

## КЛЕТКИ ЭПИТЕЛИЯ КИШЕЧНИКА ТРАНСДИФФЕРЕНЦИРУЮТСЯ В УРОТЕЛИЙ МОЧЕВОГО ПУЗЫРЯ В ОПЫТАХ IN VIVO

**© Б. В. Попов,<sup>1</sup> А. М. Зайчик,<sup>2</sup> М. Б. Будько,<sup>2</sup> О. В. Злобина,<sup>1</sup>  
Е. Н. Толкунова,<sup>1</sup> О. В. Жидкова,<sup>1</sup> Н. С. Петров<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург,  
и <sup>2</sup> С.-Петербургская государственная медицинская академия  
последипломного образования Росздрава;  
электронный адрес: popov\_478@hotmail.com

Для восстановительного лечения органов мочевыделительной системы с середины прошлого века используется пластика аутологичной тканью кишечника, однако клеточные основы восстановления уротелия до настоящего времени не изучены. Стволовые клетки кишечника обладают пластичностью и при аутопластике способны трансдифференцироваться в зрелые клетки мочеполовой системы. Используя разработанную ранее модель *in vivo* для оценки трансдифференцировки соматических клеток в уротелий, мы установили, что клетки эпителия кишечника, продуцирующие Gfp, трансдифференцируются в клетки уротелия мочевого пузыря сингенных мышей линии C57BL, подвергнутого криотравмам. Gfp обнаруживали в ткани мочевого пузыря реципиентов с помощью ревертированной полимеразной цепной реакции, первичной флуоресценции и иммунофлуоресценции, а колокализацию белка Нег-4 с характерным для уротелия рисунком экспрессии и Gfp выявляли в немногочисленных клетках уротелия при двойной имmunогистохимической окраске ткани мочевого пузыря специфическими антителами. Полученные результаты свидетельствуют о том, что клетки эпителия кишечника обладают способностью трансдифференцироваться в уротелий мочевого пузыря, однако уровень такой трансдифференцировки незначителен и не может обеспечить полное функциональное восстановление уротелия в случае аутопластики мочевого пузыря тканью кишечника.

**Ключевые слова:** эпителий кишечника, трансдифференцировка, уротелий мочевого пузыря, сигнальные пути EGF и Wnt/β-катенин, белки Нег-4 и Tcf3,4.

**Принятые сокращения:** МСК — мезенхимные стволовые клетки, мыши GFP — мыши линии C57BL с убиквитарной экспрессией трансгенного Gfp, OT-ПЦР — ревертированная полимеразная цепная реакция, РС — ростовая среда, СК — стволовые клетки, ССК — соматические стволовые клетки, EGF — эпидермальный ростовой фактор, Gfp — зеленый флуоресцирующий белок, Wnt/β-катенин — сигнальный путь Wnt/β-катенин.

В медицинской практике для хирургического восстановления дефектов мочевыводящих органов с середины прошлого века широко используются аутологичные ткани иной тканевой специфиности, в частности ткани желудочно-кишечного тракта (Комяков, Гулиев, 2005). Хотя клиническая эффективность такого лечения очевидна, биологические основы восстановления тканей мочевыводящих органов остаются неизученными. Пациенты с успешной аутопластикой мочевыводящих путей в течение многих лет после операции показывают нормализацию мочевыделения, что предполагает функциональное восстановление уротелия — эпителия, выстилающего изнутри органы мочевыводящей системы. Возможно, что в основе такого восстановления лежит превращение стволовых клеток (СК) кишечника в специализированные клетки уротелия.

Изменение фенотипа клеток одной ткани на иной тканеспецифический фенотип основано на пластичности соматических стволовых клеток (ССК) (Herzog et al., 2003). Пластичность является фундаментальным свойством СК,

которое широко используется в современной медицинской практике для регенеративного лечения заболеваний внутренних органов, например при трансплантации мезенхимных стволовых клеток (МСК) для лечения дегенеративных и травматических заболеваний сердца, печени, головного мозга, костной и мышечной систем (Bajada et al., 2008). Текущие публикации показывают, что эмбриональные СК и ССК костного мозга обладают способностью трансдифференцироваться в клетки уротелия (Oottamasthien et al., 2007; Anumanthan et al., 2008; Kinebuchi et al., 2008; Shukla et al., 2008; Thomas et al., 2008). Функциональное восстановление органов мочевыделения в случае хирургической аутопластики, возможно, также основано на трансдифференцировке СК кишечника в функционально активные клетки уротелия, механизм которой включает в себя изменение молекулярного профиля СК кишечника на соответствующий профиль клеток уротелия.

Кишечник относится к органам, обладающим системой клеточного самовоспроизведения, клетки кишечного эпителия полностью самообновляются за 3—5 сут (Нае-

geebah, Clevers, 2009). Структурно эпителий тонкого кишечника организован в форме ворсин и крипт. Стволовые клетки, расположенные в основании крипты, при делении образуют отдел временно амплифицирующихся клеток, которые мигрируют в ходе дифференцировки из крипты по направлению к верхушке ворсины. Временно амплифицирующиеся клетки дифференцируются в зрелые энteroциты и секреторные клетки (бокаловидные, энтероэндокринные и клетки Панета). Основными сигнальными путями, регулирующими процессы самоподдержания и дифференцировки в эпителии кишечника, являются *Wnt/β*-катенин и *Notch* (Van Es, Clevers, 2005; Barker et al., 2008). Сигнальный путь *Wnt/β*-катенин играет ключевую роль в регуляции самоподдержания СК, временно амплифицирующихся клеток, дифференцировки энteroцитов и миграции клеток по градиенту крипта—ворсина. Распознавание рецепторами клеточной поверхности лигандов *Wnt* сопровождается накоплением в цитоплазме *β*-катенина и перемещением его в ядро. В ядре *β*-катенин взаимодействует с транскрипционными факторами семейства LEF/TCF и активирует гены, промоторы которых содержат специфические сайты связывания, например гены *c-Myc* и *циклин D1* (Van der Flier et al., 2007). Эмбриональный нокаут гена *Tcf4* у мышей сопровождается опустошением тех зон в криптах кишечника, в которых расположены активно делящиеся СК и временно амплифицирующиеся клетки (Korinek et al., 1998). Таким образом, продукт гена *Tcf4* может служить маркером активно пролиферирующих клеток кишечника.

Уротелий, выстилающий поверхность мочевыводящих путей изнутри, формирует функциональный барьер, удерживающий воду и препятствующий проникновению внутрь организма токсичных продуктов азотистого обмена, содержащих мочевину и аммиак (Staack et al., 2005). 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 (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, а цитокератин 20 обнаруживают только во внешнем люминальном слое уротелия (Southgate et al., 1999). 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 бромодезоксиуридином *in vivo* он инкорпорируется в большинство ядер эпителиальных клеток менее чем за 1 мес от начала введения, но через 1 год только 9 % базальных клеток сохраняют метку. Такие клетки экспрессируют цитокератин 14,  $\beta$ -4-интегрин, белки *Bcl2* и *p63*, но уровень продукции этих белков значительно не отличается от такового в соседних клетках базального слоя (Kurzrock et al., 2008).

Уротелий отличается от других типов эпителия млекопитающих 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 поверхностные дифференцированные зонтикообразные клетки. Данные литературы свидетельствуют о том, что рецепторы и лиганды семейства эпидермального фактора роста (*EGF*) являются важными медиаторами деления клеток уротелия (Varley et al., 2005). Семейство рецепторов *EGF* включает в себя четыре различных белка — *Her-1*, *Her-2*, *Her-3* и *Her-4*, которые образуют рецепторные комплексы путем формирования гомо- или гетеродимеров (Varley et al., 2005). *Her-4* экспрессируется на высоком уровне в клетках нормального и трансформированного уротелия, например в клетках опухолей мочевого пузыря (Rotterud et al., 2005). Эффекторные механизмы регуляции клеточных функций белками семейства *EGF* основаны на участии сигнальных путей *MAPK* и *PI3K* (Varley et al., 2005).

Индукция фактора *Prag* (рецептора гамма пероксидазы, активируемого пролиферативными факторами) активирует программу экспрессии генов, ведущую к появлению маркеров терминальной уротелиальной дифференцировки, включая цитокератин 20 и уроплакины (Varley et al., 2004a, 2004b). Активация дифференцировки, вызванная *Prag*, проявляется на фоне торможения сигнального пути *EGF*, который активен в пролиферирующих клетках уротелия (Varley et al., 2004a).

Роль сигнального пути *Wnt/β*-катенин в регуляции пролиферации и дифференцировки уротелия в нормальных условиях недостаточно хорошо изучена. Однако опубликованные данные о роли этого сигнального пути в регуляции функций ССК различной тканевой специфики и возникновении опухолевых СК (Nusse et al., 2008) позволяют предположить, что активность отдельных членов семейства *Wnt/β*-катенин необходима для самоподдержания СК уротелия, а гиперактивация сигнального пути в целом может способствовать появлению опухолей. 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).

Цель настоящей работы заключалась в оценке включения клеток кишечника трансгенных мышей-доноров *GFP* в гистогенез ткани мочевого пузыря сингенных реципиентов линии C57BL. С этой целью мы использовали разработанную ранее модель, в которой МСК от мышей *GFP* переносили в мочевой пузырь сингенных реципиентов, подвергнутый криотравмке (Попов и др., 2010). Результаты настоящей работы показали, что трансплантированные клетки эпителия кишечника, производящие трансгенный *Gfp*, трансдифференцируются в уротелий мочевого пузыря. В ткани мочевого пузыря реципиентов после трансплантации клеток кишечника *Gfp* выявляется путем оценки первичной флуоресценции, иммунофлуоресценции и ОТ-ПЦР, а незначительное количество уротелиальных клеток показывает одновременную продукцию *Gfp* и *Her-4* с характерным для уротелия рисунком экспрессии, выявляемую путем двойного иммуногистохимического окрашивания специфическими антителами.

## Материал и методика

Получение клеток эпителия кишечника мышей. Ткань тонкого кишечника от трансгенных мышей C57BL/6-Tg(ACTbEGF)1Osb/J (мыши *GFP*), повсемест-

стно экспрессирующих Gfp, переносили в чашку Петри и промывали с помощью шприца просвет кишки охлажденным раствором PBS. Затем ткань помещали на ночь в охлажденный раствор 0.25%-ного трипсина с 1 мМ ЭДТА, разведенным 1 : 1 PBS при 4 °C. После инкубации клетки эпителия отделяли от соединительной ткани пластиковым скребком, пропускали через иглы уменьшающегося диаметра, осаждали центрифугированием при 1000 об/мин в течение 5 мин, ресуспендировали в 2 мл PBS и подсчитывали их количество в камере Горяева, используя 0.2%-ный раствор трипанового синего для оценки жизнеспособности клеток.

Оценка трансдифференцировки клеток эпителия кишечника в уротелий в опытах *in vivo*. Клетки эпителия кишечника ресуспендировали в концентрации 5 · 10<sup>6</sup>/мл в РС, содержащей 50 ед./мл гепарина, без ЭБС. Для трансдифференцировки в уротелий клетки вводили в стенку мочевого пузыря мыши линии C57BL, как это было описано нами ранее для МСК (Попов и др., 2010). 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 OptonVario (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 суспензию клеток кишечника 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. Рану после лапаротомии 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 опытах использовали 8—12-недельных мышей-самок линии C57BL массой 18—22 г, полученных из питомника лабораторных животных «Рапполово» (Ленинградская обл.).

Ткани мочевого пузыря и тонкого кишечника от трансгенных мышей GFP были любезно предоставлены проф. В. М. Михайловым (Институт цитологии РАН). Мышей GFP, полученных в качестве щедрого дара Детского госпиталя г. Окланд (Калифорния, США), содержали и разводили в виварии Института цитологии РАН при обычном питании и световом режиме.

Гистохимическая окраска замороженных и фиксированных в параформальдегиде тканей. Для приготовления замороженных срезов ткань тонкого кишечника и мочевого пузыря хранили в жидком 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 обрабатывали 10 мин 0.2%-ным детергентом Тритоном

X-100, промывали PBS 2 раза по 5 мин, сайты неспецифического связывания антител блокировали 1 ч раствором, содержащим 3 % бычьего сывороточного альбумина и 0.1 % Твина 20; затем на срезы 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 красили 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.

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 хлороформ—парафин (1 : 1) и через 3 порции расплавленного парафина по 60 мин в каждой при 56—58 °C. Из парафиновых блоков, наклеенных на деревянные бруски, на микротоме готовили срезы толщиной 5—7 мкм, которые наносили на предметные стекла, обработанные 2%-ным аминопропилтриэтоксисиланом. Парфиновые срезы после 30 мин инкубации в термостате обрабатывали ксилом 2 раза по 3 мин при 65 °C и проводили их депарафинизацию спиртами нисходящей крепости по 3 мин в каждом. После 5 мин инкубации срезов в 3%-ной перекиси водорода их протравливали в 0.1 М цитратном буфере, pH 6.0, в течение 10 мин в микроволновой печи при 650 Вт. После 20 мин охлаждения срезы помещали в 0.05 М Трис-Cl, pH 7.5, на 10 мин; блокировку сайтов неспецифического связывания и обработку антителами проводили, как это описано выше.

Электрофорез и иммуноблотинг. Электрофорез белков проводили в 8%-ном полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия. Для приготовления проб из тканей их измельчали ножницами, гомогенизовали в PBS, гомогенаты центрифугировали при 2 тыс. об/мин 5 мин и лизировали в течение 30 мин на льду в трех объемах буферного раствора (относительно объема плотного осадка клеток), содержащего 25 мМ Трис-Cl (pH 7.4), 250 мМ NaCl, 0.25%-ный детергент NP-40, 1 мМ PMSF и коктейль ингибиторов протеолиза 1 : 100. Экстракты клеток центрифугировали 15 мин при 13 000 г 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 мМ дитиотреита, 120 мМ 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 электропротеноса. Белки на мембране выявляли специфическими антителами и визуализировали реактивом ECL.

Ревертированная полимеразная цепная реакция (ОТ-ПЦР). Общую РНК выделяли из печени, легких, кишечника, почек и мочевого пузыря опытных и контрольных мышей линии C57BL, которым МСК вводи-

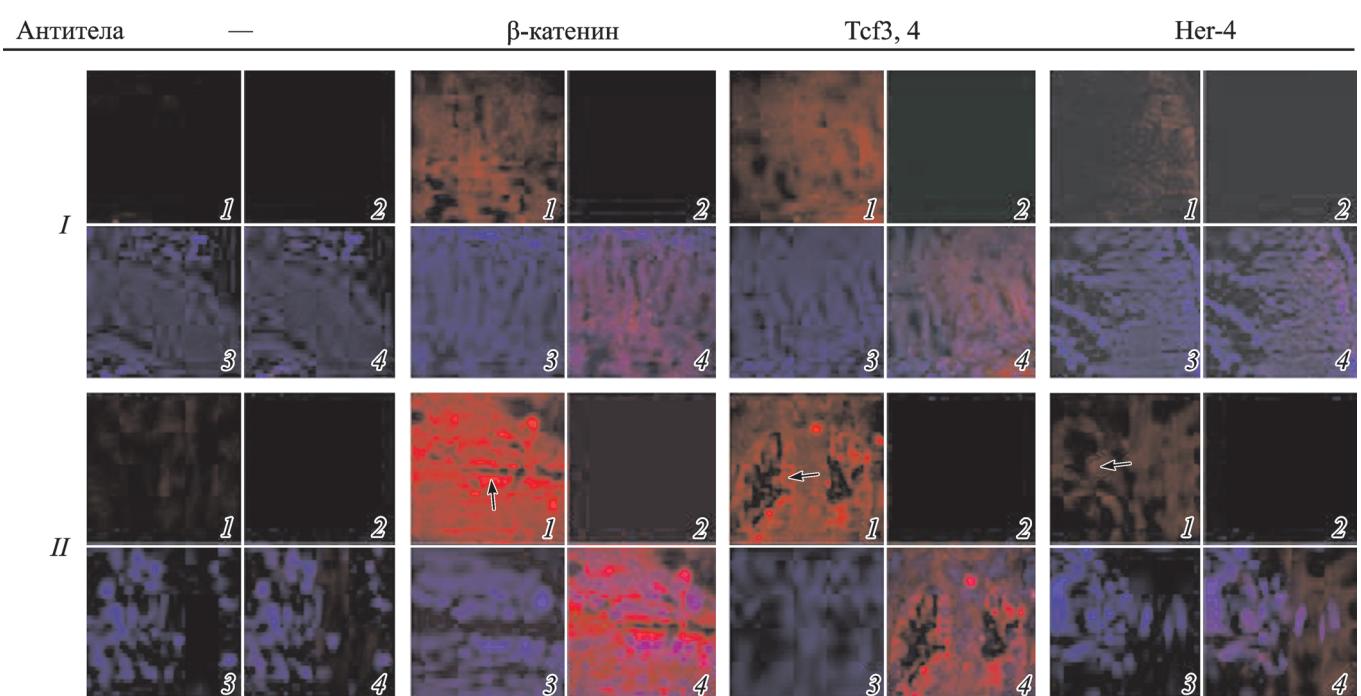


Рис. 1. Иммуногистохимическая оценка экспрессии  $\beta$ -катенина, Tcf3,4 и Her-4 в тонком кишечнике мышей C57BL.

1 — специфические антитела, 2 — естественная флуоресценция, 3 — окраска DAPI, 4 — совмещение всех изображений. Стрелками показана локализация белков в клетках. Здесь и на рис. 2—3: изображения получены на электронном сканирующем микроскопе Pascal, лазеры с длинами волн 488 и 543 нм. Увел.: I — об. 20 $\times$ , II — об. 100 $\times$ .

ли *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. РТ-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 кДНК 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.

**Антитела.** Использовали следующие антитела: мышиные моноклональные антитела против Tcf3,4 (Abcam, Великобритания); мышиные моноклональные антитела против  $\beta$ -актина (Sigma, США); кроличьи поликлональные антитела против Gfp (Sigma, США, и Abcam, Великобритания); мышиные моноклональные антитела против Her-4 (Abcam, Великобритания); кроличьи поликлональные антитела против  $\beta$ -катенина (Abcam, Великобритания, и Sigma, США); видоспецифичные антитела Alexa Fluor® 568, Fab-фрагмент кроличьих антимышьных 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).

**Реактивы.** В работе использовали следующие реактивы: Anti-Fade, PVDF, полиакриламид для электрофореза, реактив Брэдфорд (BioRad, США); бычий сывороточный альбумин, додецилсульфат натрия, коктейль ингибиторов протеолиза, NP-40, DAPI, PMSF, параформальдегид, Тритон X-100, Трис (Sigma, США); трипсин, содержащий 1 мМ ЭДТА, среду DMEM/F12, ЭБС (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); Twin 20 (Bio Chemica, Германия); этиловый эфир (Вектон, Россия); KCl, метиловый спирт, уксусная кислота (Реахим, Россия); гепарин (Белмедпрепараты, Белоруссия); нефлуоресцирующее иммерсионное масло (Carl Zeiss, Швейцария); 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 ткани кишечника с помощью иммуногистохимии. В ткани кишечника, использованной нами в качестве источника донорских клеток,  $\beta$ -катенин и Tcf3,4 выявлялись в эпителии преимущественно в цитоплазматической мемbrane и цитоплазме (рис. 1). Ворсины и крипты прокрашивались неравномерно на эти белки, в некоторых из них была очевидна более выраженная экспрессия  $\beta$ -катенина и Tcf3,4, чем в соседних аналогич-

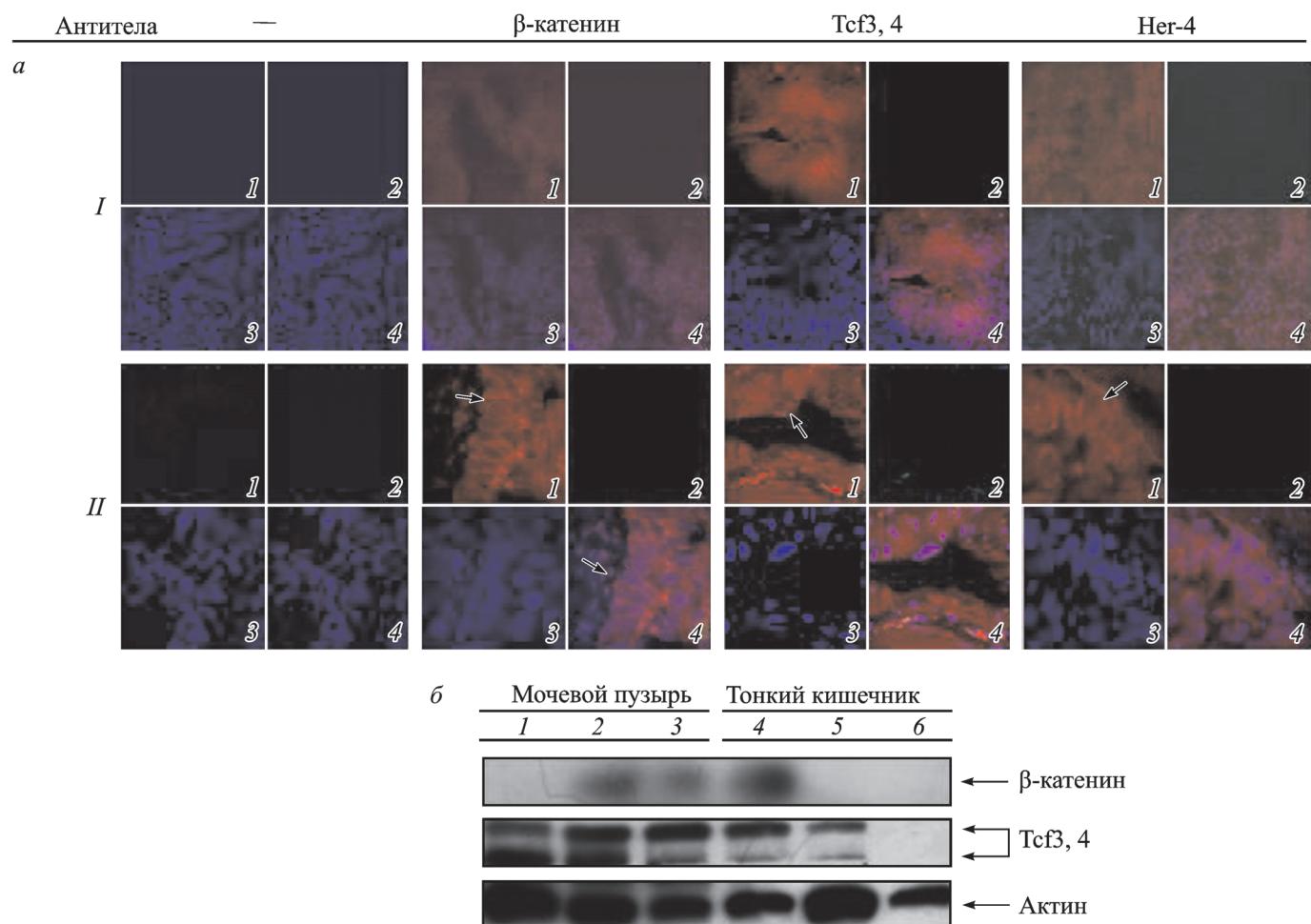


Рис. 2. Иммуногистохимическая и иммуноблотинговая оценка экспрессии  $\beta$ -катенина, Tcf3,4 и Нег-4 в мочевом пузыре мышей C57BL.

*a* — иммуногистохимическая характеристика экспрессии белков; стрелками обозначены базальный слой клеток ( $\beta$ -катенин), поверхностный слой клеток (Tcf3,4) и базальная мембрана (Нег-4) соответственно; *б* — иммуноблотинговая оценка продукции  $\beta$ -катенина и Tcf3,4 в тонком кишечнике и мочевом пузыре. Обозначения те же, что и на рис. 1.

ных структурах (рис. 1, стрелки). Следует отметить, что более выраженная экспрессия  $\beta$ -катенина и Tcf3,4 наблюдалась в разных участках крипта и ворсин —  $\beta$ -катенин локализовался в восходящей части ворсин, Tcf3,4 — в восходящей части крипта (рис. 1). Клетки эпителия кишечника продуцировали незначительное количество Нег-4, который локализовался преимущественно в области крипта (рис. 1, стрелка). Нег-4, подобно  $\beta$ -катенину и Tcf3,4 экспрессировался неравномерно в различных криптах и ворсинах, в некоторых из них продукция белка значительно превышала таковую в соседних структурах (рис. 1).

Оценка экспрессии маркерных белков в ткани мочевого пузыря с помощью иммуногистохими.  $\beta$ -Катенин выявлялся равномерно во всех слоях эпителия мочевого пузыря и локализовался преимущественно в области плазматической мембраны и в цитоплазме (рис. 2, а, стрелка). В подлежащей мезенхиме  $\beta$ -катенин в противоположность эпителиальным клеткам обнаруживался в области ядер (рис. 2, а). Белки Tcf3,4 распределялись равномерно в различных компартментах эпителиальных клеток базального и промежуточного слоев уретерии, показывая лишь некоторую концентрацию в области ядерной мембранны. В клетках апикального слоя

продукция этих белков была значительно снижена, а в ядерной области белки не выявлялись (рис. 2, а, стрелки). Нег-4 показывал значительно более высокую продукцию в клетках эпителия базального и промежуточного слоев по сравнению с таковой в клетках эпителия кишечника, однако большая часть белка локализовалась в цитоплазматической мембране и цитоплазме. Следует отметить высокий уровень продукции Нег-4 в базальной мембране, а также в ядрах подлежащих стромальных клеток (рис. 2, а, стрелки).

Иммуноблотинговая характеристика продукции маркерных белков в ткани кишечника и мочевого пузыря. Оценка продукции  $\beta$ -катенина и Tcf3,4 в ткани кишечника и мочевого пузыря с помощью иммуноблотинга подтвердила данные иммуногистохимического анализа. Продукция  $\beta$ -катенина в кишечнике и мочевом пузыре мышей в целом была незначительной, в кишечнике этот белок выявлялся у одного из трех, а в мочевом пузыре — у двух из трех использованных животных (рис. 2, б). Белки Tcf3,4 с мол. массами 60 и 50 кДа соответственно продуцировались на более высоком уровне в мочевом пузыре, чем в кишечнике, причем в кишечнике продукция Tcf3 была более высокой по сравнению с продукцией Tcf4 (рис. 2, б).

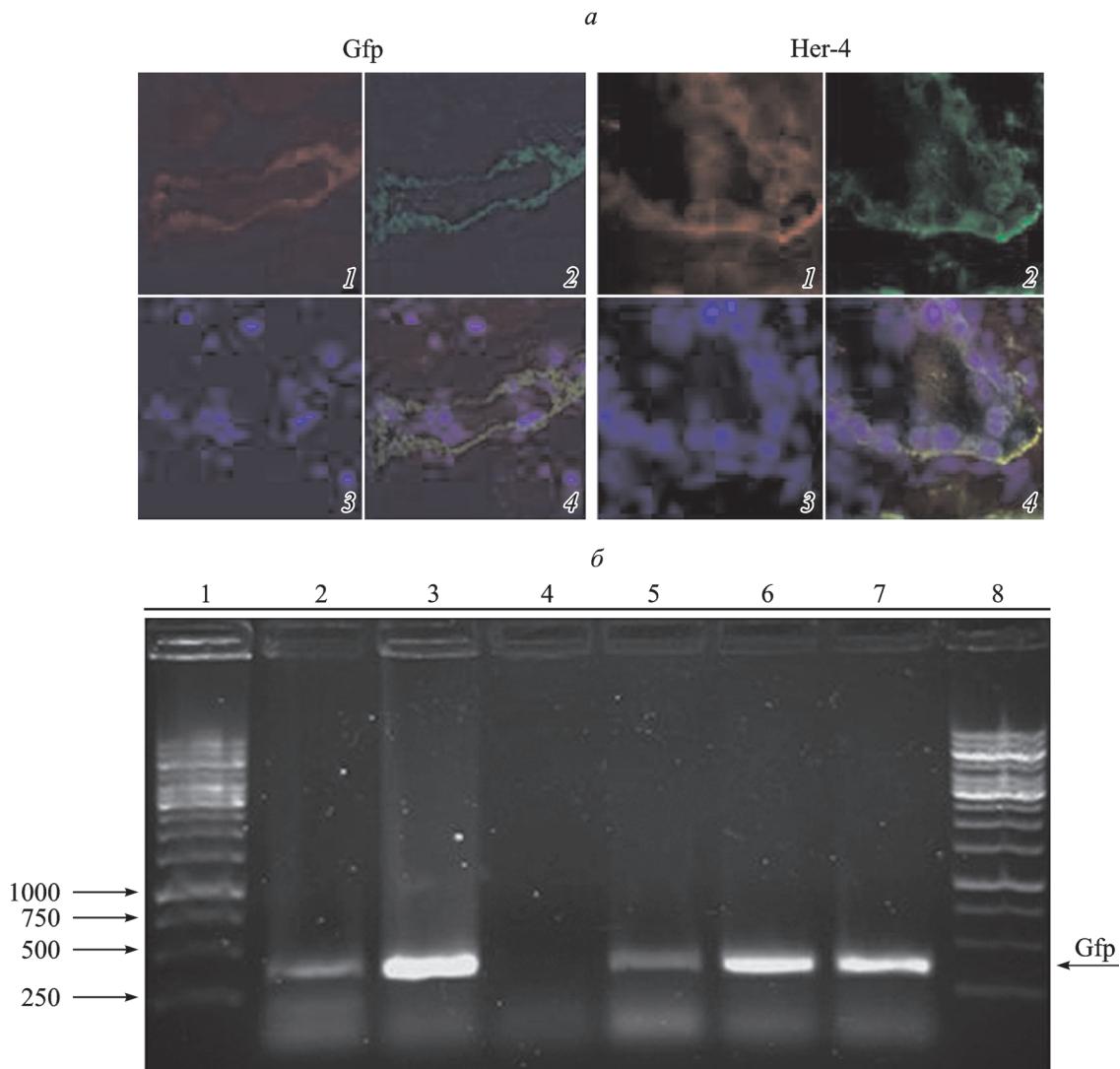


Рис. 3. Оценка экспрессии Gfp и Her-4 в мочевом пузыре мышей линии C57BL после трансплантации им сингенных клеток кишечника, продуцирующих Gfp.

*а* — выявление продукции Gfp и совместной продукции Gfp и Her-4 в мочевом пузыре с помощью иммуногистохимической окраски ткани мочевого пузыря; *б* — характеристика экспрессии Gfp в мочевом пузыре мышей-реципиентов путем ОТ-ПЦР. Обозначения те же, что и на рис. 1. Дорожки 1, 8 — маркеры молекулярной массы (стрелками показаны маркеры размерами 1000, 750, 500 и 250 пар оснований); дорожка 2 — мочевой пузырь мышей-реципиентов; дорожки 3—7 — соответственно печень, почки, тонкий кишечник, мочевой пузырь и легкие мышей GFP.

Оценка включения трансплантированных клеток кишечника в гистогенез ткани мочевого пузыря. Для оценки трансдифференцировки клеток кишечника в уротелий была использована ранее разработанная нами модель, основанная на слежении за включением в гистогенез уротелия МСК, экспрессирующих GFP, после их трансплантации в подвергнутый криотравме мочевой пузырь реципиентов (Попов и др., 2010). Поскольку экспрессия Tcf3,4 в эпителии кишечника и мочевого пузыря различалась незначительно в противоположность Her-4, который продуцировался на значительно более высоком уровне в мочевом пузыре, чем в кишечнике, в дальнейших опытах мы использовали для оценки трансдифференцировки только Gfp и Her-4.

Через 2 и 4 нед после введения клеток кишечника в мочевом пузыре мышей-реципиентов мы обнаружили путем гистохимического анализа белок Gfp, который выявлялся в клетках уротелия по естественной зеленой флуоресценции и с помощью специфических антител, выявляя-

емых вторыми антителами, конъюгированными с красным флуорохромом (рис. 3, *a*). При использовании двойного флуоресцентного окрашивания антителами к Her-4 с красным флуорохромом и антителами к Gfp с зеленым флуорохромом мы обнаружили в уротелии единичные группы клеток, окрашенные обоими красителями (рис. 3, *a*). Уровень и рисунок экспрессии Her-4 в этих клетках соответствовали таковым в клетках уротелия мочевого пузыря, а не кишечника. Gfp также выявлялся в ткани мочевого пузыря реципиентов с помощью ОТ-ПЦР, хотя уровень его экспрессии был значительно ниже, чем в ткани мочевого пузыря трансгенных мышей GFP (рис. 3, *б*).

## Обсуждение

В настоящей работе мы пытались моделировать клеточные события, происходящие при аутопластике мочевого пузыря тканью кишечника в клинических условиях.

С этой целью клетки эпителия кишечника трансгенных мышей, экспрессирующих Gfp, трансплантировали в мочевой пузырь сингенных реципиентов линии C57BL, подвергнутый криотравме. В соответствии с данными литературы (De Coppi et al., 2007) и разработанной нами ранее экспериментальной моделью (Попов и др., 2010), при криотравме в мочевом пузыре возникают условия для трансдифференцировки соматических клеток в уротелий. МСК, экспрессирующие Gfp, но не продуцирующие *in vitro* белки Tcf3,4 и Hes-4, которые являются соответственно молекулярными маркерами сигнальных путей Wnt/β-катенин и EGF, после введения в мочевой пузырь реципиентов показывают одновременную продукцию Gfp с Tcf3,4 или Hes-4 (Попов и др., 2010). В настоящей работе мы показали, что клетки эпителия тонкого кишечника мышей, экспрессирующие Gfp, подобно МСК после введения в мочевой пузырь сингенных реципиентов, подвергаются трансдифференцировке в клетки уротелия.

В начале работы мы изучили возможность использования в качестве маркеров трансдифференцировки клеток эпителия кишечника в уротелий белки β-катенин, Tcf3,4 и Hes-4. С помощью иммуногистохимических подходов мы обнаружили, что экспрессия β-катенина в эпителии кишечника и уротелии существенно не различается. В том и другом случае белок выявлялся преимущественно не в ядре, а в цитоплазматической мемbrane и цитоплазме (рис. 1; 2, а), т. е. в отделах клетки, в которых присутствует неактивная форма β-катенина (Reya, Clevers, 2005). В некоторых криптах-ворсинках экспрессия β-катенина значительно превосходила таковую в соседних подобных структурах. Этот результат соответствует данным литературы о клональной организации крипта-ворсин и возможных различиях экспрессии в них регуляторных белков (Korinek et al., 1998). Данные иммуноблотинга также выявили низкий уровень продукции β-катенина в эпителии кишечника и мочевого пузыря (рис. 2, б).

Иммуногистохимический анализ показал, что в эпителии кишечника белки Tcf3,4 экспрессируются в цитоплазме клеток, тогда как в уротелии они обнаруживаются не только в цитоплазме, но и в ядрах клеток базального и промежуточного слоев. В специализированных клетках апикального слоя уротелия белки Tcf3,4 выявлялись в незначительном количестве в цитоплазме и отсутствовали в ядре (рис. 1; 2, а). Данные иммуноблотинга подтвердили более высокий уровень продукции белков Tcf3,4 в мочевом пузыре по сравнению с кишечником. Известно, что белки Tcf3,4 являются транскрипционными факторами, функциональная активность которых связана с ядром. Наши результаты, показывающие локализацию белков Tcf3,4 в ядрах клеток базального слоя, позволяют предположить, что эти белки являются активными в нормальном уротелии, но их функция связана с торможением деления клеток. В отсутствие активного β-катенина клетки некоторых тканей, например эпидермиса, продуцируют Tcf3, который ингибирует дифференцировку СК волоссяного фолликула. Гиперэкспрессия Tcf3 также вызывает ингибирование дифференцировки эпителиальных линий, происходящих из СК волоссяного фолликула (Nguyen et al., 2006). Функциональная роль Tcf3 в мочевом пузыре в условиях отсутствия сигналов Wnt/β-катенин может быть подобна таковой в эпидермисе и способствовать пролиферативному покою клеток мочевого пузыря.

Tcf3 в мочевом пузыре может играть роль ингибитора дифференцировки, способствуя удержанию клеток эпителия в состоянии покоя путем ингибирования транскрип-

ции фактора Pragy, способствующего дифференцировке клеток уротелия (Varley et al., 2004a). В эпидермисе Pragy поддерживает дифференцировку СК, а его ингибирование осуществляется транскрипционным фактором Tcf3 (Nguyen et al., 2006). Вероятно, в эпителии кожи и мочевого пузыря, выполняющих сходную функцию по поддержанию водного баланса, Pragy играет подобную роль. Схожесть механизмов регуляции дифференцировки в эпителии кожи и мочевого пузыря подтверждается также участием в том и другом случае продукта гена *Get1*, который опосредует влияние Pragy на дифференцировку клеток (Yu et al., 2009).

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 МСК, 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 производить и воспринимать трансдифференцировочные сигналы (Staack et al., 2005).

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

Выявленный нами в клетках кишечника и мочевого пузыря нормальных мышей C57BL низкий уровень продукции β-катенина и высокий уровень Tcf3,4 (рис. 1; 2, а, б) давал возможность предположить, что эти белки нерационально использовать в качестве маркеров трансдифференцировки эпителия кишечника в уротелий. С другой стороны, данные о низком уровне продукции Hes-4 в эпителии кишечника и высоком — в уротелии (рис. 1; 2, а) свидетельствовали о возможности использования этого белка для оценки трансдифференцировки. Поэтому в опытах с оценкой включения клеток эпителия в гистогенез ткани мочевого пузыря мы использовали гистохимическую окраску на Gfp, а также двойную окраску на Gfp и Hes-4. Результаты наших опытов показали, что в уротелии мочевого пузыря мышей через 2 и 4 нед после трансплантации клеток кишечника от сингенных мышей GFP обнаруживаются единичные группы клеток, с естественной зеленой флуоресценцией Gfp, который также окрашивается специфическими антителами (рис. 3, а). В уротелии мышей-реципиентов также обнаруживаются единичные группы клеток, окрашенные обоими красителями (рис. 3, а). Уровень и рисунок экспрессии Hes-4 в этих клетках соответствуют таковым в клетках уротелия мочевого пузыря, а не кишечника. Ревертированная полимеразная цепная реакция также выявила экспрессию гена *Gfp* в мочевом пузыре опытных мышей, хотя уровень ее

продукции был значительно ниже такового у мышей GFP (рис. 3, б).

В целом результаты настоящей работы показали, что трансплантация клеток кишечника в подвергнутый криопримыванию мочевой пузырь сингенных реципиентов сопровождается их трансдифференцировкой в уротелий, уровень которой незначителен и, по-видимому, не может обеспечить восстановления функций мочевого пузыря в условиях аутопластики в медицинских клиниках.

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

### Список литературы

- Комяков Б.К., Гулиев Б.Г. 2005. Хирургия протяженных сужений мочеточников. СПб.: Диалект. 255 с. ISBN 5-98230-019-5.
- Попов Б. В., Зайчик А. М., Будько М. Б., Ница Н. А., Комяков Б. К., Толкунова Е. Н., Жидкова О. В., Петров Н. С. 2010. Модель *in vivo* для изучения трансдифференцировки соматических клеток в уротелий. Цитология. 52 (10) : 844—852.
- Anumanthan 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.
- 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.
- Barker N., van de Wetering M., Clevers H. 2008. The intestinal stem cell. *Genes Develop.* 22 : 1856—1864.
- 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.
- Haegebarth A., Clevers H. 2009. Wnt signaling, lgr5, and stem cells in the intestine and skin. *Amer. J. Pathol.* 174 : 715—721.
- Herzog E. L., Chai L., Krause D. S. 2003. Plasticity of marrow-derived stem cells. *Blood.* 102 : 3483—3493.
- 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.
- Korinek V., Barker N., Moerer P., van Donselaar E., Huls G., Peters P.J., Clevers H. 1998. Depletion of epithelial stem-cell compartments in the small intestine of mice lacking Tcf-4. *Nat. Genet.* 19 : 379—383.
- Kurzrock E. A., Lieu D. K., Degraffenreid L. A., Chan C. W., Isseroff 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.
- Ottamasathien S., Wang Y., Williams K., Franco O. E., 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.
- Reya T., Clevers H. 2005. Wnt signalling in stem cells and cancer. *Nature.* 434 : 843—850.
- Røtterud R., Nesland J. M., Berner A., Fossa S. D. 2005. Expression of the epidermal growth factor receptor family in normal and malignant urothelium. *BJU Int.* 95 : 1344—1350.
- 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.
- Southgate J., Harnden P., Trejdosiewicz L. K. 1999. Cytokeratin expression patterns in normal and malignant urothelium: a review of the biological and diagnostic implications. *Histol. Histopathol.* 14 : 657—664.
- 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., Ottamasathien 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., Haegebarth 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.
- Van Es J. H., Clevers H. 2005. Notch and Wnt inhibitors as potential new drugs for intestinal neoplastic disease. *Trends Mol. Med.* 11 : 496—502.
- 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. 2004a. Role of PPAR-gamma and EGFR signalling in the urothelial terminal differentiation programme. *J. Cell Sci.* 117 : 2029—2036.
- Varley C. L., Stahlschmidt J., Smith B., Stower M., Southgate J. 2004b. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma reverses squamous metaplasia and induces transitional differentiation in normal human urothelial cells. *Amer. J. Pathol.* 164 : 1789—1798.
- Wu X. R., Lin J. H., Walz T., Häner M., Yu J., Aebi U., Sun T. T. 1994. Mammalian uroplakins. A group of highly conserved 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/Grhl3* also regulates urothelial differentiation. *EMBO J.* 28 : 1890—1903.

Поступила 7 XII 2010

EPIHELIAL INTESTINE CELLS TRANSDIFFERENTIATE INTO BLADDER UROTHELIUM  
IN EXPERIMENTS *IN VIVO*

B. V. Popov,<sup>1</sup> A. M. Zaichik,<sup>2</sup> M. B. Budko,<sup>2</sup> O. V. Zlobina,<sup>1</sup> E. N. Tolkunova,<sup>1</sup>  
O. V. Zhidkova,<sup>1</sup> N. S. Petrov<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Institute of Cytology RAS and <sup>2</sup> GOU DPO SPbMAPO Roszdrava, St. Petersburg;  
e-mail: popov\_478@hotmail.com

The autoplasic surgery by intestine tissue has been used for reconstructive therapy of the urinary tract since the middle of the last century; however, cell mechanisms of the urothelium engraftment are still obscure. Intestine stem cells possess plasticity and presumably enable after the autoplasic surgery to transdifferentiate into mature cells of urinary tract. Using the preliminary developed *in vivo* model for evaluation of somatic cells transdifferentiation into urothelium, we have found that the epithelial intestine cells producing Gfp transdifferentiate into the cryoinjured bladder urothelium of the syngenic C57BL mice. Gfp was detected in the bladder tissue of mice-recipients using reverted polymerase chain reaction, primary fluorescence and immunofluorescence, while colocalization of the Gfp and Her-4 revealing similar to urothelium staining pattern was demonstrated in a few urothelium cells by double immunohistochemical staining of the bladder tissue with specific antibodies. The results obtained suggest that epithelial intestine cells enable to transdifferentiate into bladder urothelium, however the transdifferentiation level is low and presumably can not provide full functional urothelium engraftment in the case of autoplasic bladder surgery by intestine tissue.

**Ключевые слова:** intestine epithelium, transdifferentiation, bladder urothelium, EGF and Wnt/β-catenin signal pathways, Her-4 and Tcf3,4.