

УДК 575.853

В.А. ШАБЛІЙ^{1, 2}, Л.Л. ЛУКАШ¹, Г.С. ЛОБИНЦЕВА²

¹ Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, Київ

² Інститут клітинної терапії, Київ

E-mail: V_shabliy@ukr.net

**РОЛЬ ДЕЯКИХ ВЗАЄМОДІЙ
ДОНОРСЬКИХ ТА РЕЦИПІЄНТНИХ
КЛІТИН ПІД ВПЛИВОМ
МІКРООТОЧЕННЯ В ПРОЦЕСАХ
РЕГЕНЕРАЦІЇ**



Огляд літератури присвячений аналізу експериментальних даних, що стосуються можливих механізмів, які лежать в основі трансдиференціації або пластичності тканиноспецифічних стовбурових клітин. Головну увагу приділено механізмам і генетичним наслідкам злиття різних типів донорських клітин з клітинами тканин реципієнта, що вивчали на моделях клітинної терапії захворювань печінки та серця. Розглянуто також роль міжклітинних контактів різного типу і горизонтальної передачі генетичного матеріалу в процесі регенерації серцевої тканини.

© В.А. ШАБЛІЙ, Л.Л. ЛУКАШ, Г.С. ЛОБИНЦЕВА, 2012

ISSN 0564–3783. Цитология и генетика. 2012. № 3

Вступ

Дорослі стовбурові клітини проявляють здатність давати початок не лише відповідній тканині, утворюючи диферон цієї тканини, але й іншим нетиповим тканинам — явище, що отримало назву трансдиференціації, або пластичності. Існують декілька гіпотетичних уявлень відносно механізмів пластичності та окремі факти на користь того чи іншого уявлення.

По-перше, у даній тканині або у клітинному матеріалі, що використовується для клітинної терапії, можуть бути присутні різні тканиноспецифічні стовбурові клітини, які під впливом мікрооточення диференціюються у відповідні клітинні лінії.

По-друге, клітина може спочатку дедиференціюватися, а потім піддатися процесу трансдиференціації у нетипову тканину під впливом мікрооточення. Найбільш яскравим прикладом цього феномена є клонування вівці Доллі та інших ссавців. В цих експериментах соматичні клітини були перепрограмовані у зворотному напрямку, тобто у плюрипотентні стовбурові клітини, під впливом внутрішньоклітинного середовища яйцеклітини з видаленим власним ядром, а потім ці клітини починали диференціюватися у прямому напрямку, тобто тим же шляхом, що і в процесі ембріонального розвитку. До експериментів з клонування явище дедиференціації клітин було відоме у амфібій, які здатні повністю відтворювати втрачені кінцівки та інші анатомічні частини тіла. Подібні ефекти трансдиференціації клітин дослідники інколи спостерігають *in vitro* при створенні певних умов існування.

По-третє, зміна фенотипу клітин може відбуватися внаслідок злиття донорських клітин з клітинами-резидентами даного органу. Після злиття утворюються гетерокаріони та гібридні клітини, у складі яких клітини різко змінюють свій фенотип під впливом нового внутрішньоклітинного середовища. Наприклад, злиття міобласту і фібробласту призводить до появи м'язевих білків у цитоплазмі фібробласту. Такі ефекти спочатку були продемонстровані в культурі клітин із використанням спеціальної селекції гетерокаріонів, тому що ці події відбуваються з доволі низькою частотою — один на 10^5 – 10^6 на рівні спонтанного мутагенезу. Ймовірно, меха-

нізми злиття клітин лежать в основі їхнього пристосування до нових умов мікрооточення, коли підсилюється відбір на користь певного типу клітин. Наприклад, при гострій недостатності органу відбувається відмирання клітинних популяцій, особливо в тканинах, для яких характерна тетраплоїдність клітин, таких як міоцити, гепатоцити, клітини Пуркін'є та ін. Останнім часом одержано цілу низку доказів стосовно злиття донорських клітин з резидентними клітинами органу реципієнта в місцях ін'єкції. Саме ці дослідження будуть розглянуті більш детально у даному огляді.

Дослідження феномену злиття клітин-партнерів на моделі клітинної терапії дисфункції печінки

Трансдиференціація, або пластичність, дорослих стовбурових клітин є одним із найбільш актуальних питань, що досліджуються впродовж останнього десятиліття. В цьому сенсі значну увагу привертають до себе експерименти з відновлення пошкодженої тканини печінки після трансплантації кісткового мозку (ТКМ) [1]. Значна кількість експериментальних робіт показала, що стовбурові клітини кісткового мозку при їхній диференціації формують тканини мезодермального [2], ектодермального [3] та ендодермального [4] походження. Встановлено, що як мезенхімальні (МСК), так і гемопоетичні стовбурові клітини (ГСК) кісткового мозку в певних умовах диференціюються у гепатоцити печінки [5].

Здатність донорських стовбурових клітин спричиняти репопуляцію тканини печінки реципієнта при спадкових захворюваннях було продемонстровано на прикладі лінії мишей, які хворіють на тирозинемію I, з мутантним геном фермента фурмаліацетоацетат гідролази (*FAH*). Для лікування тварин цієї лінії їм потрібно щоденно давати 2-(2-нітро-4-трифлуоро-метілбензіол)-1,3 циклогександіон (NTBC) [6, 7].

В дослідях по розробці клітинної терапії цього спадкового захворювання проводили опромінення самок в летальній дозі з подальшою ТКМ від самців трансгенної лінії Rosa 26, в клітинах яких експресується ген β -галактозидази (β -*gal*). Для того щоб оцінити участь клітин донорського трансплантата у віднов-

ленні функції печінки, тваринам лінії *FAH*⁻ було відмінено прийом препарату NTBC. Через 7 міс після ТКМ в печінках мишей лінії *FAH*, що жили без прийому NTBC, були знайдені клони клітин, які експресували ген β -*gal*, що вказувало на формування тканини донорського походження. Потрібно зазначити, що ТКМ мишей дикого типу *FAH*-дефіцитним мишам за відсутності тотального опромінення не призводила до відновлення тканини печінки останніх навіть при лікуванні їх препаратом NTBC.

В наступних експериментах піддослідним тваринам проводили трансплантацію очищеної фракції донорського кісткового мозку, що збагачена на ГСК з фенотипом c -*kit*^{hi}, *Thy*^{low}, *Lin*⁻, *Sca*⁺, для відновлення тканини печінки. Доказом того, що, ймовірно, саме гемопоетичні стовбурові клітини кісткового мозку диференціюються в клітини печінки, є присутність гепатоцитів з донорським генетичним матеріалом в печінках тварин, у яких трансплантація пройшла успішно.

При більш детальному аналізі взаємодії донорського клітинного матеріалу з тканиною печінки реципієнта протягом 22 тиж було отримано підтвердження того, що пластичність стовбурових клітин КМ може бути результатом їхнього злиття з диференційованими клітинами. Через 7 тиж після ТКМ в печінці піддослідних тварин були знайдені невеликі кластери гепатоцитів донорського походження. В подальшому гепатоцити донора і реципієнта зливалися з утворенням велих ділянок химерної тканини. Знайдено близько 170 заселених донорськими клітинами ділянок, які містили $5 \cdot 10^7$ гепатоцитів. Слід зазначити, що при трансплантації очищеної фракції кісткового мозку, збагаченої на ГСК, число кластерів не збільшувалося. При порівнянні ефективності приживлення клітин КМ та гепатоцитів в печінці реципієнта встановлено, що після трансплантації гепатоцитів число заселених донорськими клітинами кластерів було в декілька сотень разів вищим, і утворювалися вони значно швидше, ніж після ТКМ.

Нещодавні дослідження вказують на те, що стовбурові клітини пуповинної крові можуть слугувати не лише джерелом кровотворення, а також клітинним матеріалом для диферен-

ціювання в адипоцити, остеоцити, хондроцити, кардіоміоцити, нейрони та гепатоцити [8]. Різні дослідники описували диференціювання клітин кордової крові в гепатоцитоподібні клітини в умовах *in vitro*. Однак частота приживлення цих клітин при трансплантації їх у печінку піддослідних тварин була досить низькою, навіть при ураженні печінки хлористим вуглецем, 2-ацетиламінофлуореном та Fas-лігандом. Незважаючи на низький рівень репопуляції печінки, трансплантація клітин кордової крові призводила до значного зниження смертності при індукованому пошкодженні печінки [9, 10].

Приживлення донорських клітин в фетальній печінці без супресії імунної системи та хімічного враження печінки було показано після ін'єкції клітин кордової крові людини в плоди мишей, пацюків, овець та кіз. Високий рівень химеризму клітин печінки спостерігали впродовж двох років у постнатальний період мишей, яким ще до народження ввели клітини кордової крові людини [11, 12].

У мишей з діабетом I та II типу після трансплантації донорського КМ в печінці та жировій тканині були знайдені клітини, що продукують проінсулін (Proins-P). Встановлено, що Proins-P утворюються саме із клітин КМ, тому їх назвали «клітинами, що походять з КМ та продукують проінсулін (Proins-P BMDC)». При проведенні ТКМ з використанням трансгенних ліній мишей, що несли різні генетичні маркери, Proins-P BMDC зливалися з гепатоцитами мишей-реципієнтів, що хворіють на діабет. Утворені таким чином химерні гепатоцити несуть генетичні маркери як донора (GFP, Y-хромосома, проінсулін), так і реципієнта (β -gal). Крім того, розвиток діабетичного стану індукує експресію не притаманних клітинам кісткового мозку гена TNF- α у BMDC, що свідчить про їхнє перепрограмування [13].

Дослідження показали, що при діабетичній невропатії відбувається злиття клітин кісткового мозку з нейронами Пуркін'є, але частота цих процесів значно нижча в порівнянні з гепатоцитами та складає 0,1 та 2,5 % відповідно [14]. Потрібно зазначити, що у здорових мишей процес злиття відбувається дуже рідко, якщо взагалі відбувається.

Після трансплантації однієї ГСК від мишей лінії Rosa CD45.2 в організм летально опромінених мишей лінії C57BL/6 CD 45.1 розмноження та довгострокове приживлення донорських клітин спостерігалось у 25 % реципієнтів. При дослідженні химеризму клітин печінки через 14 міс було встановлено, що частка донорських клітин з гепатоцитоподібною морфологією в два рази більша у мишей, які приймали гепатотоксин 3,5-діетоксікарбоніл-1,4-дигідроколідін (ДДК), ніж у тварин, що не вживали цього препарату (1/150 000 – після прийому ДДК, без прийому – 1/300 000). Без прийому ДДК клітини донорського походження розташовувались в тканині печінки реципієнтів поодинокі, тоді як у тварин, що приймали ДДК, виявлено кластери з двох чи трьох клітин.

Для детального дослідження можливості донорських стовбурових клітин диференціюватися в клітини печінки КМ, який розвинувся у мишей лінії C57BL/6 після трансплантації однієї ГСК, було ізольовано і проаналізовано за допомогою проточної цитометрії по експресії алеля CD45.2 та трансплантовано в летально опромінених *Fah*^{-/-} реципієнтів. Для максимального виживання реципієнтів лікування препаратом NTBC періодично переривалося та поновлювалося. Гістологічний аналіз тканини печінки мишей лінії *Fah*^{-/-} було проведено через 4–7 міс після ТКМ. Аналіз всіх гістологічних зрізів дозволив встановити: рівень репопуляції тканини печінки клітинами, які мали походження від донорського КМ, становив 40–60 %, що відповідає результатам попередніх досліджень (200–400 скупчень β -gal⁺ клітин на печінку після ТКМ). Імуногістохімічний аналіз тканини печінки мишей показав присутність великих острівців клітин, що мали гепатоцитоподібну морфологію, а також експресували специфічний печінковий ензим FAN та репортерний білок β -gal [15].

Потрібно зазначити, що сироватка крові мишей лінії *Fah*^{-/-} після ТКМ за біохімічними показниками була подібною до сироватки мишей дикої лінії. Ці дані вказують на можливість здатність гемопоетичних клітин диференціюватися в гепатоцити і спричиняти корекцію метаболічних захворювань, пов'язаних з дисфункцією печінки.

Хоча представлені результати свідчать про те, що клітини, похідні від ГСК, можуть утворювати функціональні гепатоцити, залишається незрозумілим, які саме клітини здатні зливатися з гепатоцитами господаря.

З метою встановлення природи клітин, що виступають у ролі партнерів для гепатоцитів при зливанні, було трансплантовано $1 \cdot 10^6$ клітин КМ мишей, дефіцитних за геном *Rag-2*, та загальний γ -ланцюг цитокинового рецептора γ_c в організм *Fah*^{-/-} господарів. Відсутність *Rag-2* та γ_c у мишей призводить до повної втрати циркулюючих В, Т та НК клітин на фоні нормальної кількості міелоїдних та еритроїдних клітин-попередників. Через тиждень після трансплантації КМ було відмінено лікування препаратом NTBC для відбору мишей – носіїв *Fah*⁺ гепатоцитів. За умов відсутності NTBC миші виживали протягом 5 міс. Імуногістохімічний аналіз печінки цих мишей показав типові скупчення *Fah*⁺ гепатоцитів по всій паренхімі печінки. Кінетика репопуляції та число скупчень *Fah*⁺ клітин у цих мишей не відрізнялися від мишей, яким було трансплантовано КМ мишей дикого типу. Ці дані свідчать про те, що клітини лімфоцитарного ряду не зливаються з гепатоцитами. Для мічення міелоїдних клітин *in vivo* використано систему *Cre/lox* рекомбінації, де *Cre*-рекомбіназа специфічно експресується у міелоїдних клітинах під ендогенною регуляторною послідовністю гена лізоцима-М (*LysM*), що незворотно включає експресію репортерного гена β -gal (*R26R*), тому маркуються всі міелоїдні клітини та їхні клітини-попередники. Локус *LysM* винятково експресується у клітинах міеломоноцитарної лінії, при цьому в комітованих клітинах-попередниках спостерігається середній рівень експресії, а в диференційованих клітинах – високий. Було проведено трансплантацію $1 \cdot 10^6$ клітин КМ мишей трансгенних за геном *LysM-Cre* та *R26R* (*LysM-Cre/R26R*) носіїв алеля CD45.2 в організм летально опромієних реципієнтів з генотипом CD45.1 *Fah*^{-/-}.

Ступінь гемопоетичного химеризму в периферичній крові господарів коливався в межах $85 \pm 2,9$ %. Для того щоб перевірити специфічність експресії гена *LysM-Cre*, проаналізували експресію гена β -gal в CD45.2-

клітинах крові. Результати досліджень показали, що лише 2–8 % циркулюючих В-клітин (B 220⁺) та 1–6 % Т-клітин (CD3⁺) експресували ген β -gal, і понад 70 % гранулоцитів (Gr-1^{high}) та 80 % моноцитів (Mac-1^{high}) мали фенотип β -gal⁺. Через 6 міс після трансплантації всі реципієнти були NTBC-незалежними. Гістологічний аналіз печінок мишей лінії *Fah*^{-/-} (позитивний контроль) після трансплантації КМ мишей лінії Rosa26, в клітинах яких експресується репортерний білок β -gal, показав ефективно приживлення донорських клітин. В організмах згаданих реципієнтів середнє число β -gal⁺ скупчень клітин у печінці становило 279 ± 38 . Дослідження печінок реципієнтів КМ від мишей лінії *LysM-Cre/R26R* також показало заселення тканини печінки β -gal⁺ кластерами, що походять від міелоїдних клітин донора; число β -gal⁺ кластерів відповідало рівню контролю – 247 ± 45 ($n = 4$). Подальший аналіз клітин, що заселили паренхіму печінок піддослідних мишей, показав експресію *Fah*.

Нещодавно було показано, що промотор гена *LysM* також активний у невеликій кількості ГСК. Встановлено, що лише 3–8 % клітин Lin⁻Sca-1⁺cKit⁺ SP позитивні за β -gal активністю. Якщо припустити, що ГСК кісткового мозку мають гепатогенну активність, тоді кількість донорських печінкових кластерів складала б 3–8 % усіх β -gal⁺-кластерів, які спостерігали при трансплантації КМ мишей *LysM-Cre/R26R*. Припустили, що більшість клітин, які заселяють печінку реципієнта, належать до міеломоноцитарного гемопоетичного ряду.

Для підтвердження міелоїдного походження β -gal⁺-кластерів провели трансплантацію КМ від *LysM*-мишей в організм реципієнтів *Fah*^{-/-}, які також мають ген-репортер *R26R*. У цьому експерименті лише гемопоетичні клітини експресують високий рівень *Cre*-рекомбінази; химерні гепатоцити, що утворилися в результаті злиття гепатоцитів реципієнта та клітин донора, експресують β -gal у ядрі клітин реципієнта *Fah*^{-/-}/*R26R*. Гістохімічний аналіз двох печінок від реципієнтів (*Fah*^{-/-}/*R26R*) через 5 міс після трансплантації показав широке розповсюдження β -gal⁺-кластерів гепатоцитоподібних клітин, що екс-

пресують ФАН, які химерні за генотипом і є продуктом злиття клітин мієломоноцитарного ряду донора та гепатоцитів реципієнта. Число кластерів у цих печінках також чітко корелює з кількістю кластерів у печінках мишей, яким провели трансплантацію КМ мишей лінії Rosa26. З цього випливає, що більшість печінкових кластерів, які виникли після трансплантації КМ, походять від випадкового злиття мієлоїдних клітин з гепатоцитами реципієнта [15].

Отже, активну участь у регенерації тканини печінки беруть гемопоетичні клітини мієломоноцитарного ряду за рахунок злиття з гепатоцитами та репрограмування цих диференційованих клітин. Можливо також, що в проведених експериментах відбулася трансдиференціація ГСК в результаті їхнього злиття з диференційованими клітинами печінки.

Механізм зниження плідності химерних гетерокаріонів печінки

Цитогенетичний аналіз клітин печінки самок мишей *Fah*^{-/-} після трансплантації клітин КМ *cKit*⁺ *Lin*^{neg/lo} *Scal*⁺ від самців мишей лінії Rosa26 (*Fah*^{+/+}) показав велику кількість анеуплоїдних клітин. Гіпотетично маркери кожної клітини-партнера, що зливається, повинні залишатися у химерній клітині. Але ретельний аналіз печінки після ТКМ показав невелику кількість ФАН⁺-кластерів, що втратили інші маркери. Також при трансплантації гепатоцитів від первинних реципієнтів КМ кількість негативних клітин по Y-хромосомі зростала від 25–50 % до 90–100 % у вторинних реципієнтів. Для виключення можливості трансдиференціації гемопоетичних клітин в диплоїдні гепатоцити використали репортерну систему *Cre-loxP*, в якій β-галактозидаза експресується лише у гепатоцитах, що утворилися після злиття клітин.

Результати досліджень показали, що поліплоїдні гепатоцити експресують β-gal та ФАН. Як показали цитогенетичні дослідження, диплоїдні гепатоцити також були ФАН⁺ та β-gal⁺. Окремі клітини було протестовано на наявність маркерів донора та реципієнта, і ПЛР аналіз окремих диплоїдних клітин дозволив виявити гетерогенність популяції, що містила маркери як донора, так і реципієнта.

З цього випливає, що у поліплоїдних гепатоцитів, які утворилися після злиття клітин, поступово відбувається зменшення плідності, при цьому утворюється гетерогенна популяція з низькою плідністю.

Цитогенетичний аналіз показав, що 14 % гепатоцитів, які утворилися після злиття з клітинами донора, мають диплоїдний каріотип. Хоча більшість химерних кластерів, що утворилися внаслідок злиття, експресують всі генетичні маркери клітин, 2–5 % не мають Y-хромосоми та не експресують β-gal. Це свідчить про те, що у 4–10 % химерних кластерів спостерігалось зниження плідності клітин. Більшість диплоїдних дочірніх гепатоцитів (87 %) негативні за одним із декількох маркерів, що вказує на гетерогенність популяції. Ці дані вказують на те, що маркерні гени/хромосоми розподіляються незалежно в процесі редукції плідності [16].

В деяких публікаціях йдеться мова про те, що і в нормі гепатоцити можуть зменшувати ступінь плідності. Наприклад, дія гепатотоксичних тіоацетамідів і тетрахлориду вуглецю призводить до різкого зростання диплоїдних гепатоцитів та одночасного зменшення поліплоїдних гепатоцитів через 72 год. Різниця в проліферації та клітинній смерті не спостерігалася серед диплоїдних та поліплоїдних гепатоцитів. Таким чином, не виключено, що поліплоїдні гепатоцити можуть зменшувати плідність, але все ж таки ця гіпотеза потребує експериментальних доказів.

Механізми зменшення плідності можуть бути такими. По-перше, двоядерні клітини можуть легко завершити цитокінез. В нормі гепатоцити-дикаріони можуть утворитися при порушенні цитокінезу. Наприклад, одноядерні диплоїдні гепатоцити діляться мітозом, але дві дочірні клітини не утворюються через порушення розділення цитоплазми, що призводить до двоядерної тетраплоїдної клітини [17]. Можливо, такі дикаріони в подальшому можуть розділитися та генерувати дочірні клітини. По відношенню до химерних тетраплоїдних гепатоцитів завершення цитокінезу призвело б до формування дочірніх клітин з генотипом, ідентичним до клітин – партнерів злиття. Але, як було показано, популяція диплоїдних клітин містить клітини з

маркерами донора (*Fah*) та реципієнта (*Cre i/* або *Y*-хромосому), що вказує на комбінаторну мінливість або рекомбінацію у химерних клітинах. Таким чином, перша гіпотеза зменшення плідності шляхом цитокінезу виключається.

Другий можливий механізм полягає у зменшенні числа хромосом через мультиполярний мітоз, який призводить до випадкового розподілу хромосом між дочірніми клітинами. Химерні гепатоцити мають більшу кількість центромер, що може призвести до формування багатополярного веретена поділу впродовж профази. Мультиполярні мітози збільшують кількість дочірніх клітин з диплоїдним набором хромосом, однак проходження мультиполярного мітозу не може пояснити утворення кластерів химерних гепатоцитів з атипичним хромосомним набором.

Наприклад, триплоїдні гепатоцити з каріотипом в 60 хромосом (*XXY* або *XYY*) становлять 17 % всіх проаналізованих метафаз. Важко уявити, яким чином мультиполярний мітоз у гексаплоїдних гепатоцитах може призвести до утворення триплоїдних клітин. Більш того, якщо зменшення плідності відбувається саме таким шляхом, вірогідність втрати кожної хромосоми дуже низька (для аутосом становить 1/19). Генотипування окремих диплоїдних дочірніх гепатоцитів показало втрату гена *R26R*, що розташований в хромосомі 6, та *Y*-хромосоми у понад 50 % випадків. Високий ступінь сегрегації маркерів вказує на те, що втрата хромосом не випадкова.

Інший механізм, що може пояснити присутність дочірніх гепатоцитів з гаплоїдним набором хромосом, є поділ клітини без реплікації ДНК. Цей механізм зменшення плідності вперше був описаний у москитів *Culex pipiens*, але ніколи раніше – у ссавців [18]. При дії такого механізму химерні гепатоцити проходили б фазу *G1* клітинного циклу, «перескакували» через *S*-фазу та переходили б у фазу *G2* з наступним мітозом. Цей тип поділу може пояснити генерацію як диплоїдних, так і триплоїдних клітин, а також високий ступінь втрати маркерів у диплоїдних клітинах за рахунок парування хромосом.

Зрештою можливий і прямий перенос ДНК шляхом горизонтального трансферу генів (ГТГ)

в диплоїдні гепатоцити (див. нижче). ГТГ серед соматичних клітин включає фагоцитоз апоптичних клітин з наступним захопленням ядра чи окремих хромосом. Ймовірно, явище ГТГ лежить в основі репрограмування гепатоцитів при ксенотрансплантації [19]. Незважаючи на те, що горизонтальне перенесення генних маркерів донора, які розташовані на різних хромосомах, відбувається досить рідко, кількість клітин – носіїв двох маркерів становить близько половини усіх гаплоїдних химерних гепатоцитів. Ці дані суперечать даним стосовно формування химерних кластерів у печінці мишей після трансплантації алогенного КМ [17].

Таким чином, після злиття клітин та утворення дикаріону відбувається злиття ядер. Можливо, на наступному етапі химерна клітина вступає у фазу *M* без проходження синтетичної фази, пов'язаної з подвоєнням ДНК. Незалежний розподіл хромосом на стадії телофази мітозу призводить до утворення дочірніх клітин з химеризмом хромосомного набору.

Дослідження особливостей злиття донорських стовбурових клітин з кардіоміоцитами на моделі клітинної кардіоміопластики

В роботах Matsuura et al. [20] показано, що в умовах *in vitro* кардіоміоцити зливаються з клітинами різних типів, а саме з ендотеліальними клітинами (HUVEC), фібробластами серця (сFB), стромальними клітинами кісткового мозку, скелетними м'язами та ендотеліальними прогеніторними клітинами (ЕПК). В химерних клітинах, що утворилися при злитті кардіоміоцитів з HUVEC чи сFB, фенотип серцевих клітин залишався домінуючим. Крім скорочувальних білків, химерні клітини понад 7 днів експресували кардіоспецифічний білок секретин (ANF) та кардіоспецифічний фактор транскрипції (GATA4). В деяких химерних клітинах також відновлювався клітинний цикл та з'являлися ознаки мітозу (експресія фосфогістону H3, цикліну B1), що вказувало на перехід клітин до стадії *M* клітинного циклу [20].

В основі відсутності мітотичної активності дорослих кардіоміоцитів лежить пригнічення

білком p21 експресії PCNA в S-фазі клітинного циклу [21]. Цитостатична дія екстракту дорослих кардіоміоцитів блокується в присутності значної кількості цитоплазми клітин на стадії S-фази клітинного циклу. Отже, виходячи з того, що кардіоміоцити зливаються з клітинами, які знаходяться в стадіях G2–M клітинного циклу, можна припустити, що цитоплазматичні фактори клітин-партнерів знімають блокування мітозів в химерних гетерокаріонах.

Для виявлення донорських клітин в організмі реципієнта були використані генетично модифіковані лінії тварин. Клітини донора експресують зелений флуоресцентний білок та Cre-рекомбіназу, клітини організму реципієнта несуть ген хлорамфенікол ацетилтрансферази *cat*, фланкований послідовностями *loxP* та розміщений між CAG промотором та геном *LacZ*. Використання таких ліній тварин дає можливість знайти поодинокі химерні клітини в серці реципієнта.

Перед проведенням трансплантації здійснювали кріопшкодження серцевого м'язу реципієнтів. Після введення трансгенних HUVES в організм реципієнта на межі зони пошкодження було виявлено клітини, що експресували маркери кардіоміоцитів та ендотеліальних клітин. При спільному культивуванні HUVES з кардіоміоцитами деякі клітини транзитивно експресували vWF та серцеві саркомерні білки. Всі HUVES з фенотипом cTnT⁺ експресували β-gal, що свідчить про злиття трансплантованих ендотеліальних клітин з кардіоміоцитами і утворення гібридних клітин в міокарді. Потрібно зазначити, що лише кардіоміоцити з фенотипом cTnT⁺ vWF⁺ експресували Ki67, тобто після злиття клітин відбувається відновлення проліферації гетерокаріону в умовах *in vitro* та *in vivo*. Однак ці експерименти не виключають трансдиференціації ендотеліальних клітин в кардіоміоцити.

Відомо, що ЕПК та мезенхімальні стовбурові клітини кісткового мозку експресують кардіоспецифічні білки після злиття з кардіоміоцитами при спільному культивуванні. Більш того, автори припускають таку можливість, що МСК та ЕПК, які циркулюють в крові, диференціюються в ендотеліаль-

ні клітини, що потім зливаються з кардіоміоцитами [20].

Нещодавні дослідження показали, що трансплантовані стовбурові клітини кісткового мозку мають широкий потенціал трансдиференціації та здатні до утворення нових кардіоміоцитів. В роботі групи Garbade et al. [22] описано злиття МСК з кардіоміоцитами. МСК отримували з КМ груднини. Після обробки культури МСК 5-азидоцитидином клітини фарбували Vybrant/DiO. Кардіоміоцити одержували із сердець неонатальних щурів та фарбували Vybrant/DiI.

Після внесення МСК до кардіоміоцитів культуру клітин досліджували на присутність клітин з фенотипом DiO⁺/DiI⁺. Між МСК та кардіоміоцитами утворювались прямі міжклітинні контакти та було виявлено поодинокі химерні клітини з фенотипом DiO⁺/DiI⁺. Популяція таких клітин з 1-го по 4-й день культивування зростала до 18 % та дещо знижувалась на 28-й день. Виявлені також дві різні популяції клітин, які експресували мРНК β-МНС, а саме химерні клітини синтезували людську та щурячу мРНК β-МНС, тоді як інші – лише мРНК β-МНС людини. Ці дані свідчать про те, що при спільному культивуванні можливі два процеси, один – трансдиференціювання, другий – злиття МСК з кардіоміоцитами [22].

Отже, підсумовуючи описані дані, можна зробити висновок, що стовбурові клітини можуть зливатися з диференційованими клітинами, відновлюючи їхній клітинний цикл та проліферативний потенціал. Це лежить в основі репаративної регенерації пошкоджених тканин.

Роль щілинних та тунельних нанотрубчастих контактів між стовбуровими клітинами та клітинами-мішенями в регенерації тканини

Щілинні контакти є основним типом взаємодії кардіоміоцитів у міокарді. За рахунок щілинних контактів міоцити утворюють єдину електрично спряжену сітку серця, порушення якої призводить до розвитку аритмій та фібриляції. Погіршення провідності в міокарді є основним наслідком ішемічного пошкодження й утворення рубцевої тканини після інфаркту. Таким чином, відновлення провід-

ності між кардіоміоцитами є головною метою регенеративної клітинної терапії.

Основним структурним білком щільних контактів в міокарді є конексин 43 (Cx43). Підвищення експресії Cx43 знижує аритмію в системі, яка виникла після трансплантації скелетних м'якостей у міокард. Конексин 43 підсилює міжклітинну комунікацію між м'якостями і дорослими шуриними кардіоміоцитами за рахунок зростання кількості щільних контактів і підвищення провідності між клітинами [23].

Здатність МСК формувати щільні контакти за участі Cx43 і Cx40 між собою та іншими клітинами при спільному культивуванні показана в роботі Valiunas et al. [24]. МСК людини та кардіоміоцити собаки при спільному культивуванні формують гетеромерні канали (Cx43 та Cx40), які забезпечують достатнє електрофізіологічне спраження клітин. Більш того, МСК людини здатні відновлювати провідність між двома окремими полями кардіоміоцитів в культурі. В моношарі неонатальних кардіоміоцитів шура, які фізично розділені на два поля і скорочуються асинхронно, при додаванні МСК відновлювалася електрична провідність, і скорочення синхронізувалися. При цьому через МСК відбувалася передача імпульсу за рахунок іонних струмів через конексинові канали.

В роботі групи Gallo et al. [25] показано, що між МСК та кардіоміоцитами проходять потенціал-залежні кальцієві сигнали, але МСК не скорочуються. Таким чином, утворення щільних контактів та виникнення електропровідності між кардіоміоцитами та стовбуровими клітинами підтверджено багатьма дослідниками.

Для вивчення міжклітинної комунікації ендотеліальних прогеніторних клітин з кардіоміоцитами провели їхнє спільне культивування з неонатальними кардіоміоцитами, які були трансформовані аденовірусною ДНК, що містить ген *gfp*. ЕПК мітили за допомогою Dil-ac-LDL за 30 хв до культивування з *gfp*-трансформованими кардіоміоцитами. Через 6 год після початку культивування спостерігали утворення ультратонких міжклітинних структур між ЕПК та кардіоміоцитами. Ці структури фарбувалися пшеничним аглютиніном та були виявлені між ЕПК та нетранс-

формованими кардіоміоцитами. Кількість ЕПК, що утворили нанотрубчасті зв'язки з кардіоміоцитами після 6 год культивування, зростала з $0,5 \pm 0,2$ до $2,6 \pm 0,3$ %. Нанотрубчасті структури утворювалися лише тимчасово, та їхня кількість зменшувалася після 48 год спільного культивування. Такі міжклітинні зв'язки завширшки 50–800 нм та завдовжки від 5 до 120 мкм інколи мають гіллясту будову.

Потрібно зазначити, що ці структури чутливі до стресів, а на стадії формування – до дії світла. Покачування культурального посуду пошкоджує міжклітинні зв'язки. Через 6 днів культивування аналіз культури клітин методом проточної цитофлуориметрії показав, що $2,1 \pm 0,4$ % клітин були $GFP^+ Dil-ac-LDL^+$. Слабке покачування культури протягом культивування значно зменшувало кількість $GFP^+ Dil-ac-LDL^+$ клітин. Цитологічний аналіз показав, що більшість $GFP^+ Dil-ac-LDL^+$ клітин ($92,9 \pm 7,1$ %) мали одне ядро [26].

Для вивчення можливого транспортування органел по нанотрубчастих структурах кардіоміоцити мітили зеленим барвником MitoTracker. Через 30 хв після мічення їх промивали та вносили до культури ЕПК, які містили флуоресцентний барвник Dil-ac-LDL. Через 6–24 год нанотрубчасті структури були виявлені між MitoTracker-позитивними кардіоміоцитами та Dil-ac-LDL⁺ ЕПК. При цейтраферній мікроскопії спостерігався рух фарбованого комплексу між кардіоміоцитами та ЕПК, що призводило до появи цих цитоплазматичних комплексів у ЕПК. Однак транспорт мітохондрій з ЕПК до кардіоміоцитів не був виявлений [26].

Відомо, що МСК здатні запобігати постішемичним змінам кардіоміобластів. Такий ефект пов'язаний не тільки з покращенням неоваскуляризації та заміною померлих клітин, але й з відновленням пошкоджених клітин. Найбільш вірогідним механізмом терапевтичного впливу МСК на культуру пошкоджених кардіоміобластів H9c2 є репарація клітинної структури, що спричиняє блокування клітинної загибелі. Спільне культивування МСК із кардіоміобластами після киснево-глюкозного голодування (КГГ) призводить до зростання життєздатності клітин в 10 разів [27].

Використання моделі ішемії *in vitro* показало, що такий позитивний ефект МСК пов'язаний з утворенням прямих міжклітинних контактів. При внесенні МСК до кардіоміобластів після КГГ морфологія цих клітин не змінилася, але виживання зросло. При спільному культивуванні МСК у двокамерних культуральних чашках життєздатність клітин H9c2 не підвищувалась, що вказує на важливість утворення міжклітинних контактів [27].

Тунельні нанотрубчасті контакти беруть участь у перенесенні мітохондрій та лізосом від МСК до кардіоміоцитів. Через 24 год культивування МСК з кардіоміоцитами виявлено химерні кардіоміоцити з мітохондріями МСК. Цікаво зазначити, що в змішаній культурі клітин не були виявлені МСК, які містили б мітохондрії від кардіоміоцитів, що свідчить про транспорт мітохондрій лише від МСК до кардіоміоцитів. Електронна мікроскопія показала, що цитоплазматичні вирости часто містять двохмембранні везикулярні структури, які за морфологією схожі на мітохондрії. Інколи в цих структурах можна побачити кристи. Часто в нанотрубочках маленького діаметра ($\approx 0,1$ мкм) візуалізували одномембранні везикули. Деякі нанотрубочки містили елементи цитоскелету. Нанотрубчасті міжклітинні контакти виявили серед ЕПК, кардіоміоцитів, імунних клітин тощо [28].

Таким чином, нещодавні дослідження показали, що МСК інтегруються в структуру сформованої диференційованої тканини, утворюючи при цьому щільні та нанотрубчасті міжклітинні контакти з клітинами-резидентами. Обмін цитоплазмою, органелами та утворення єдиного електрофізіологічного поля (пропускання іонних токів) свідчать про те, що МСК функціонально поєднуються з диференційованими клітинами без проходження ними диференціювання.

V.A. Shablii, L.L. Lukash, G.S. Lobintseva

THE ROLE OF SOME INTERACTIONS OF CELLS OF DONOR AND HOST UNDER THE INFLUENCE OF THE MICROENVIRONMENT IN REGENERATION PROCESS

The review is devoted to the analysis of experimental data about possible mechanisms of transdifferentiation or plasticity of tissue specific stem cells.

Considerable attention is focused on the mechanisms and genetic consequences of fusion of different types of donor cells with the cells of recipient tissues which investigated on the models of cellular therapy of liver and heart diseases. The role of various kinds of cell contacts and their role in stem cells integration, repair and regeneration of injured tissue and horizontal genes transfer are considered.

V.A. Shablii, L.L. Lukash, G.S. Lobintseva

РОЛЬ НЕКОТОРЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ ДОНОРСКИХ И РЕЦИПИЕНТНЫХ КЛЕТОК ПОД ВЛИЯНИЕМ МИКРООКРУЖЕНИЯ В ПРОЦЕССАХ РЕГЕНЕРАЦИИ

Литературный обзор посвящен анализу экспериментальных данных о механизмах, которые лежат в основе трансдифференцировки или пластичности тканеспецифических стволовых клеток. Основное внимание уделено механизмам и генетическим последствиям слияния разных типов донорских клеток с клетками тканей реципиента, которые исследовали на моделях клеточной терапии заболеваний печени и сердца. Рассмотрена роль межклеточных контактов разного типа и горизонтальной передачи клеточного материала в процессе регенерации сердечной ткани.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. *Репин В.С., Сухих Г.Т.* Медицинская клеточная биология. – М.: Изд-во «БЭБиМ», 1998. – 199 с.
2. *Ferrari G., Cusella-De Angelis, Coletta G. et al.* Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors // *Science*. – 1998. – **279**. – P. 1528–1530.
3. *Korbling M., Estrov Z.* Adult stem cells for tissue repair – a new therapeutic concept? // *N. Engl. J. Med.* – 2003. – **349**. – P. 570–582.
4. *Petersen B.E., Bowen W.C., Patrene K.D. et al.* Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells // *Science*. – 1999. – **284**. – P. 1168–1170.
5. *Theise N.D., Badve S., Saxena R. et al.* Derivation of hepatocytes from bone marrow cells in mice after radiation-induced myeloablation // *Hepatology*. – 2000. – **31**. – P. 235–240.
6. *Lagasse E., Connors H., Al-Dhalimy M., Reitsma M. et al.* Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo // *Nat. Med.* – 2000. – **6**. – P. 1229–1234.
7. *Brezillon N., Kremsdorf D., Weiss C., et al.* Cell therapy for the diseased liver: from stem cell biology to novel models for hepatotropic human pathogens // *Dis Model Mech.* – 2008. – **1**, № 2/3. – P. 113–130.
8. *Van de Ven C., Collins D., Bradley M.B., Morris E., Cairo M.S.* The potential of umbilical cord

- blood multipotent stem cells for nonhematopoietic tissue and cell regeneration // *Exp. Hematol.* — 2007. — **35**. — P. 1753–1765.
9. *Campfi D., Piscaglia C., Rutella A.C. et al.* Improvement of mortality rate and decrease in histologic hepatic injury after human cord blood stem cell infusion in a murine model of hepatotoxicity // *Transplant. Proc.* — 2005. — **37**. — P. 2707–2710.
 10. *Nonome K., Li X.K., Takahara T. et al.* Human umbilical cord blood-derived cells differentiate into hepatocyte-like cells in the Fas-mediated liver injury model // *Amer. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* — 2005. — **289**. — P. 1091–1099.
 11. *Qian H., Wang J., Wang S. et al.* In utero transplantation of human hematopoietic stem/progenitor cells partially repairs injured liver in mice // *Int. J. Mol. Med.* — 2006. — **18**. — P. 633–642.
 12. *Zeng F., Chen M.J., Baldwin D.A. et al.* Multiorgan engraftment and differentiation of human cord blood CD34⁺ Lin⁻ cells in goats assessed by gene expression profiling // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* — 2006. — **103**. — P. 7801–7806.
 13. *Fujimiya M., Kojima H., Ichinose M. et al.* Fusion of proinsulin-producing bone marrow-derived cells with hepatocytes in diabetes // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* — 2007. — **104**, № 10. — P. 4030–4035.
 14. *Weimann J.M., Charlton C.A., Brazelton T.R. et al.* Contribution of transplanted bone marrow cells to Purkinje neurons in human adult brains // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* — 2003. — **100**, № 4 — P. 2088–2093.
 15. *Camargo F.D., Finegold M., Goodell M.A.* Hematopoietic myelomonocytic cells are the major source of hepatocyte fusion partners // *J. Clin. Invest.* — 2004. — **113**, № 9. — P. 1266–1270.
 16. *Duncan A.W., Hickey R.D., Paulk N.K. et al.* Ploidy reductions in murine fusion-derived hepatocytes // *PLoS Genet.* — 2009. — **5**, № 2. — P. 1–11.
 17. *Guidotti J.E., Bregerie O., Robert A. et al.* Liver cell polyploidization: a pivotal role for binuclear hepatocytes // *J. Biol. Chem.* — 2003. — **278**. — P. 19095–19101.
 18. *Berger C.A.* Multiplication and reduction of somatic chromosome groups as a regular developmental process in the mosquito, *Culex pipiens* // *Contributions to embryology.* — Carnegie Institution of Washington, 1938. — P. 210–233.
 19. *Brulport M., Schormann W., Bauer A. et al.* Fate of extrahepatic human stem and precursor cells after transplantation into mouse livers // *Hepatology.* — 2007. — **46**. — P. 861–870.
 20. *Matsuura K., Wada H., Nagai T. et al.* Cardiomyocytes fuse with surrounding noncardiomyocytes and reenter the cell cycle. — 2004. — **167**, № 2. — P. 351–363.
 21. *Engel F.B., Hauck L., Boehm M., Nabel E.G. et al.* p21CIP1 controls proliferating cell nuclear antigen level in adult cardiomyocytes // *Mol. Cell. Biol.* — 2003. — **23**. — P. 555–565.
 22. *Garbade J., Schubert A., Rastan A.J. et al.* Fusion of bone marrow-derived stem cells with cardiomyocytes in a heterologous in vitro model // *Eur. J. Cardiothorac Surg.* — 2005. — **28**. — P. 685–691.
 23. *Stagg M.A., Coppen S.R., Suzuki K. et al.* Evaluation of frequency, type, and function of gap junctions between skeletal myoblasts overexpressing connexin43 and cardiomyocytes: relevance to cell transplantation // *FASEB J.* — 2006. — **20**. — P. 744–746.
 24. *Valiunas V., Doronin S., Valiuniene L. et al.* Human mesenchymal stem cells make cardiac connexins and form functional gap junctions // *J. Physiol.* — 2004. — **555**. — P. 617–626.
 25. *Gallo M.P., Ramella R., Alloati G. et al.* Limited plasticity of mesenchymal stem cells cocultured with adult cardiomyocytes // *J. Cell. Biochem.* — 2007. — **100**. — P. 86–99.
 26. *Koyanagi M., Brandes R.P., Haendeler J. et al.* Cell-to-cell connection of endothelial progenitor cells with cardiac myocytes by nanotubes: a novel mechanism for cell fate changes? // *Circ. Res.* — 2005. — **96**. — P. 1039–1041.
 27. *Cselenyk A., Pankotai E., Horvth E.M. et al.* Mesenchymal stem cells rescue cardiomyoblasts from cell death in an in vitro ischemia model via direct cell-to-cell connections // *BMC Cell Biol.* — 2010. — **11**, № 29. — P. 1–11.
 28. *Плотников Е.Ю., Хряпенкова Т.Г., Марей М.В., Сухих Г.Т., Зоров Д.Б.* Взаимодействие стволовых и дифференцированных соматических клеток при совместном культивировании // *Цитология.* — 2008. — **50**, № 9. — С. 817–819.

Надійшла 17.02.11