

МОДЕЛЬ IN VIVO ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ТРАНСДИФФЕРЕНЦИРОВКИ СОМАТИЧЕСКИХ КЛЕТОК В УРОТЕЛИЙ

**© Б. В. Попов,¹ А. М. Зайчик,² М. Б. Будько,² Н. А. Ница,³ Е. Н. Толкунова,¹
О. В. Жидкова,¹ Н. С. Петров,¹ С. А. Кошкин,¹ Б. К. Комяков⁴**

¹ Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург,

² С.-Петербургская государственная медицинская академия последипломного образования Росздрава,

³ С.-Петербургский государственный университет

^{и 4} С.-Петербургская государственная медицинская академия им. И. М. Сеченова;
электронный адрес: popov_478@hotmail.com

Разработка восстановительного лечения органов мочевыделительной системы, основанного на использовании плюрипотентных и соматических стволовых клеток, например мезенхимных стволовых клеток (МСК), в настоящее время находится на этапе экспериментального анализа. Такой анализ включает в себя изучение механизмов регуляции основных функций МСК и уротелия, выстилающего изнутри органы мочевыделительной системы. В регуляции пролиферации и дифференцировки клеток уротелия важная роль принадлежит сигнальным путям EGF и Wnt—β-катенин, активность которых может быть оценена по уровню продукции белков Нег-4 и Tcf3,4 соответственно. Мы установили, что МСК, меченные трансгенным зеленым флуоресцирующим белком (GFP), не экспрессировали в культуре *in vitro* Нег-4 и Tcf3,4, но активировали их продукцию после трансплантации в мочевой пузырь, подвергнутый криотравме. После переноса МСК в ткань мочевого пузыря GFP обнаруживался в ней с помощью ОТ-ПЦР, а колокализация Нег-4 или Tcf3,4 с GFP в некоторых клетках уротелия выявлялась при двойной иммуногистохимической окраске ткани специфическими антителами, связанными с флуоресцентной меткой. Полученные результаты свидетельствуют о том, что меченные GFP МСК могут быть использованы для изучения трансдифференцировки соматических клеток в уротелий.

Ключевые слова: мезенхимные стволовые клетки, трансдифференцировка, мочевой пузырь, сигнальные пути EGF и Wnt—β-катенин, белки Нег-4 и Tcf3,4.

Принятые сокращения: МСК — мезенхимные стволовые клетки, BrdU — бромодезоксиуридин, СК — стволовые клетки, GFP — зеленый флуоресцирующий белок, EGF — эпидермальный фактор роста, LRC — клетки, сохраняющие метку, ОТ-ПЦР — метод обратной транскрипции полимеразной цепной реакции, Wnt—β-катенин — сигнальный путь Wnt—β-катенин.

Основную функциональную роль в органах мочевыделительной системы играет уротелий, выстилающий поверхность мочевыводящих путей изнутри. Уротелий формирует функциональный барьер,держивающий воду и препятствующий проникновению внутрь организма токсичных продуктов азотистого обмена, содержащих мочевину и аммиак (Staack et al., 2005). Уротелий представляет собой частую мишень злокачественной трансформации: карцинома мочевого пузыря является пятым по частоте заболеванием раком в индустриальных странах, образуя 5 % общего числа раковых больных, количество которых в современном мире постоянно возрастает параллельно увеличению продолжительности жизни населения (Schulz, 2006). В соответствии с ростом заболеваемости увеличивается и потребность в тканеспецифических донорских клетках для восстановительной терапии, которая может быть основана на использовании плюрипотентных или соматических стволовых клеток (СК), обладающих способностью к самообновлению и дифференцировке в уротелий (Anumanthan et al., 2008; Thomas et al., 2008).

Возможность терапевтического применения СК в настоящее время находится на этапе экспериментального анализа, который включает в себя: изучение механизма самовоспроизведения клеток уротелия (Kurzrock et al., 2008); оценку роли различных сигнальных систем в процессе самовоспроизводящих делений клеток уротелия в норме и при различных заболеваниях (Varley et al., 2004; Schulz, 2006); изучение механизмов функционирования различных клеточных популяций в тканях мочевыводящей системы после пластики аутологичными тканями, например тканью кишечника (Atala, 2009); анализ возможностей использования эмбриональных и соматических СК для замещения поврежденного уротелия (Oottamasathien et al., 2007; Kinebuchi et al., 2008; Shukla et al., 2008).

Уротелий представляет собой переходный эпителий, размеры и форма клеток которого изменяются в зависимости от наполнения мочевого пузыря. В уротелии выделяют три основных слоя: базальный, контактирующий с базальной мембраной, промежуточный и апикальный, составленный из дифференцированных зонтикообразных клеток, физически контактирующих с мочой. Клетки ба-

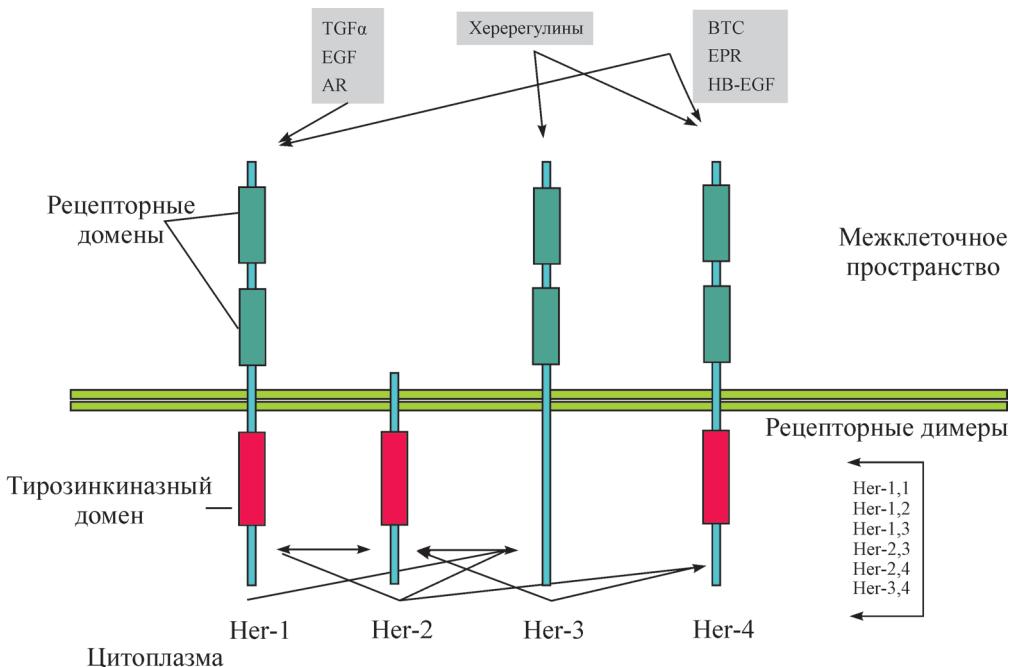


Рис. 1. Схема взаимодействия лигандов семейства EGF со специфическими рецепторными димерами.
Объяснения в тексте.

зального слоя являются по форме кубоидальными, в промежуточном слое они увеличиваются и округляются, а на апикальной (проточной) поверхности уплощаются (Staack et al., 2005).

Клетки, контактирующие с базальной мембраной, характеризуются присутствием кератинов 5 и 14 и белка p63. Клетки промежуточного и люминального слоев экспрессируют кератины 7, 8, 18 и 19. Уникальной чертой зонтикообразных клеток является асимметричная плазматическая мембрана, включающая в себя бляшки, содержащие тканеспецифические белки — уроплакины, придающие уротелию способность контролировать проницаемость (Wu et al., 1994). При мечении бромодезоксиридином (BrdU) *in vivo* он инкорпорируется в большинстве ядер эпителиальных клеток, но через 1 год только 9 % базальных клеток сохраняют метку. Такие клетки экспрессируют цитокератин 14, β 4-интегрин, белки Bcl2 и p63, но уровень продукции этих белков не отличается значительно от такового в соседних клетках базального слоя (Kurzrock et al., 2008).

Уротелий отличается от других типов эпителия млекопитающих чрезвычайно низкой скоростью пролиферации, клетки уротелия делятся 1–2 раза в год (Cooper, 1972). В ходе развития и в ответ на повреждение уротелий проявляет активную способность к делению, и пролиферирующие клетки обнаруживаются во всех эпителиальных слоях, включая поверхностный слой дифференцированных зонтикообразных клеток. Хотя факт быстрой активации и интенсивной пролиферации уротелия хорошо известен, механизмы его регуляции до настоящего времени недостаточно изучены. Опубликованные данные свидетельствуют о том, что рецепторы и лиганды семейства эпидермального фактора роста (EGF) являются важными медиаторами деления клеток уротелия (Varley et al., 2005). Такие члены семейства, как опухоловый ростовой фактор α (TGFα), связывающий гепарин эпидермальный ростовой фактор (HB-EGF) и амфирегулин (AR), экс-

прессируются клетками уротелия *in vitro*, а продукция TGFα активируется после повреждения уротелия *in vivo*. Семейство рецепторов EGF включает в себя четыре различных белка — EGFR (Her-1), ErbB2 (Her-2), ErbB3 (Her-3) и ErbB4 (Her-4), которые образуют рецепторные комплексы путем формирования гомо- или гетеродимеров. TGFα и AR связываются только димерами EGFR (Her-1), тогда как HB-EGF, бетацеллюлин (BTC) и эпирегулин (EPR) связывают димеры, содержащие Her-1 и Her-4. Напротив, херерегулины (нейрорегулины, или нейрональные дифференцировочные факторы) не связывают Her-1, но являются лигандами для димеров, образованных Her-3 и Her-4. Рецептор Her-2 не связывает лиганд физически, но усиливает и стабилизирует димеризацию рецепторов, что сопровождается усилением сигнального потенциала (рис. 1). Амплификация и сверхэкспрессия Her-2 найдены в клетках карциномы молочной железы, легких, желудка и шейки матки. Her-3 не обладает собственной тирозинкиназной активностью и подобно Her-2 может связывать лиганд в форме гетеродимера, который активирует нижележащие сигнальные пути (Varley et al., 2005).

Her-1 и Her-2 определяются в изолированных клетках мочевого пузыря, в которых продукция Her-1 увеличивается в 2–5 раз, а количество Her-2 уменьшается в 3 раза при культивировании *in vitro*. Her-3 определяется на низком уровне в свежезолированных клетках мочевого пузыря, но отсутствует в пролиферирующих клетках *in vitro*. Her-4 экспрессируется на высоком уровне в клетках нормального и трансформированного уротелия при возникновении злокачественных опухолей мочевого пузыря (Rötterud et al., 2005). Последний факт свидетельствует о том, что экспрессия Her-4 является меткой активной функции самоподдержания, характерной как для опухоловых, так и для стволовых клеток (Nusse et al., 2008), поэтому этот белок, вероятно, может быть использован в качестве маркера стволовых клеток уротелия.

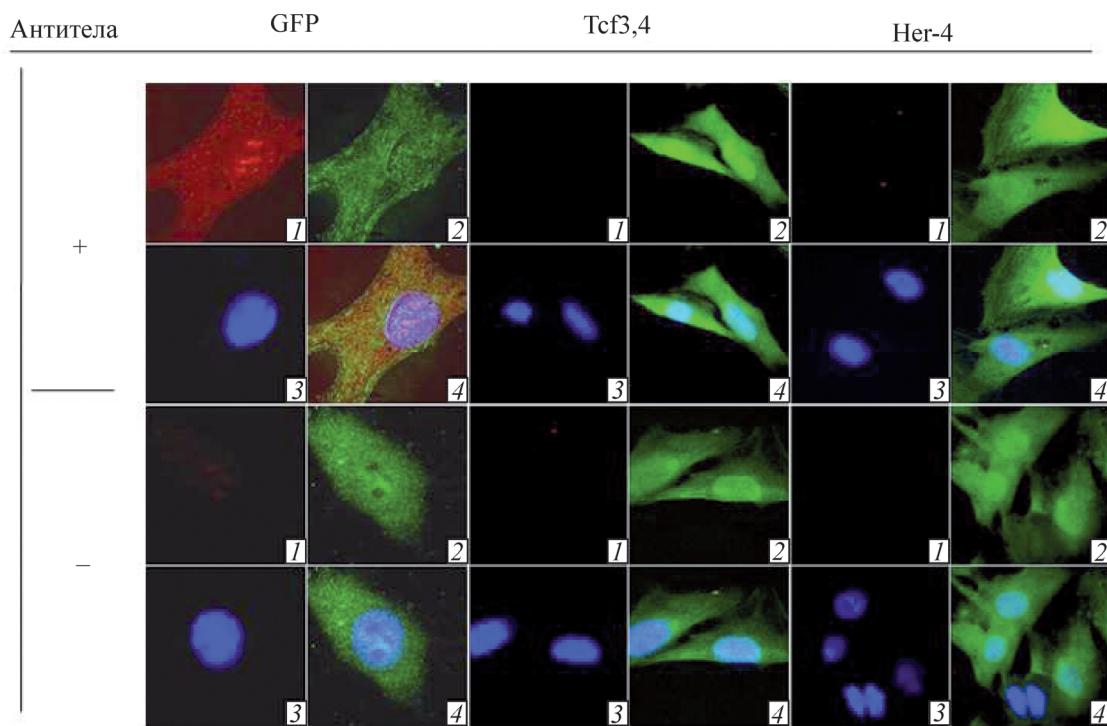


Рис. 2. Экспрессия GFP, Tcf3,4 и Her-4 в МСК трансгенных мышей GFP в культуре *in vitro*. Иммунофлуоресценция. 1 — специфические антитела, 2 — естественная флуоресценция, 3 — окраска DAPI, 4 — совмещение всех изображений. Здесь и на рис. 3, 4: изображения получены на электронном сканирующем микроскопе Pascal, лазеры с длинами волн 488 и 633 нм. Об. 100×.

Эффекторные механизмы регуляции клеточных функций белками семейства EGF основаны на участии MAP- и PI3-киназных сигнальных путей. Киназа ERK MAP-киназного пути активно фосфорилируется уже через 1 ч после добавления в культуру клеток уротелия EGF, а торможение активности другой киназы этого пути — Mek или PI3K — тормозит пролиферацию и миграцию клеток уротелия (Varley et al., 2005).

Роль сигнального пути Wnt- β -катенин в регуляции пролиферации и дифференцировки уротелия в нормальных условиях недостаточно хорошо изучена. Однако широко известные и хорошо документированные данные о роли этого сигнального пути в регуляции функций соматических стволовых клеток различной тканевой специфичности и возникновении опухолевых стволовых клеток (Nusse et al., 2008) позволяют предположить, что активность отдельных сигналов Wnt- β -катенин необходима для самоподдержания СК уротелия, а гиперактивация сигнального пути в целом может способствовать появлению опухолей. Действительно, текущие публикации показывают, что активация сигнального пути Wnt- β -катенин, проявляющаяся в накоплении цитоплазматического и ядерного β -катенина, ведет к возникновению карцином мочевого пузыря (Kastritis et al., 2009). Передача сигналов Wnt- β -катенин и накопление β -катенина сопряжены с повышением активности его мишней — транскрипционных факторов семейства LEF/TCF, а инактивация белков этого семейства, например Tcf4, сопровождается истощением популяции стволовых и пролиферирующих клеток в тонком кишечнике (Van der Flier et al., 2007).

Терапевтический потенциал МСК основан на их способности дифференцироваться в клетки всех трех зародышевых ростков, включая энтодерму, которая является источником происхождения большинства эпителиальных тканей внутренних органов, например кишечника и моче-

вого пузыря (Friedenstein, 1976; Prockop, 1997; Pittenger et al., 1999; Bajada et al., 2008).

Цель настоящей работы заключалась в разработке экспериментальной модели на мышах, позволяющей изучать *in vivo* трансдифференцировку соматических стволовых клеток в уротелий мочевого пузыря. Для решения этой задачи МСК, продуцирующие трансгенный GFP, трансплантировали в мочевой пузырь сингенных мышей линии C57BL после его криотравмы, которая, по данным литературы, способствует трансдифференцировке МСК в клетки мочевого пузыря (De Coppy et al., 2007). Результаты нашей работы показали, что МСК могут быть использованы для изучения трансдифференцировки соматических клеток в уротелий.

Материал и методика

Культивирование клеток *in vitro*. Мезенхимные стволовые клетки (МСК) были получены нами ранее из костного мозга трансгенных мышей-самцов C57BL/6-Tg(ACTbEGF)1Osb/J (мыши GFP), повсеместно экспрессирующих GFP (Popov et al., 2007). МСК были охарактеризованы в процессе длительного пассирования на способность к дифференцировке *in vitro* в различные клетки мезодермального происхождения: на клоногенную, пролиферативную, адгезивную и туморогенную активность (Попов и др., 2009). В настоящей работе мы использовали МСК 12–25-го пассажей, которые экспрессировали GFP, характеризовались нормальной дифференционной, адгезивной и клоногенной активностью и не вызывали роста опухолей при переносе нормальным сингенным мышам линии C57BL. Клетки выращивали в ростовой среде Дульбекко (DMEM/F12), содержащей 25 mM Непес и 10 % эмбриональной бычьей сыворотки.

Оценка трансдифференцировки МСК в клетки уротелия в опытах *in vivo*. Перед введением мышам-реципиентам МСК на культуральных чашках дважды отмывали PBS, отделяли от пластиковой поверхности раствором трипсина, осаждали центрифугированием в течение 5 мин при 1000 об/мин и ресус펜сировали в концентрации $5 \cdot 10^6$ /мл в ростовой среде, содержащей 50 ед./мл гепарина, без сыворотки. Для трансдифференцировки МСК в клетки уротелия *in vivo* клетки вводили в стенку мочевого пузыря мыши линии C57BL в условиях описанных ниже. Мышей оперировали под внутрибрюшинным тиопенталовым наркозом (10 мг/кг) в положении на спине с фиксацией конечностей лейкопластырной лентой. После обработки операционного поля дезинфицирующим раствором производили нижнесрединную лапаротомию послойно. Операцию проводили под контролем операционного микроскопа Opton-Vario (Zeiss, Германия). Края брюшной стенки фиксировали микрохирургическим ретрактором, после чего в операционное поле выводили мочевой пузырь. Ориентируясь на срединную артерию мочевого пузыря, по обе стороны от нее производили пять близко расположенных уколов стенки для нанесения криотравмы.

Криотравму на всю толщину стенки мочевого пузыря вызывали с помощью укола иглой G21, охлажденной до температуры жидкого азота. Через 10 мин после нанесения криотравмы в стенку мочевого пузыря в месте повреждения вводили супензию МСК с помощью шприца с иглой G30. Место криотравмы в стенке метили одиночными узловыми швами Prolene 10/0 (Ethicon Inc., Великобритания). Мочевой пузырь возвращали в брюшную полость, после чего промывали полость 0.2 мл раствора натриевой соли цефазолина в разведении 0.001 г/мл. Лапаротомную рану ушивали послойно одиночными узловыми швами: мышцы — PDS 6/0 (Ethicon Inc., Великобритания), кожу — полипропиленом 4/0 (Линтекс, Россия). Кожные швы укрепляли kleевой повязкой БФ-6 (Вертекс, Россия).

В качестве контроля использовали животных, которым МСК вводили в мочевой пузырь без предварительной криотравмы или после сублетального облучения. МСК вводили мышам внутривенно в ретроорбитальный синус через 1 сут после облучения. В опытах использовали 8—12-недельных мышей-самок линии C57BL массой 18—22 г, полученных из питомника РАМН «Раполово» (Ленинградская обл., Россия). За 30 мин до внутривенного переноса клеток мышам вводили внутрибрюшинно 30 ед. гепарина в 0.5 мл ростовой среды. Ретроорбитально клетки вводили под ингаляционным наркозом, который вызывали у мышей с помощью этилового эфира. Мышей облучали дозой 5 Гр (мощность дозы 0.451 Гр/мин, напряжение 200 кВ, сила тока 13 мА, фильтры 0.5 мм Cu и 1.0 мм Al, фокусное расстояние 50 см), МСК вводили в 0.5 мл ростовой среды без сыворотки через 24 ч после облучения мышей.

Мочевой пузырь от трансгенных мышей GFP для гистохимического анализа был любезно предоставлен проф. В. М. Михайловым (Институт цитологии РАН). Мышей GFP (щедрый дар Детского госпиталя г. Оакленд, Калифорния, США) содержали и разводили в виварии Института цитологии РАН при обычном питании и световом режиме.

Иммунофлуоресцентное окрашивание. МСК окрашивали на GFP, Tcf3,4 и Нег-4 по следующему протоколу. Покровные стекла с клетками, распластанными при росте в культуре, переносили в 35-миллиметровые

культуральные чашки, клетки однократно отмывали PBS в течение 5 мин, фиксировали 4%-ным параформальдегидом 15 мин, затем 70%-ным этиловым спиртом в течение ночи при 4 °C; обрабатывали 0.2%-ным Тритоном X-100 10 мин, промывали PBS 2 раза по 5 мин, сайты неспецифического связывания антител блокировали в течение 1 ч раствором, содержащим 3 % бычьего сывороточного альбумина (БСА) и 0.1 % Твина 20; затем на клетки наносили специфические антитела в разведении 1 : 50—1 : 200 в блокирующем растворе на 1 ч при комнатной температуре, промывали 3 раза по 5 мин PBS, обрабатывали 1 ч при комнатной температуре видоспецифическими антителами, распознающими аллотипы иммуноглобулинов специфических антител, конъюгированными с флуоресцентной меткой, отмывали 3 раза по 5 мин PBS. Ядра клеток окрашивали 30 мин при комнатной температуре красителем DAPI в концентрации 1 нг/мл в блокирующем растворе, затем препараты промывали 2 раза PBS и заключали в среду Anti-Fade, уменьшающую неспецифическую флуоресценцию.

Гистохимическая окраска замороженных и фиксированных в параформальдегиде тканей. Для приготовления замороженных срезов ткань мочевого пузыря хранили в жидким азоте, а перед обработкой на криотоме заливали специальной средой Tissue-Tek (Sakura, Finetek, США). Срезы на предметном стекле подсушивали на воздухе, фиксировали смесью этанола с ацетоном (1:1) 3 мин при -20 °C и окрашивали, как это описано выше для иммунофлуоресценции. Для приготовления срезов из фиксированных тканей их помещали в 4%-ный формальдегид на 24 ч. Перед заливкой в парафин фиксированный материал обезвоживали, используя несколько порций этилового спирта восходящей концентрации (50—96 %). Из обезвоженного материала удаляли спирт при помощи хлороформа, затем препараты проводили в течение 12 ч при 37 °C через смесь хлороформа с парафином (1 : 1) и через 3 порции расплавленного парафина по 60 мин в каждой при 56—58 °C. Готовили парафиновые блоки, которые наклеивали на деревянные бруски, на микротоме готовили срезы толщиной 5—7 мкм, которые наносили на предметные стекла, обработанные 2%-ным аминопропилтриэтоксисиланом. Парафиновые срезы через 30 мин инкубации в термостате обрабатывали ксилолом 2 раза по 3 мин при 65 °C и проводили их депарафинизацию спиртами нисходящей концентрации по 3 мин в каждом. Через 5 мин инкубации срезов в 3%-ной перекиси водорода производили их протравливание в 0.1 М цитратном буфере, pH 6.0, в течение 10 мин в микроволновой печи при 650 Вт. После 20-минутного охлаждения срезы помещали в 0.05 М Трис-Cl, pH 7.5, на 10 мин; сайты неспецифического связывания антител блокировали 30 мин при 37 °C в 1.5%-ном растворе БСА в PBS, содержащем 0.01 % Твина 20; срезы промывали в PBS и обрабатывали антителами, как описано выше для иммунофлуоресценции.

Электрофорез и иммуноблотинг. Электрофорез белков проводили в 8%-ном полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия. Для приготовления проб клетки, растущие в культуральных чашках, промывали дважды PBS, удаляли с чашек пластиковым скребком, осаждали центрифугированием и лизировали в течение 30 мин на льду в 3 объемах буферного раствора (относительно объема плотного осадка клеток), содержащего 25 mM Трис-Cl (pH 7.4), 250 mM NaCl, 0.25%-ный детергент NP-40, 1 mM PMSF и коктейль ингибиторов протеолиза

1 : 100. Экстракты ткани мочевого пузыря мышей линии C57BL готовили путем ее измельчения ножницами с последующей обработкой кусочков тканей в гомогенизаторе с PBS и лизированием полученной суспензии, как описано выше. Экстракты клеток центрифугировали 15 мин при 13 000 g и 4 °C. Пробы уравнивали по количеству общего белка, определяемого с помощью реактива Брэдфорд, переносили в микропробирки, содержащие равный объем буфера для нанесения проб на гель (4 % додецилсульфата натрия, 20 % глицерина, 200 mM дитиотреита, 120 mM Трис-HCl, pH 6.8, 0.002 % бромфенолового синего), кипятили 5 мин на водяной бане и наносили в объеме 25 мкл, содержащем 30 мкг общего белка, на одну дорожку полиакриламидного геля. Электрофоретически разделенные белки переносили с геля на мембрану PVDF с помощью полусухого электротрансферного переноса. Белки на мембране выявляли специфическими антителами и визуализировали реактивом ECL.

Для проведения ОТ-ПЦР общую РНК выделяли из печени, легких, кишечника, почек и мочевого пузыря подопытных и контрольных мышей линии C57BL, которым МСК вводили *in situ* после криотравмы или без нее соответственно, а также из мочевого пузыря мышей GFP. РНК выделяли с применением набора реактивов RNEasy Mini Kit (Qiagen, США), ее концентрацию измеряли спектрофотометрически и использовали 0.5—1.0 мкг РНК для ОТ-ПЦР. Обратную транскрипцию и специфическую амплификацию гена *Gfp* проводили с использованием буфера и ферментативной смеси из набора Qiagen OneStep для ОТ-ПЦР, который позволяет проводить обе реакции и содержит ДНК-полимеразу HotStar Taq и смесь обратных транскриптаз Omniscript и Sensiscript. Для ПЦР использовали праймеры 5'-GCAAGCTGACCCCTGAAGT-TCATC-3' и 5'-TCACCTTGATGCCGTTCTTCTG-3', которые давали возможность амплифицировать фрагмент гена *GFP* размером 372 п. о. ПЦР проводили на термоциклире с использованием следующей программы: обратная транскрипция (30 мин, 50 °C); активация ДНК полимеразы HotStar Taq, в ходе которой обратные транскриптазы инактивировались, а к ДНК-матрица денатурировалась (15 мин при 95 °C); 30 циклов денатурации ДНК (94 °C, 30 с); отжиг (56 °C, 30 с); синтез (72 °C, 1 мин) и конечная стадия синтеза (72 °C, 10 мин). Продукты реакции анализировали путем электрофореза в 1.2%-ном агарозном геле.

Использовали следующие антитела: мышиные моноклональные антитела против Tcf3,4 (Abcam, Великобритания); мышиные моноклональные антитела против β-актина (Sigma, США); кроличьи поликлональные антитела против GFP (Sigma, США и Abcam, Великобритания); мышиные моноклональные антитела против Нег-4 (Abcam, Великобритания); кроличьи поликлональные антитела против β-катенина (Abcam, Великобритания и Sigma, США); видоспецифичные антитела Alexa Fluor® 568, Fab-фрагмент кроличьих антимышинных антител (Invitrogen, США); Alexa Fluor® 633 Fab-фрагмент козлиных иммуноглобулинов против легких и тяжелых цепей иммуноглобулинов кролика (Invitrogen, США); Fab-фрагмент козлиных и кроличьих иммуноглобулинов, конъюгированных с пероксидазой хрена, против легких и тяжелых цепей иммуноглобулинов кролика или мыши (Jackson Immunolabs, США).

Использовали следующие реактивы: Anti-Fade, PVDF, полиакриламид для электрофореза, реактив Брэдфорд (BioRad, США); бычий сывороточный альбумин, додецилсульфат натрия, коктейль ингибиторов протеоли-

за, NP-40, DAPI, PMSF, параформальдегид, Тритон X-100, Трис (Sigma, США); трипсин, содержащий 1 mM ЭДТА, среду DMEM/F12, эмбриональную бычью сыворотку (Invitrogen, США); набор реактивов для выделения РНК (RNEasy Mini Kit, набор реактивов Qiagen OneStep для ОТ-ПЦР; Qiagen, США); ECL (Millipore, США); культуральные пластиковые чашки (Sarstedt, Германия); Твин 20 (Bio Chemica, Германия); этиловый эфир (Вектон, Россия); KCl, метиловый спирт, уксусная кислота (Реахим, Россия); гепарин (Белмедпрепараты, Белоруссия); нефлуоресцирующее иммерсионное масло (Carl Zeiss, Швейцария); краситель Гимза, таблетки для приготовления буфера PBS (BDH, Великобритания); атравматические иглы с нитью Prolene 10/0; хирургическая шовная нить Pds 6/0 (Ethicon Inc., Великобритания); полипропиленовая хирургическая нить 4/0 (Линтекс, Россия); клей БФ-6 (ЗАО «Вертекс», Россия); тиопентал натрия, цефазолин (ОАО «Синтез», Россия).

Результаты

Оценка экспрессии маркерных белков в МСК. Полученные нами из костного мозга трансгенных мышей GFP МСК на 12—25-м пассаже в культуре *in vitro* экспрессировали GFP, который выявляли путем иммуноблотинга, по естественной зеленой флуоресценции и флуоресценции, вызванной с помощью специфических антител и вторых антител, маркированных красным флуоресцентным красителем (рис. 2, *a*, *b*) (Попов и др., 2009). В параллельных опытах, используя те же методы иммунофлуоресценции, мы не обнаружили в МСК ни Tcf3,4, ни Нег-4 (рис. 2, *a*). Наличие в МСК маркерного белка GFP и отсутствие Нег-4 и Tcf3,4 делало эти клетки удобными для использования в качестве мишени для наблюдения за их дифференцировкой в клетки уротелия. Клетки уротелия нормальных мышей не продуцируют GFP, но, по данным литературы, синтезируют Нег-4 и потенциально могут являться продуcentами Tcf3,4.

Разработка экспериментальной модели на мышах для оценки трансдифференцировки соматических клеток в уротелий. Наши первоначальные опыты по индукции трансдифференцировки МСК в уротелий включали в себя их инъекцию в неповрежденный мочевой пузырь с последующей гистохимической оценкой экспрессии GFP через 2 и 4 нед после трансплантирования. В этих опытах мы не обнаружили GFP в мочевом пузыре мышей-реципиентов (результаты не показаны). Изменение методического подхода с предварительным сублетальным облучением животных и введением им через 1 сут МСК в неповрежденный мочевой пузырь также не сопровождалось включением МСК в гистогенез ткани мочевого пузыря. В последующих экспериментах мы вводили МСК в мочевой пузырь, предварительно подвергнутый криотравме, руководствуясь методом, описанным к тому времени в текущей литературе (De Coppy et al., 2007). Учитывая, что результаты опубликованной статьи показывали включение МСК преимущественно в клетки серозной оболочки и мышечного слоя мочевого пузыря, мы модифицировали условия криотравмы. Повреждение стенки мочевого пузыря в указанной работе (De Coppy et al., 2007) производилось металлической палочкой с тупым концом.

Такой подход, по нашему предположению, мог обеспечивать повреждение серозной оболочки, физически

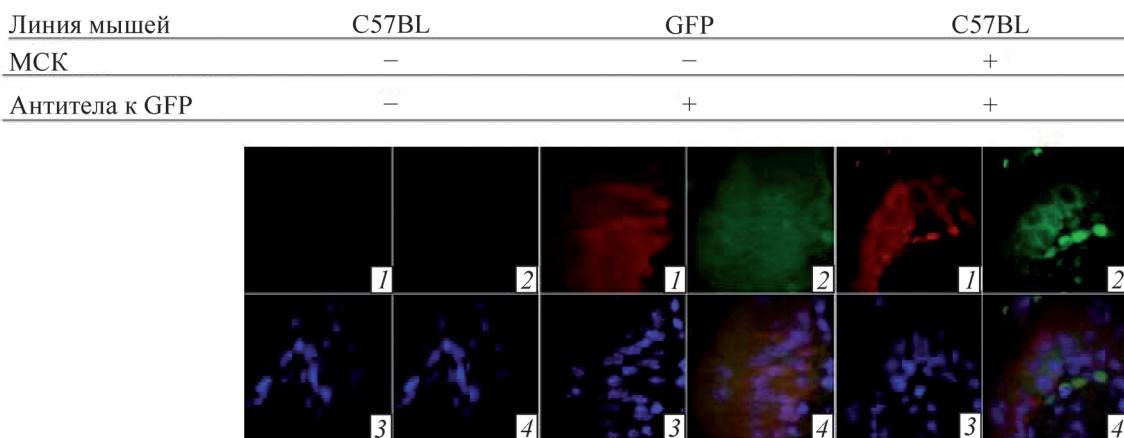


Рис. 3. Экспрессия GFP в эпителии мочевого пузыря мышей линии C57BL после трансплантации им МСК. Иммунофлуоресценция.

Обозначения те же, что и на рис. 2.

контактирующей с палочкой, тогда как клетки уротелия, находящиеся вне зоны физического контакта, могли не повреждаться. Поэтому мы вызывали повреждение мочевого пузыря иглой G21, охлажденной до температуры жидкого азота, прокалывая все слои стенки мочевого пузыря, включая уротелий. Используя описанные условия, мы обнаружили путем гистохимического анализа через 2 и 4 нед после введения МСК в мочевом пузыре мышей-реципиентов белок GFP, который выявлялся в клетках уротелия по естественной зеленой флуоресценции и с помощью специфических антител (рис. 3). GFP также выявлялся в ткани мочевого пузыря с помощью ОТ-ПЦР, хотя уровень его экспрессии был значительно ниже, чем в ткани мочевого пузыря трансгенных мышей GFP (результаты не показаны).

Оценка тканеспецифических изменений в МСК, трансплантированных в мочевой пузырь сингенных мышей. С помощью иммуноблотинга мы нашли, что в ткани мочевого пузыря мышей линии C57BL не экспрессируют GFP и β -катенин, но экспрессируются транскрипционные факторы Tcf 3,4, которые выявляются при электрофорезе в форме двух полос с мол. массами 50 и 60 кДа. Напротив, МСК от трансгенных мышей GFP в культуре *in vitro* продуцировали GFP и β -катенин, но не продуцировали транскрипционные факторы Tcf3,4 (рис. 4, а).

Иммунофлуоресцентный анализ подтвердил, что факторы Tcf3,4 экспрессировались в эпителии мочевого пузыря и локализовались преимущественно в цитоплазме (рис. 3, б). Нег-4 локализовался преимущественно в цитоплазматической мемbrane, хотя часть материала равномерно распределялась в области ядра (рис. 4, б). При использовании двойного флуоресцентного окрашивания антителами к Tcf3,4 или Нег-4 с красным флуорохромом и антителами к GFP с зеленым флуорохромом мы обнаружили в уротелии единичные группы клетки, окрашенные обоими красителями (рис. 4, б).

Обсуждение

Терапия СК может быть эффективной при условии молекулярной и клеточной комплементарности восстанавливаемой ткани, например уротелия и СК, которые обеспечивают регенерацию ткани реципиента и могут

быть использованы как молекулярные мишени для фармакологического управления процессами восстановительной терапии.

МСК определяются как недифференцированные клетки, происходящие из различных тканей зрелого организма, обладающие большим пролиферативным и дифференцировочным потенциалом (Kuhn, Tuan, 2010). В опытах *in vitro* и *in vivo* показано, что МСК эффективно дифференцируются в клетки мезодермального и эктодермального происхождения (Prockop, 1997; Pittenger et al., 1999). Энтодермальная дифференцировка МСК происходит со значительно меньшей эффективностью и только в определенных условиях, которые возникают при травматическом повреждении ткани реципиента (Ortiz et al., 2003). Вероятно, в условиях повреждения клетки реципиента выделяют факторы, облегчающие дифференцировку МСК в тканеспецифическом направлении. Биохимическая природа таких факторов остается неизученной.

Текущие публикации показывают, что для ткани мочевого пузыря адекватным травматическим воздействием, способствующим трансдифференцировке трансплантированных МСК в уротелий, является криотравма (De Coppi et al., 2007). В ответ на криотравму происходят быстрая активация деления клеток уротелия, находящихся в нормальных условиях в состоянии покоя, и восполнение поврежденной ткани. Способность к быстрому изменению пролиферативного состояния уротелия в ответ на повреждение, индукция уротелиального фенотипа в мезенхимных клетках костного мозга, вызванная тканеспецифическими сигналами, а также способность уротелия к доброкачественной или злокачественной метаплазии под действием внешних условий свидетельствуют о том, что ткань мочевого пузыря представляет собой систему с динамичной пластичностью, способную продуцировать и воспринимать трансдифференционные сигналы (Stack et al., 2005).

В настоящей работе мы пытались разработать модельную систему, описывающую условия трансдифференцировки МСК в клетки уротелия у мышей. Использование такой модели могло предоставить в дальнейшем возможность для экспериментального анализа эффективности трансдифференцировки в уротелий клеток кишечника и других тканей, которые уже используются или представляются перспективными для использования в ка-

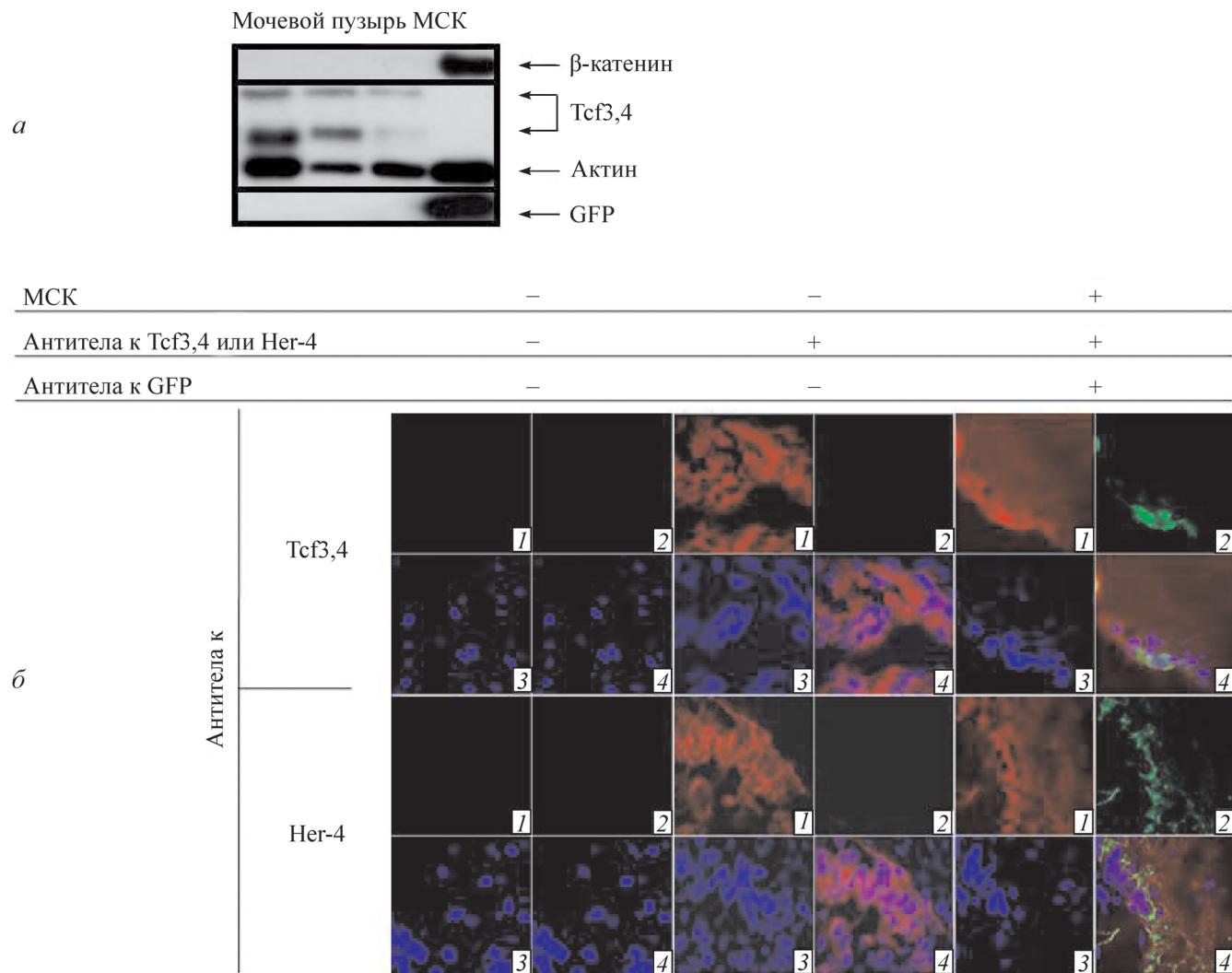


Рис. 4. Экспрессия GFP, Tcf3,4 и Her-4 в мочевом пузыре мышей линии C57BL после трансплантации им МСК, продуцирующих GFP.

a — сравнительная характеристика по иммуноблоту продукции GFP, Tcf3,4 и β-катенина в ткани мочевого пузыря нормальных мышей линии C57BL и МСК, полученных от трансгенных мышей GFP. *б* — оценка экспрессии GFP, Tcf3,4 или Her-4 в мочевом пузыре мышей-реципиентов МСК путем двойного иммунохистохимического окрашивания. Обозначения те же, что и на рис. 2.

честве донорских клеток при аутопластике мочевого пузыря в медицинских клиниках (Комяков и др., 2007).

Известно, что в регуляции пролиферации клеток уретеля важную роль играют лиганды и рецепторы семейства EGF, в частности receptor Her-4, который активно экспрессируется в нормальных и трансформированных клетках уретелия (Røtterud et al., 2005). Сигнальный путь Wnt–β-катенин активируется в случае злокачественной трансформации клеток уретелия и, вероятно, играет важную роль в регуляции функций тканеспецифических СК мочевого пузыря, которые до настоящего времени не идентифицированы.

Мы обнаружили, что в культуре *in vitro* МСК, маркированные трансгенным GFP, не продуцируют Her-4 и Tcf3,4 (рис. 2). Трансплантация МСК в мочевой пузырь, подвергнутый криотравме, вызывала в ней продукцию GFP, которая выявлялась с помощью ОТ-ПЦР (результаты не показаны). GFP определяли в уретелии и с помощью микроскопии, используя естественную зеленую флуоресценцию белка и иммунофлуоресценцию, вызываемую специфическими антителами к GFP (рис. 3). Крио-

травма способствует образованию тканеспецифических факторов, облегчающих дифференцировку МСК в уретелий, а в условиях ее отсутствия в контрольных опытах введение МСК не приводило к экспрессии GFP (результаты не показаны). Использование в наших опытах двойной флуоресцентной метки при окраске ткани мочевого пузыря антителами к GFP и Her-4 и Tcf3,4 показало, что GFP экспрессируется в некоторых клетках эпителия одновременно с Her-4 и Tcf3,4 (рис. 4, б). Клетки с двойной флуоресцентной меткой располагались кластерами, что, вероятно, свидетельствует об их происхождении из одного предшественника при его активной пролиферации. Однако количество эпителиальных клеток, несущих двойную метку, было незначительным и не превышало 1–2 % всех клеток эпителия. Эти данные соответствуют результатам наших опытов с выявлением GFP путем ОТ-ПЦР, в которых уровень GFP в ткани мочевого пузыря опытных животных был значительно ниже такового у мышей GFP (результаты не показаны).

Результаты наших опытов показали, что в клетках мочевого пузыря мышей C57BL в нормальных условиях не

выявляется β -катенин, но обнаруживаются транскрипционные факторы Tcf3,4 (рис. 4, а). Известно, что в отсутствие сигналов Wnt и при низком уровне ядерного β -каталина клетки некоторых тканей, например эпителия кожи, продуцируют Tcf3, который ингибирует дифференцировку СК волосяного фолликула. В случае гиперэкспрессии Tcf3 также происходит ингибирование дифференцировки всех трех эпителиальных линий, происходящих из СК волосяного фолликула (Nguyen et al., 2006). Возможно, что функциональная роль экспрессии Tcf3 в мочевом пузыре в условиях отсутствия сигналов Wnt— β -катенин подобна таковой в эпидермисе. Это предположение соответствует широко известным данным о том, что клетки мочевого пузыря *in vivo* находятся в состоянии покоя (Cooper, 1972; Varley et al., 2004, 2005).

Мы предполагаем, что Tcf3 в мочевом пузыре может играть роль ингибитора дифференцировки, способствуя удержанию клеток эпителия в состоянии покоя путем ингибирования транскрипции фактора PPAR γ , который способствует дифференцировке клеток уротелия (Varley et al., 2004). Известно, что в эпидермисе PPAR γ поддерживает дифференцировку СК, а его ингибирование в стволовых клетках эпидермиса осуществляется транскрипционным фактором Tcf3 (Nguyen et al., 2006). В эпителии кожи и мочевого пузыря, функция которых заключается в поддержании водного баланса, PPAR γ играет подобную роль, способствуя дифференцировке СК в функционально зрелые клетки. В уротелии PPAR γ транскрипционно активирует продукцию уроплакинов, формирующих апикальную мембрану в зонтикообразных клетках, контактирующих с мочой (Varley et al., 2004). Подобие механизмов регуляции дифференцировки в эпителии кожи и мочевого пузыря подтверждается также участием в том и другом случаях продукта гена *Get1*, который опосредует влияние PPAR γ на терминальную дифференцировку клеток (Yu et al., 2009).

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 09-04-00595).

Список литературы

- Комяков Б. К., Новиков А. И., Фадеев В. А., Зубань О. Н., Строкова Л. А., Даршенко Р. О., Муслим М. М. 2007. Результаты ортопотической пластики мочевого пузыря желудком и подвздошной кишкой. Урология. 6 : 23—28.
- Попов Б. В., Петров Н. С., Михайлов В. М., Томилин А. Н., Алексеенко Л. Л., Гринчук Т. М., Зайчик А. М. 2009. Спонтанная трансформация и иммортализация мезенхимных стволовых клеток в культуре *in vitro*. Цитология. 51 (2) : 91—102.
- Anumathan G., Makari J. H., Honea L., Thomas J. C., Wills M. L., Bhowmick N. A., Adams M. C., Hayward S. W., Matusik R. J., Brock J. W., 3rd, Pope J. C., 4th. 2008. Directed differentiation of bone marrow derived mesenchymal stem cells into bladder urothelium. J. Urol. 180 : 1778—1783.
- Atala A. 2009. Engineering organs. Curr. Opin. Biotechnol. 20 : 575—592.
- Bajada S., Mazakova I., Richardson J. B., Ashammakhi N. 2008. Updates on stem cells and their applications in regenerative medicine. J. Tissue Eng. Regen. Med. 2 : 169—183.
- Cooper E. H. 1972. The biology of bladder cancer. Ann. R. Coll. Surg. Engl. 51 : 1—16.
- De Coppi P., Callegari A., Chiavegato A., Gasparotto L., Piccoli M., Taiani J., Pozzobon M., Boldrin L., Okabe M., Cozzi E., Atala A., Gamba P., Sartore S. 2007. Amniotic fluid and bone marrow derived mesenchymal stem cells can be converted to smooth muscle cells in the cryo-injured rat bladder and prevent compensatory hypertrophy of surviving smooth muscle cells. J. Urol. 177 : 369—376.
- Friedenstein A. J. 1976. Precursor cells of mechanocytes. Int. Rev. Cytol. 47 : 327—359.
- Kastritis E., Murray S., Kyriakou F., Horti M., Tamvakis N., Kavantzas N., Patsouris E. S., Noni A., Legaki S., Dimopoulos M. A., Bamias A. 2009. Somatic mutations of adenomatous polyposis coli gene and nuclear b-catenin accumulation have prognostic significance in invasive urothelial carcinomas: evidence for Wnt pathway implication. Int. J. Cancer. 124 : 103—108.
- Kinebuchi Y., Johkura K., Sasaki K., Imamura T., Mimura Y., Nishizawa O. 2008. Direct induction of layered tissues from mouse embryonic stem cells: potential for differentiation into urinary tract tissue. Cell Tissue Res. 331 : 605—615.
- Kuhn N. Z., Tuan R. S. 2010. Regulation of stemness and stem cell niche of mesenchymal stem cells: implications in tumorigenesis and metastasis. J. Cell. Physiol. 222 : 268—277.
- Kurzrock E. A., Lieu D. K., Degraffenreid L. A., Chan C. W., Isse-roff R. R. 2008. Label-retaining cells of the bladder: candidate urothelial stem cells. Amer. J. Physiol. Renal. Physiol. 294 : 1415—1421.
- Nguyen H., Rendl M., Fuchs E. 2006. Tcf3 governs stem cell features and represses cell fate determination in skin. Cell. 127 : 171—183.
- Nusse R., Fuerer C., Ching W., Harnish K., Logan C., Zeng A., ten Berge D., Kalani Y. 2008. Wnt signaling and stem cell control. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 73 : 59—66.
- Oottamasathien S., Wang Y., Williams K., Franco O., Wills M. L., Thomas J. C., Saba K., Sharif-Afshar A. R., Makari J. H., Bhowmick N. A., DeMarco R. T., Hipkens S., Magnusson M., Brock J. W., 3rd, Hayward S. W., Pope J. C., 4th, Matusik R. J. 2007. Directed differentiation of embryonic stem cells into bladder tissue. Develop. Biol. 304 : 556—566.
- Ortiz L. A., Gambelli F., McBride C., Gaupp D., Baddoo M., Kaminski N., Phinney D. G. 2003. Mesenchymal stem cell engraftment in lung is enhanced in response to bleomycin exposure and ameliorates its fibrotic effects. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 100 : 8407—8411.
- Pittenger M. F., Mackay A. M., Beck S. C., Jaiswal R. K., Douglas R., Mosca J. D., Moorman M. A., Simonetti D. W., Craig S., Marshak D. R. 1999. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. Science. 284 : 143—147.
- Popov B. V., Serikov V. B., Petrov N. S., Izusova T. V., Gup-ma N., Matthay A. 2007. Lung epithelial cells A549 induce epithelial differentiation in mouse mesenchymal BM stem cells by paracrine mechanism. Tissue Eng. 13 : 2441—2450.
- Prockop D. J. 1997. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. Science. 276 : 71—74.
- Røtterud R., Nesland J. M., Berner A., Fosså S. D. 2005. Expression of the epidermal growth factor receptor family in normal and malignant urothelium. B. J. U. Int. 95 : 1344—1350.
- Schulz W. A. 2006. Understanding urothelial carcinoma through cancer pathways. Int. J. Cancer. 119 : 1513—1518.
- Shukla D., Box G. N., Edwards R. A., Tyson D. R. 2008. Bone marrow stem cells for urologic tissue engineering. World J. Urol. 26 : 341—349.
- Staack A., Hayward S. W., Baskin L. S., Cunha G. R. 2005. Molecular, cellular and developmental biology of urothelium as a basis of bladder regeneration. Differentiation. 73 : 121—133.
- Thomas J. C., Oottamasathien S., Makari J. H., Honea L., Sharif-Afshar A. R., Wang Y., Adams C., Wills M. L., Bhowmick N. A., Adams M. C., Brock J. W., 3rd, Hayward S. W., Matusik R. J., Pope J. C., 4th. 2008. Temporal-spatial protein expression in bladder tissue derived from embryonic stem cells. J. Urol. 180 : 1784—1789.
- Van der Flier L. G., Sabates Bellver J., Oving I., Haeghebarth A., De Palo M., Anti M., Van Gijn M. E., Suijkerbuijk S., Van de Wetering M., Marra G., Clevers H. 2007. The intestinal Wnt/TCF signature. Gastroenterology. 132 : 628—632.
- Varley C., Hill G., Pellegrin S., Shaw N. J., Selby P. J., Trejdosiewicz L. K., Southgate J. 2005. Autocrine regulation of human urothelial cell proliferation and migration during regenerative responses *in vitro*. Exp. Cell Res. 306 : 216—229.

Varley C. L., Stahlschmidt J., Lee W. C., Holder J., Diggle C., Selby P. J., Trejdosiewicz L. K., Southgate J. 2004. Role of PPAR-gamma and EGFR signalling in the urothelial terminal differentiation programme. J. Cell Sci. 117 : 2029—2036.

Wu X. R., Lin J. H., Walz T., Häner M., Yu J., Aeby U., Sun T. T. 1994. Mammalian uroplakins. A group of highly conser-

ved urothelial differentiation-related membrane proteins. J. Biol. Chem. 269 : 13 716—13 724.

Yu Z., Mannik J., Soto A., Lin K. K., Andersen B. 2009. The epidermal differentiation-associated Grainyhead gene Get1/Grlh3 also regulates urothelial differentiation. EMBO J. 28 : 1890—1903.

Поступила 8 IV 2010

MODEL *IN VIVO* TO STUDY THE TRANSDIFFERENTIATION OF THE SOMATIC CELL INTO UROTHELIUM

B. V. Popov,¹ A. M. Zaichik,² M. B. Budko,² N. A. Nitsa,³ E. N. Tolkunova,¹ O. V. Zhidkova,¹ N. S. Petrov,¹ S. A. Koshkin,¹ B. K. Komyakov⁴

¹ Institute of Cytology RAS,

² GOUDPO SPbMAPO Roszdrava, St. Petersburg,

³ St. Petersburg State University

and ⁴ I. I. Mechnikov St. Petersburg Medical Academy;
e-mail: popov_478@hotmail.com

Development of reconstructive therapy of the urinary tract using pluripotent and somatic stem cells, for example mesenchymal stem cell (MSCs), recently goes through the stage of experimental studies. These studies include investigation of the main functions of MSCs and urothelium lining from inside the organs of the urinary tract. An important role in the regulation of proliferation and differentiation of urothelium belongs to EGF and Wnt— β -catenin signaling pathways which activity may be accessed by the level of Her-4 and Tcf3,4, accordingly. We found here that MSCs labeled by transgenic green fluorescence protein (GFP) did not produce *in vitro* Her-4 and Tcf3,4 but activated their production after transfer into cryoinjured bladder of the syngenic mouse. After MSCs transplantation, GFP was detected in the bladder by RT-PCR and was colocalized with Her-4 or Tcf3,4 in a few urothelium cells detected by immunohistochemical staining with specific antibodies. These results suggest that MSCs labeled by GFP may be used as a good model to study transdifferentiation of somatic cells into urothelium.

Key words: mesenchymal stem cells, transdifferentiation, bladder reconstructive therapy, EGF and Wnt— β -catenin signaling pathways, Her-4 and Tcf3,4.