanica. Međutim, kontroverze o podrijetlu hematopoetskih i stromalnih stanica nisu dokraja riješene i nije jasno postoji li zajednička matična stanica ili se radi o dvije različite matične stanice (7).

Većina je CD34⁺-stanica već usmjerena prema jednoj krvnoj lozi, a odnedavno se pokušava precizno karakterizirati subpopulacija CD34⁺-stanica koja bi bila još posve neusmjerena, pluripotentna (14). Matične stanice koje nose membranska obilježja CD34⁺, HLA-DR⁺ i CD38⁻ diferenciraju se u smjeru hematopoetskih prekursora svih loza, a matične stanice CD34⁺, HLA-DR⁻, CD38⁻ mogu se diferencirati i u smjeru hematopoetskih prekursora i u smjeru stromalnih stanica. Te su stanice dakle primitivnije od onih prvih. U nazočnosti poticatelja rasta IGF-1 i b-FGF one nakon 7–10 dana stvaraju u dugotrajnoj kulturi elipsoidne stanice s obilježjima fibroblasta. Nakon 10–13 dana pojavljuju se vretenaste stanice koje tvore organiziranu staničnu strukturu s uređenim redovima stanica, a za 15–17 dana pojavljuju se složene strukture raznovrsnih stromalnih elemenata na podlozi vretenastih stanica sličnih fibroblastima. Na rubovima tih tvorba pojavljuju se tada hematopoetske stanice. Zna se da je subpopulacija matičnih stanica CD34⁺, HLA-DR⁻, CD38⁻ vrlo primitivna te da u dugotrajnoj kulturi može začeti sve stanične loze.

Hematopoetske stanice iz dugotrajnih kultura reklonirane su uz dodatak IL-3, IL-6, GM-CSF, b-FGF, IGF-1, Epo i SCF. U poraslim su se kolonijama citomorfološki mogli identificirati neutrofilni, eozinofilni, bazofilni, eritrociti, monociti, makrofazi, megakariociti, trombociti i B-limfociti – dakle stanice svih loza. Mikroskopska analiza morfologije stromalnih stanica pokazala je da među njima ima mezenhimskih stanica koje su se diferencirale u smjeru fibroblasta, adipocita, glatkomišićnih stanica, endotelnih stanica, hondrocita i osteoblasta.

Podaci ovih eksperimenata govore da postoji zajednička matična prastanica iz koje se najprije stvaraju stromalne matične stanice, a stromalno bi mikrookružje zatim induciralo diferencijaciju zajedničke matične prastanice u hematopoetsku matičnu stanicu (15).

Interakcije između hematopoetskih stanica i mikrookružja

Stanice mikrookoliša mogu utjecati na hematopoezu u pozitivnom ili negativnom smjeru različitim mehanizmima: izravnim dodiranjem, izlučivanjem proteina koji čine ekstracelularni matriks i proizvodnjom citokina. Navedeni mehanizmi djeluju simultano (16).

Izravan stanični dodir. U kulturi ljudske koštane srži većina je hematopoetskih progenitora smještena u adherentnom sloju. To dokazuje da je za proliferaciju, diferencijaciju i dozrijevanje hematopoetskih stanica potreban neposredni dodir progenitorskih stanica sa stromalnim (13). Općenito se smatra da progenitorske stanice koje začinju dugotrajnu kulturu ljudske koštane srži (LTC-IC) pripadaju populaciji najprimitivnijih hematopoetskih matičnih prastanica. One sudjeluju i u stvaranju stromalnog sloja s kojim će kasnije u procesu hematopoeze ostati u bliskom kontaktu (2).

U dugotrajnoj se kulturi koštane srži hematopoeza zbiva bez dodavanja poticatelja rasta. Za trajno samoobnavljanje hematopoetskih matičnih stanica te za diferencijaciju i razvoj u zrele stanice potreban je izravan dodir sa stromalnim stanicama. Ako se kontakt spriječi polupropusnom membranom, hematopoeza brzo involuira. Ovi podaci upućuju na to da slobodni poticatelji rasta (citokini) koje stvaraju i izlučuju stromalne stanice nemaju glavnu ulogu u hematopoezi. Potrebni se poticatelji diobe i razvoja hematopoetskih stanica nalaze na membranama stromalnih stanica i predočuju se hematopoetskim stanicama izravnim staničnim dodirima. Ti membranski citokini nastaju u stromalnim stanicama, transportiraju se na staničnu površinu i/ili izlučuju i odmah sekvstriraju vežući se na stanične membrane ili izvanstaničnu potku. S obzirom na to da su stromalne stanice koštane srži heterogena populacija koju čine fibroblasti, retikularne stanice, adipociti, endotelne stanice i makrofazi, moguće je da pojedine stanične vrste stvaraju/sekvstriraju specifične citokine (17).

Pojedini poticatelji rasta prisutni su i u slobodnom (topljivom) obliku i vezani na staničnu membranu stromalnih stanica. To je npr. poticatelj rasta makrofaga (M-CSF, CSF-1) (18). Poticatelj rasta matičnih prastanica (SCF, *kit*-ligand, mastocitni poticatelj rasta) također se stvara u oba oblika: kao topljiva tvar i kao sastavnica stanične membrane. Membranski oblik SCF-a ima dvojnju ulogu činitelja rasta i adhezijske molekule (17).

Citokinska regulacija proliferacije krvotvornih stanica. Stanice mikrookružja u dugotrajnoj kulturi glavni su izvor hematopoetskih citokina. Najvažniji poticajni činitelji (stimulatori) jesu: GM-CSF, G-CSF, M-CSF, SCF, IL-1 i IL-6, a inhibitori su: TNF α , TGF β i IFN γ (7, 17).

GM-CSF koji nastaje u stromalnim stanicama prolazi kroz njihovu staničnu membranu i selektivno se veže za glikozaminoglikane izvanstanične potke (ekstracelularnog matriksa). Ekstracelularni matriks vjerojatno igra ključnu ulogu u predočivanju GM-CSF i drugih činitelja hematopoetskim stanicama (7).

Biološki aktivni M-CSF i G-CSF nalaze se u supernatantima ljudskih LTBMCM u koncentracijama nalik onima *in vivo*. Uloga je M-CSF pomaganje proliferacije i sazrijevanja monocitnih stanica. Ali, kada se rekombinantni ljudski M-CSF doda u ljudsku LTBMCM u koncentraciji koja je 3–4 puta veća od endogene, hematopoeza se inhibira. To se pripisuje stvaranju TNF α u makrofazima. Taj činitelj ograničava rast multipotentnih, mijeloidnih i eritrocitnih progenitora. Dakle, M-CSF djeluje dvostruko: kao pozitivni i kao negativni regulator hematopoeze (7).

GM-CSF, G-CSF i IL-3 dodani u ljudsku LTBMCM potiču stvaranje progenitorskih stanica (3, 5, 19). Dodatak IL-1 i/ili PDGF u dugotrajnu kulturu pobuđuje stromalne stanice da stvaraju poticajne hematopoetske citokine (npr. GM-CSF) koji pomažu proliferaciju hematopoetskih progenitora. Suprotno, dodatak inhibitora hematopoeze TGF β u dugotrajnu kulturu poništava poticajni učinak dohranjivanja svježim medijem ili dodatka IL-1 i IL-2. Naime, TGF β sprečava ulazak primitivnih progenitorskih stanica BFU-E i GM-CFU u S-fazu staničnog ciklusa pa tako smanjuje proliferaciju hematopoetskih primitivnih progenitorskih stanica u adherentnom sloju. Izlučujući inhibitori činitelj TGF β , stromalne stanice drže hematopoetske progenitore u svojoj okolini izvan staničnog ciklusa, u fazi G₀ U kontroli proliferacije hematopoetskih progenitorskih stanica nužna je dakle ravnoteža između faktora koji potiču hematopoezu i onih koji je ograničavaju, dakle između stimulatora i inhibitora (20).

Citokinska regulacija diferencijacije krvotvornih stanica. Iz prekursorskih stanica GM-CFU razvijaju se klonovi diferenciranih, zrelih granulocita i makrofaga koji se više ne dijele. Za rast kolonija i skupina iz prekursorskih stanica GM-CFU potrebno je usklađeno djelovanje činitelja koji održavaju staničnu vijabilnost, potiču diobu i dozrijevanje i konačno zaustavljaju stanično umnožavanje. U načelu, činitelj koji potiče umnažanje stanica nije istodobno prikladan za pokretanje dozrijevanja, i obrnuto. Izuzetak je IL-3 (multi-CSF) koji djeluje i kao poticatelj proliferacije i kao induktor diferencijacije. Činitelj koji djeluje samo kao pokretač diferencijacije jest IL-6. Citokin IL-1 uz ostale funkcije u organizmu također djeluje i kao pokretač diferencijacije, pa zajedno s IL-6 održava vijabilnost i pobuđuje diferencijaciju normalnih mijeloidnih progenitora. Oba citokina, IL-1 i IL-6 sinergistički pomažu i djelomičnu diferencijaciju mijeloidnih leukemijskih stanica. Jednako djeluju D-faktor i DIF (činitelj koji inducira diferencijaciju). Sinonimi za D-faktor jesu HILDA (humani interleukin za DA stanice) i LIF (21). Činitelj koji inducira diferencijaciju (DIF) oblik je TNF-a. U stvaranju normalnih mijeloidnih kolonija od GM-CFU sudjeluju D-faktor, IL-1 i IL-6 sinergistički s IL-3.

IL-11, onkostatini M i cilijarni neurotrofni faktor imaju strukturne i funkcionalne sličnosti s IL-6 i LIF i služe se istim signalnim proteinom gp130 na staničnoj membrani. IL-5 inducira diferencijaciju eozinofila (22).

Inhibitori hematopoeze. Pojedini citokini djeluju inhibitoryno na rane progenitorske stanice, a stimuliraju diferenciranije hematopoetske oblike. U tom je pogledu najzanimljiviji citokin TGF β jer mijenjajući izražavanje površinskih receptora za ostale citokine ograničava diobenu aktivnost ranih matičnih stanica, a potiče proliferaciju zrelijih potomaka. Ostali inhibitori limfohematopoeze jesu: H-podjedinica laktoferina, IFN α , β i γ , TNF α i β , prostaglandini E₁ i E₂, inhibin i laktoferin.

Poznati inhibitori hematopoeze jesu kemokini, oligopeptidi koji utječu na stanični motilitet i fagocitozu. Skupinu kemokina α čine: MIP-2 α , MIP-2 β , PF-4, IL-8, IP-10, NAP-2. Skupinu kemokina β pripadaju: MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES i makrofagni kemotaksijski i aktivacijski faktor (MCAF). Mali peptidi s inhibitornim učinkom na hematopoezu jesu tetrapeptid AcSDKP (seraspenid, N-acetil-serilasparaginil-lizilprolin) i pentapeptid pEEDCK (Glu-Glu-Asp-Cys-Lys; glutamilglutamilasparaginilcisteinil-lizin). Te inhibitorne molekule zadržavaju ulazak matičnih stanica u S-fazu staničnog ciklusa (tetrapeptid), uklanjaju stanice iz S-faze (pentapeptid) ili brzo i reverzibilno obavljaju obje funkcije (MIP-1 α i ostali kemokini). Stoga se pretpostavlja da bi mogli poslužiti za zaštitu normalne hematopoeze u bolesnika s neoplastičnim bolestima koji primaju kemoterapijske agense što djeluju na stanice u diobi (23, 24).

Primjena dugotrajne kulture koštane srži

Dugotrajna se kultura koštane srži upotrebljava u znanstvenoistraživačkom radu za proučavanje mehanizama koji reguliraju diobu i dozrijevanje krvotvornih stanica. Primjeri su utjecaj stromalnoga sloja i značenje staničnih interakcija. Također služi za proučavanje svojstava matičnih i usmjerenih matičnih stanica hematopoeze na različitim stupnjevima zrelosti. To je prikladan eksperimentalni model za proučavanje uloge hematopoetskog mikrookružja (strome i akcesornih stanica) u poremećajima hematopoeze, primjerice u aplastičnoj anemiji i leukemiji (7).

Pri transplantaciji autologne koštane srži bolesnika s leukemijom u remisiji, dugotrajna se kultura može primjenjivati za uklanjanje leukemijskih stanica iz autotrans-

plantata. Pokazalo se naime da u dugotrajnim kulturama normalne stanice preživljavaju bolje od leukemijskih te da se koštana srž može »očistiti« od leukemijskih stanica koje su preostale nakon provedene kemoterapije. Tako se smanjuje učestalost relapsa nakon autotransplantacije. Za selektivno uklanjanje leukemijskih stanica upotrebljavaju se i specifična protutijela ili antineoplastični lijekovi (25, 26).

Uzgojanje krvotvornih stanica *in vitro* otvara mogućnost genske terapije nasljednih poremećaja. U stanice autologne koštane srži koje se uzgajaju *in vitro* mogu se prikladnim vektorima unijeti geni koji nedostaju (transfekcija), a zatim se tako transficirane stanice vraćaju bolesniku (27).

U farmakološkom istraživanju, dugotrajna se kultura koštane srži primjenjuje za ispitivanje učinaka faktora rasta i antineoplastičnih tvari na krvotvorno tkivo (28, 29). Primjerice, rezultati vlastitih istraživanja u modelu dugotrajne kulture koštane srži potkrepljuju pretpostavku da endogeni opioidni peptidi sudjeluju u regulaciji hematopoeze (30, 31). Slično tomu, u dugotrajnim se kulturama koštane srži mogu ispitivati karcinogenični i drugi štetni učinci različitih kemikalija koje pri profesionalnom ili habitualnom izlaganju oštećuju krvotvorno tkivo (32, 33).

Ukratko možemo reći da je dugotrajna kultura koštane srži vrijedan laboratorijski model za istraživanja na području hematologije, farmakologije i toksikologije. Vjerojatno će ubuduće naći široku primjenu i u genskoj terapiji.

POPIS SKRAĆENICA

AcSDKP	–	<i>seraspenide; acetyl-N-serilasparaginililzilin</i>
b-FGF	–	<i>basic-fibroblast growth factor; bazični činitelj rasta fibroblasta</i>
BFU-E	–	<i>burst forming unit erythroid; stanica koja stvara eritroidnu nakupinu</i>
CD	–	<i>cluster of differentiation; leukocitna diferencijacijska skupina</i>
CFU	–	<i>colony forming unit; stanična jedinica koja stvara koloniju</i>
CFC	–	<i>colony forming cell; stanica koja stvara koloniju</i>
CSF-1	–	<i>colony stimulating factor 1; poticatelj rasta kolonija 1</i>
DA	–	<i>murine interleukin-3-dependent leukaemic cell line; mišja leukemijska stanična linija ovisna o IL-3</i>
DIF	–	<i>differentiation inducing factor; činitelj koji potiče diferencijaciju</i>
Epo	–	<i>erythropoetin; eritropoetin</i>
G-CSF	–	<i>granulocyte colony stimulating factor; poticatelj rasta granulocitnih kolonija</i>
GEMM	–	<i>granulocyte/erythrocyte/monocyte/megakaryocyte; granulocit/ eritrocit/ monocit/megakariocit</i>
GM	–	<i>granulocyte/macrophage; granulocit/makrofag</i>
GM-CSF	–	<i>granulocyte – macrophage colony stimulating factor; poticatelj rasta granulocitno-makrofagnih kolonija</i>
IFN	–	<i>interferon</i>
IGF-1	–	<i>insulin-like growth factor-1; činitelj rasta sličan inzulinu -1</i>
IL	–	<i>interleukin</i>
IP	–	<i>interferon inducible protein; protein induciran interferonom</i>
LIF	–	<i>leukemia inhibitory factor; inhibitor leukemijskog rasta</i>
lin	–	<i>blood lineage; hematopoetska stanična loza</i>

LTBMC	–	<i>long term bone marrow culture; dugotrajna kultura koštane srži</i>
LTC	–	<i>long term culture; dugotrajna kultura</i>
LTC-IC	–	<i>LTC initiating cell; prastanica iz koje poraste dugotrajna kultura</i>
MCAF	–	<i>macrophage chemotactic and activating factor; poticatelj kemotaksije i aktivacije makrofaga</i>
M-CSF	–	<i>macrophage colony stimulating factor; poticatelj rasta makrofagnih kolonija</i>
MIP	–	<i>macrophage inflammatory protein; makrofagni upalni protein</i>
NAP	–	<i>neutrophil activating peptide; peptid koji aktivira neutrofile</i>
pEEDCK	–	<i>pentapeptide EEDCK; pentapeptid glutamilglutamilasparaginilglicil-lizin</i>
PDGF	–	<i>platelet derived growth factor; trombocitni činitelj rasta</i>
PF	–	<i>platelet factor; trombocitni činitelj</i>
RANTES	–	<i>regulated on activation normal T expressed and secreted ; činitelj koji se izlučuje nakon podražaja T-limfocita</i>
SCF	–	<i>stem cell factor; poticatelj rasta matičnih stanica</i>
TGF	–	<i>transforming growth factor; transformirajući činitelj rasta</i>
TNF	–	<i>tumour necrosis factor; činitelj nekroze tumora</i>
VIM	–	<i>vimentin</i>

LITERATURA

1. Gartner S, Kaplan HS. Long-term culture of human bone marrow cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1980;77:4756–9.
2. Verfaillie C, Blakolmer K, McClave P. Purified primitive human hematopoietic progenitor cells with long-term in vitro repopulating capacity adhere selectively to irradiated bone marrow stroma. *J Exp Med* 1990;172:509–20.
3. Coutinho LH, Gilleece MH, DeWynter EA, Will A, Testa NG. Clonal and long-term cultures using human bone marrow. U: Testa NG, Molineux G, ur. *Haematopoiesis, A Practical Approach*. Oxford: Oxford University Press, 1993:75–106.
4. Eaves CJ. Assays of hemopoietic progenitor cells. U: Beutler E, Lichtman MA, Coller BS, Kipps TJ, ur. *Williams Hematology Fifth Edition*. New York: McGraw-Hill Inc, 1995:L22–L26.
5. Otsuka T, Thacker JD, Hogge DE. The effect of interleukin 6 and interleukin 3 on early hematopoietic events in long-term cultures of human marrow. *Exp Hematol* 1990;19:1042–8.
6. Andreoni C, Moreau I, Rigal D. Long-term culture of human bone marrow. I. Characterization of adherent cells in flow cytometry. *Exp Hematol* 1990;18:431–7.
7. Mayani H, Guilbert LJ, Janowska-Wieczorek A. Biology of the hematopoietic microenvironment. *Eur J Haematol* 1992;49:225–33.
8. Koller MR, Palsson MA, Manchel I, Palsson BO. Long-term culture-initiating cell expansion is dependent on frequent medium exchange combined with stromal and other accessory cell effects. *Blood* 1995;86:1784–93.
9. Long MW. Blood cell cytoadhesion molecules. *Exp Hematol* 1992;20:288–301.
10. Klein G, Müller CA, Tillet E, Mon-Li C, Timpl R. Collagen type VI in the human bone marrow microenvironment: A strong cytoadhesive component. *Blood* 1995;86:1740–8.
11. Koenigsmann M, Griffin JD, DiCarlo J, Cannistra SA. Myeloid and erythroid progenitor cells from normal bone marrow adhere to collagen type I. *Blood* 1992;79:657–65.
12. Clezardin P, Frappart L, Clerget M, Pechoux C, Delmas PD. Expression of thrombospondin (TSP1) and its receptors (CD36 and CD51) in normal, hyperplastic, and neoplastic human breast. *Cancer Res* 1993;53:1421–30.

13. *Mayani H, Guilbert LJ, Janowska-Wieczorek A.* Modulation of erythropoiesis and myelopoiesis by exogenous erythropoietin in human long-term marrow cultures. *Exp Hematol* 1990;18:174–9.
14. *Simmons PJ, Torok-Storb B.* CD34 expression by stromal precursors in normal human adult bone marrow. *Blood* 1991;78:2848–53.
15. *Huang S, Terstappen LWMM.* Formation of hematopoietic microenvironment and haematopoietic stem cells from single human bone marrow stem cells. *Nature* 1992;360:745–9.
16. *Torok-Storb B.* Cellular interactions. *Blood* 1988;72:373–85.
17. *Dexter TM, Testa NG.* Haematopoietic growth factors: Review of biology of potential clinical uses. U: *Growth Factors (cytokines): From Basic Science to the Clinic. Book of Lectures.* Venice: 1993:1–50.
18. *Stein J, Borzillo GV, Rettenmier CW.* Direct stimulation of cells expressing receptors for macrophage colony-stimulating factor (CSF-1) by a plasma membrane-bound precursor of human CSF-1. *Blood* 1990; 76:1308–14.
19. *Hogge D, Cashman J, Humphries RK, et al.* Differential and synergistic effects of human granulocyte-macrophage colony stimulating factor and human granulocyte colony-stimulating factor on hematopoiesis in human long-term marrow-cultures. *Blood* 1991;77:493–9.
20. *Cashman JD, Eaves AC, Raines EW, Ross R, Eaves CJ.* Mechanisms that regulate the cell cycle status of very primitive hematopoietic cells in long-term human marrow cultures. I. Stimulatory role of a variety of mesenchymal cell activators and inhibitory role of TGF- β . *Blood* 1990;75:96–101.
21. *Moreau J-F, Donaldson DD, Bennett F, Witek-Giannotti J, Clark SC, Wong GG.* Leukemia inhibitory factor is identical to the myeloid growth factor human interleukin for DA cells. *Nature* 1988;336:690–2.
22. *Sachs L.* The control of hematopoiesis and leukemia: From basic biology to the clinic. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:4742–9.
23. *Jackson JD, Yan Y, Ewel C, Talmadge JE.* Activity of Acetyl-N-Ser-Asp-Lys-Pro (AcSDKP) on hematopoietic progenitor cells in short-term and long-term murine bone marrow cultures. *Exp Hematol* 1996;24:475–81.
24. *Quesenberry PJ.* The hemopoietic stem cell, progenitor cells, and cytokines. U: *Beutler E, Lichtman MA, Coller BS, Kipps TJ, ur. Williams Hematology Fifth Edition.* New York: McGraw-Hill Inc, 1995:211–28.
25. *Alonso K, Medenica R, Morehead G.* Long-term culture of autologous bone marrow for marrow reconstitution following high-dose chemotherapy. Purging with tumor surface antigen directed human-human monoclonal antibody. *Prog Clin Biol Res* 1994;389:111–8.
26. *Coutinho LH, Chang J, Testa NG, Dexter TM.* Autologous bone marrow transplantation using cultured marrow cells in patients with leukemia. U: *Testa NG, Molineux G, ur. Haematopoiesis, A Practical Approach.* Oxford: Oxford University Press, 1993:219–231.
27. *Prockop DJ.* Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science* 1997; 276:71–4.
28. *McKeehan WL, Barnes D, Reid L, Stanbridge E, Murakami H, Sato GH.* Frontiers in mammalian cell culture. *In vitro Cell Dev Biol Anim* 1990;26:9–23.
29. *Genevay M-C, Mormont C, Thomas F, Berthier R.* The synthetic AcSDKP protects cells that reconstitute long-term marrow stromal cultures from the effects of mafosfamide (Asta Z 7654). *Exp Hematol* 1996;24:77–81.
30. *Stanović S, Boranić M.* Neuropeptidi, endogeni opioidni peptidi i stanična proliferacija. *Liječnički vjesnik* 1998;120:(u tisku).
31. *Stanović S.* Utjecaj enkefalina i inhibitora enkefalinaze na stanice koštane srži bolesnika s leukemijom. *Magistarski rad.* Zagreb: Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, 1997.
32. *Kukita T, Kukita A, Hata K, Kurisu K.* 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate inhibits osteoclast-like cell differentiation in rat bone marrow cultures by inducing macrophage polykaryons. *Endocrinology* 1992;130:577–84.
33. *Labbauf A, Klopman G, Rosenkranz HS.* Dichotomous relationship between DNA reactivity and the induction of sister chromatid exchanges *in vivo* and *in vitro*. *Mutat Res* 1997;377:37–52.

Summary

LONG-TERM BONE MARROW CULTURE

Long-term bone marrow culture is an experimental *in vitro* model of hematopoiesis imitating conditions *in vivo*. It contains hematopoietic elements at various stages of differentiation as well as a supportive stromal microenvironment. Primitive hematopoietic stem cells of mesenchymal origin, the long-term culture initiating cells proliferate and differentiate into different cell types, giving rise to the adherent stromal layer and to various hematopoietic elements attached to it or floating freely in the supernatant medium. The stromal layer keeps the hematopoietic cells aggregated, helps their mitosis, differentiation and maturation by cell-to-cell contact, produces hematopoietic growth factors (cytokines), and forms the extracellular matrix required for cell attachment. Hematopoiesis occurs without exogenous growth factors. The appearance and development of the stroma, the proliferation and differentiation of hematopoietic progenitor cells, and the production of cytokines differ in long-term cultures of the normal and of pathologically altered bone marrow. Long-term bone marrow culture is applied in fundamental studies of normal and pathologically altered hematopoiesis, in pharmacological research, in the purging of residual leukemia cells from bone marrow autotransplants, and in the gene transfer. It is also suitable for testing carcinogenic and toxic chemicals causing hematopoietic damage through occupational or habitual exposure.

Key words:

antineoplastic agents, cell culture, cell proliferation and differentiation, hematopoiesis, hematopoietic toxicity

Requests for reprints:

Mr. sc. Silvana Stanović, dr. med.
Zavod za molekularnu medicinu, Institut »Ruđer Bošković«,
Bijenička cesta 54, p.p. 1016, 10000 Zagreb
E-mail: stanovic@rudjer.irb.hr