

УДК 57.083.3; 611.018.7; 611.08

Реконструкция эпителия уретры кролика с помощью кератиноцитов кожи

О. С. Роговая^{1,2*}, А. К. Файзулин³, А. В. Васильев¹, А. В. Кононов⁴, В. В. Терских¹¹Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, 119334, Москва, ул. Вавилова, 26²Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова Минздрава России, 117997, Москва, ул. Островитянова, 1³Морозовская детская городская клиническая больница Департамента здравоохранения города Москвы, 119049, Москва, 4-й Добрынинский пер., 1/9⁴Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И. Евдокимова Минздрава России, 127473, г. Москва, ул. Делегатская, 20, стр.1

*E-mail: Rogovaya26f@gmail.com

Поступила в редакцию 24.06.2014

РЕФЕРАТ Живой эквивалент кожи (ЖЭК) исследован в качестве альтернативного источника пластического материала для закрытия полнослойных эпителиостромальных повреждений уретры. На примере восстановления уретры лабораторных кроликов изучена возможность трансдифференцировки эпидермальных кератиноцитов в составе трехмерных тканевых конструкций в модели *in vivo*. Результаты серии аутологичных трансплантаций живого эквивалента кожи в деэпителизованную уретру показали, что кератиноциты кожи, помещенные в специфичное микроокружение *in vivo*, способны встраиваться в место дефекта и выполнять функции уротелия. Для трансплантации использовали кератиноциты, трансфицированные EGFP, что позволило идентифицировать пересаженные клетки. Реконструировано строение уретральной трубки без образования стриктур и свищей в месте трансплантации живого эквивалента кожи. Иммуногистохимически в структуре неоуретры выявлены EGFP-положительные клетки, экспрессирующие маркеры уротелия (K7 и UP3).

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА кератиноциты, пластичность эпителия, стволовые клетки эпидермиса, трансдифференцировка, тканевая инженерия, уротелий.

ВВЕДЕНИЕ

Складывающаяся сегодня концепция клеточных механизмов регенерации предполагает, что характер и механизмы регенерации определяются типами вовлеченных в процесс тканеспецифичных стволовых и ранних прогениторных клеток [1–3]. К настоящему моменту накопилось значительное количество данных, согласно которым в определенных условиях тканеспецифичные стволовые клетки могут проявлять значительную фенотипическую пластичность, что позволяет говорить о возможности трансдифференцировки этих клеток. Сегодня феномен трансдифференцировки показан в некоторых моделях, в том числе и в моделях восстановления эпителиальных тканей рога, мочевого пузыря, кишечника и др. [4, 5]. Мы предполагаем, что феномен пластичности может быть использован в тканевой инженерии и клеточных технологиях как подход к получению клеток и клеточных конструкций, необходимых для восстановления структур и/или функций тка-

ней и органов. Развитие данного направления регенеративной медицины позволит решить такую актуальную проблему, как дефицит собственных тканей пациента, который на сегодняшний день считается причиной значительного количества неудач реконструктивных операций [6, 7]. Не менее значима и проблема разработки гистотипических тканевых конструкций *in vitro*, пригодных для моделирования морфогенетических процессов, в том числе и с участием стволовых тканеспецифичных клеток [8–11].

Помимо прямого встраивания в структуру поврежденной ткани возможно и индукционное участие стволовых клеток и клеточных конструкций в процессах регенерации и репарации [12, 13]. Такое индуцирующее влияние может быть различным по интенсивности и специфичности. Именно индукционным влиянием можно объяснить восстановление тканей после трансплантаций аллогенных тканеинженерных гистотипических конструкций, содержащих стволовые/прогениторные клетки.

С учетом изложенного в представленной работе изучена возможность использования живого эквивалента кожи в качестве альтернативного источника пластического материала для закрытия полнослойных эпителиостромальных повреждений уретры. На примере восстановления уретры лабораторных кроликов исследована возможность трансдифференцировки эпидермальных кератиноцитов в составе трехмерных тканевых конструкций в модели *in vivo*.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Эксперименты проводили на 20 самцах кроликов породы шиншилла весом не более 2 кг. Все процедуры проводили согласно правилам, установленным комиссией по биоэтике ИБР РАН. При работе с животными руководствовались приказом Минздрава РФ от 19.06.2003 № 267 «Об утверждении Правил лабораторной практики». В экспериментальной группе было 14 животных, в контрольной – шесть.

Выделение и культивирование кератиноцитов кролика

Всем подопытным животным перед началом эксперимента присваивали порядковый номер. Бирку с номером прикрепляли к клетке, в которой на протяжении всей работы содержали кролика. Номер вносили в лабораторный журнал, и в дальнейшем присваивали его полученной из этого кролика культуре кератиноцитов.

При первой операции у животных производили забор кожи с внутренней стороны уха, причем толщина биоптата составляла около 0,3 мм.

Сразу после отделения лоскут кожи помещали в среду M199 с 10-кратным содержанием 0,4 мг/мл гентамицина. В случае необходимости кусочки кожи хранили в течение 24 ч при +4°C. Всю работу проводили в стерильных условиях. Перед процедурой хранения образцы кожи тщательно промывали в растворе Хенкса и помещали в среду M199 или Игла с антибиотиками. Перед выделением клеток биоптаты промывали раствором Хенкса с гентамицином (0,4 мг/мл) или 2000 ед./мл пенициллина и 1 мг/мл стрептомицина. Лоскуты кожи разрезали на полоски шириной 3 × 10 мм, промывали PBS, помещали в 0,125% раствор диспазы (Sigma) и инкубировали при 4°C в течение 16–24 ч или в 2% растворе диспазы в течение 1 ч при 37°C. После этого эпидермис пинцетом отделяли от дермы по линии базальной пластинки. Кусочки эпидермиса, отделенные от подлежащей дермы, промывали в PBS и помещали в раствор PBS + 0,25% трипсин (1 : 1). Инкубировали при 36°C в течение 10–15 мин, после чего трипсин ингибировали раствором сыворотки крупного рогатого скота или лошадиной и пипетированием получали суспен-

зию эпидермальных кератиноцитов кролика, которую фильтровали через 100-мкм нейлоновое сито и осаждали центрифугированием при 100 g в течение 10 мин. Затем супернатант сливали и суспендировали осадок в среде для культивирования кератиноцитов. Высеивали суспензию кератиноцитов в пластиковые культуральные флаконы Costar, предварительно сорбированные раствором коллагена, в концентрации 200000 клеток/мл.

Для сорбции поверхности культуральных флаконов использовали жидкий (0,1 мг/мл) раствор коллагена типа 1 в 0,1% уксусной кислоте. Процедуру проводили следующим образом: на дно флакона площадью 25 см² наливали 2–3 мл раствора коллагена и оставляли при 37°C на 20 мин, после чего коллаген сливали и тщательно промывали флакон раствором Хенкса с феноловым красным до исчезновения кислой реакции.

Первые 3 сут кератиноциты кролика культивировали в среде DMEM/F-12 (2 : 1) с 10% эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС), 5 мкг/мл инсулина (Sigma), 10⁻⁶ М изопротеренола (Sigma), 5 мкг/мл трансферрина (Sigma). После этого культуру клеток переводили на среду DMEM/F-12 (2 : 1) с 5% ЭТС, 10 нг/мл эпидермального фактора роста (ЭФР) с суммой остальных добавок (см. выше) и культивировали при регулярной смене среды в CO₂-инкубаторе.

Дестратификация пластов культуры кератиноцитов

Дестратификацию (стриппинг) культуры кератиноцитов производили после формирования клетками многослойного пласта, для чего заменяли среду в культуральных флаконах средой КВЕ без Ca²⁺ и оставляли на 1–3 сут до полного отслоения всех слоев клеток, кроме базального. После проведения стриппинга культуру кератиноцитов переводили на нормальную среду для культивирования и спустя 1 сут пересевали на поверхность живого дермального эквивалента. Пересевали кератиноциты, снимая их с поверхности культуральных флаконов, при помощи раствора трипсина/ Версена (1 : 1).

Приготовление живого эквивалента кожи на основе аутологичных кератиноцитов и фибробластов кролика для трансплантации в дефект уретры

В стерильных условиях вскрывали упаковку губки Spongostan, ножницами вырезали кусок, по размеру и форме соответствующий размеру чашки Петри, и однократно промывали его раствором Хенкса. Затем готовили коллагеновый гель с постнатальными фибробластами кролика или человека в концентрации 25–30 тысяч клеток /мл геля, как описано выше,

и заливали в чашки Петри со спонгостаном. На чашку Петри Ø 3.5 см вливали 1.5 мл геля.

Фибробласты в коллагеновом геле культивировали на поверхности губки в течение 1 сут в CO₂-инкубаторе. Затем, используя данную конструкцию как эквивалент соединительной ткани, готовили живой эквивалент кожи с фибробластами в коллагеновом геле и кератиноцитами кожи кролика на его поверхности по стандартному протоколу, описанному выше. Чтобы соблюсти принцип аутологичной трансплантации в дальнейшем на всех этапах на посуду с культурой кератиноцитов и с живым эквивалентом кожи наклеивали этикетку с номером, присвоенным подопытному животному.

Мечение клеток трейсером

На начальном этапе работы для мечения аутологичных кератиноцитов использовали 0.00001% раствор мембранного трейсера DiI в культуральной среде без сыворотки, в котором в течение 1 ч инкубировали готовые к трансплантации клетки.

Лентивирусная трансфекция культуры кератиноцитов

Трансфекцию клеток улучшенным флуоресцентным зеленым белком (EGFP) проводили с использованием лентивирусной конструкции производства «Евроген» (вирус поставляется в среде DMEM в количестве 1.5×10^6 вирусных частиц/мл). Трансфекцию проводили, внося рекомендованное производителем количество – 10 копий вируса на 1 клетку.

Для проведения трансфекции 1.5×10^5 кератиноцитов высевали в чашку Петри (Ø 3.5 см), после полного прикрепления клеток питательную среду в чашке заменяли на среду DMEM, содержащую вирус. Одновременно для повышения проницаемости клеточной мембраны добавляли полибрен в концентрации 5 мг/мл и инкубировали таким образом в течение 1 сут. После трансфекции клетки переводили на стандартную среду культивирования. Через 72 ч наблюдали экспрессию EGFP.

ГИСТОЛОГИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Приготовление парафиновых срезов

В качестве фиксатора использовали 4% параформальдегид на PBS (рН 7.4). Ткань фиксировали в течение 1 сут, затем промывали PBS. Ткань обезживали, проводя ее через серию спиртов по стандартному протоколу. Дальнейшую гистологическую проводку осуществляли с использованием ксилола. Далее образцы помещали в парафин. Срезы из парафиновых блоков изготавливали с использованием микротомы MICROM фирмы Carl Zeiss. Готовили се-

рийные парафиновые срезы толщиной 5 мкм, которые наносили на стекла. После депарафинирования срезы окрашивали гематоксилином и эозином.

Приготовление криосрезов

Кусочки ткани размером не более 0.5×1.0 см фиксировали в течение 1 ч при комнатной температуре в 4% растворе параформальдегида, промывали материал PBS и помещали в 20% раствор сахарозы для пропитки на 8–12 ч до полного погружения. Подготовленный таким образом материал замораживали в парах азота и хранили при -70°C . Срезы толщиной 15–20 мкм получали на криостате Leica DM IL (ФРГ).

Иммуногистохимические исследования препаратов

Экспрессию различных белков определяли с использованием моноклональных антител для выявления кератинов кожи K14 и уротелия K7 и K18 (NovoCastra), UP3 (UsBioLogical) и EGFP («Евроген»). Использовали иммунофлуоресцентный метод выявления антигенов.

При иммунофлуоресцентном методе применяли следующий протокол окраски: первичные антитела разводили на блокирующем растворе (5% бычьего сывороточного альбумина + 0.1% тритона X-100 на PBS) в концентрациях, рекомендованных производителями антител, и наносили на промытые 0.1% раствором PBS срезы. Инкубацию проводили в течение 12–16 ч при $+4^\circ\text{C}$. После этого 4–5 раз промывали материал в 0.1% PBS и инкубировали в растворе вторых антител Alexa-488 (Molecular probes) в PBS в течение 40 мин в темноте при комнатной температуре. Для приготовления временных препаратов образцы заключали в глицерин.

Методика реконструкции экспериментального дефекта уретры кролика

Операцию проводили под общей анестезией по методу, описанному выше. Параллельно использовали новокаиновую блокаду полового члена, вводя по 0.5 мл новокаина в область оперативного вмешательства. Операцию начинали с окаймляющего разреза вокруг головки полового члена с переходом на продольный разрез кожи по вентральной поверхности полового члена до его основания. Кожу ствола полового члена мобилизовали до основания, рассекали мышцу по вентральной стороне до просвета уретры. После этого при помощи пинцетов отделяли эпителиальную выстилку уретры по базальной мембране на протяжении 1–1.5 см до предстательного отдела в основании полового члена кролика. Живой эквивалент кожи на коллагеновой основе прямоугольной формы, равный по длине дефекту уретральной трубки, а по

ширине – длине окружности создаваемой уретры, сшивали в трубку (рис. 1). Далее на катетере накладывали анастомоз проксимального отдела уретры с остатками уротелия, сшивая его с полученной трубкой, которую располагали в дистальном деэпителизованном отделе уретры методом «конец в конец» и с вершиной головки полового члена. В заключение ушивали раневой дефект местными тканями. Уретральный катетер № 8 Ch подшивали к коже головки полового члена атравматической нитью PDS 5/0. Операция завершалась наложением компрессионной повязки с глицерином. На 7-е сут удаляли уретральный катетер.

Реактивы и растворы, использованные в работе

Среда M199^{x10}, среда DMEM /F-12, раствор Хенкса, раствор Версена, PBS (ООО «ПанЭко»), эмбриональная сыворотка крупного рогатого скота (HyClon США); эпидермальный фактор роста (ЭФР) (Sigma), инсулин (Sigma), изопротеренол (Sigma), гидрокортизон (Sigma), трансферрин (ООО «ПанЭко»), HEPES (Sigma), антибиотики: гентамицин, пенициллин, стрептомицин («Ферейн», Москва), мембранный трейсер DiI Red (Sigma), лентивирусная конструкция с *e-gfp* (ООО «Евроген», Москва); раствор трипсина (ООО «Биолот», Санкт-Петербург), диспаза (Sigma); культуральная пластиковая посуда (Costar, США), губка медицинская желатиновая Spongostan (Johnson & Johnson, США). Микроскопирование проводили на инвертированном микроскопе Leica DM IL (ФРГ) и микроскопе проводящего света Kaуensa (Япония).

Специфические антитела к кератинам клеток базального слоя эпидермиса K14 и дифференцировочным маркерам уротелия K7 и K18 (NovoCastra) и уроплакин 3 (UP3) (UsBioLogical).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В связи с изучением пластичности кератиноцитов живые эквиваленты кожи (ЖЭК) трансплантировали в деэпителизованную уретру лабораторным кроликам, а затем анализировали их поведение в новом микроокружении. Одно из основных условий возможности встраивания трансплантата в область повреждения – отсутствие реакции «трансплантат против хозяина», что и определило выбор для пересадки аутологичных клеток кожи.

На первом этапе работы была разработана модель трансплантации ЖЭК в деэпителизованную уретру кролика (см. «Экспериментальную часть»). Через 3 недели после трансплантации животные, перенесшие операцию, были способны к самостоятельному мочеиспусканию, что свидетельствует о восстановлении функции уротелия.

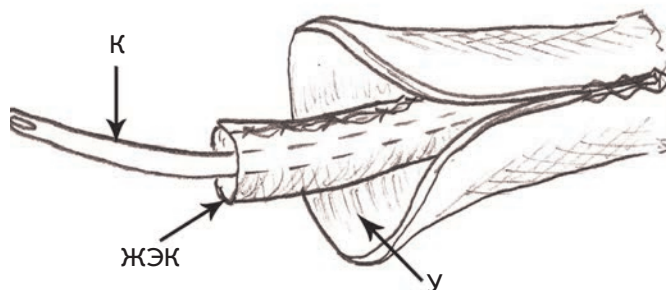


Рис. 1. Схема трансплантации живого эквивалента кожи (ЖЭК) в деэпителизованную уретру (У). К – мочеотводящий катетер

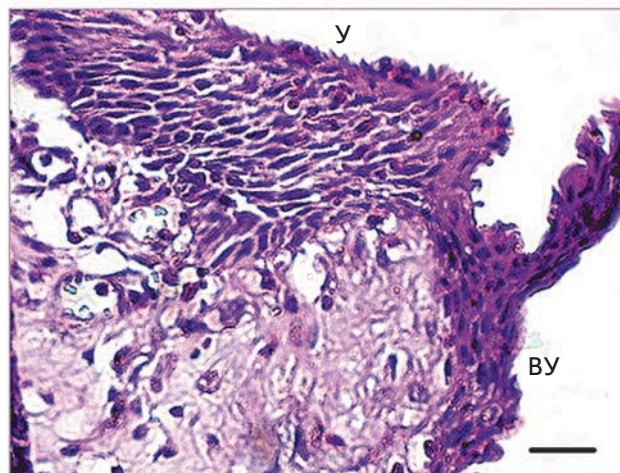


Рис. 2. Поперечный срез восстановленного участка уретры кролика, 21 сут после трансплантации. Место анастомоза участков собственной уретры (У) (верхний отдел) и восстановленной уретры (ВУ). Окраска гематоксилином-эозином, размер линейки 20 мкм

Эпителий восстановленной уретры значительно отличался от нормального уротелия: по своей морфологии он соответствовал плоскому многослойному эпителию (рис. 2). Данный факт можно объяснить тем, что в качестве источника кератиноцитов для создания живого эквивалента кожи использовали эпителий кожи уха кролика, при этом неопителий выполнял функции уротелия (свободное мочеиспускание, отсутствие свищей). В связи с тем, что цель первого эксперимента состояла в принци-

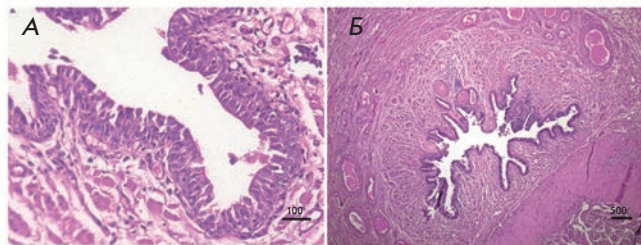


Рис. 3. Поперечный срез восстановленной уретры кролика через 45 сут после трансплантации, окраска гематоксилином-эозином (участок восстановленный уретры (А), восстановленная уретра, поперечный срез, общий вид при $\times 40$ (Б))

пиальной отработке технологии подготовки трансплантата и методики операции, за поведением трансплантата наблюдали в течение 21 сут.

В дальнейшем мы использовали для трансплантаций живой эквивалент кожи с мечеными кератиноцитами, которые можно было выявлять в уретре. Эксперименты проведены на 17 половозрелых кроликах (6–12 месяцев). В качестве контроля использовали две группы животных: одна группа состояла из трех животных с деэпителизированной уретрой без трансплантации живого эквивалента кожи, вторая – из трех животных, которым в качестве трансплантата пересаживали желатиновую губку спонгостан без клеток. Подопытная группа состояла из 11 животных, которым трансплантировали живой эквивалент кожи с мечеными клетками. У всех животных контрольных групп в течение 2 недель после операции наблюдались осложнения в виде свищей и сильная воспалительная реакция. После удаления катетера, четыре из шести контрольных животных не были способны к самостоятельному мочеиспусканию. В связи с этим животные контрольной группы были усыплены в течение 2 недель после начала эксперимента. Все кролики подопытной группы были способны к самостоятельному мочеиспусканию уже спустя 4–7 дней после трансплантации живого эквивалента кожи. Стриктур и сужений уретральной трубки не выявлено.

Перед трансплантацией аутологичные клетки метили мембранным трейсером DiI. Полученную конструкцию имплантировали на место созданного уретрального дефекта семи подопытным кроликам. Результат оценивали через 14, 30, 45 сут и 3 месяца после имплантации.

Через 14 сут после имплантации живого эквивалента кожи уретерий у животных не был полностью восстановлен. Выявлены небольшие участки эпителизации и скопления клеток, содержащих метку DiI и положительных по K14 – маркеру базальных кера-

тиноцитов эпидермиса кожи. Клеток, положительных по K18 и K7 (маркеры уретерия), не обнаружено.

Через 30 сут после трансплантации мы наблюдали на гистологических срезах восстановленный эпителий, представленный одним–тремя слоями клеток. Практически все его клетки содержали мембранный трейсер и окрашивались на дифференцировочный маркер уретерия K7 и маркер базальных кератиноцитов эпидермиса K14. Кератин 18 на данных сроках в восстановленном уретерии не экспрессировался.

Через 45 сут после трансплантации у кроликов происходило полное восстановление уретерия, представленного многослойным переходным эпителием (рис. 3). На препаратах выявлено некоторое количество клеток, содержащих метку. Мембранный трейсер, использованный в данном эксперименте в качестве метки, имеет объективные ограничения в сроках обнаружения в клетках, так как он разбавляется при каждом клеточном делении. Все клетки восстановленного уретерия экспрессировали в эти сроки K18 и K7. Присутствие в клетках K14 слабо проявлялось. Таким образом, по экспрессии кератинов на данных сроках восстановленный эпителий уретры соответствовал нормальному уретерии у кроликов. Полученные результаты позволили нам сделать вывод о том, что аутологичные кератиноциты кожи, выращенные в составе живого эквивалента кожи, могут сохраняться в уретре кролика в течение 1.5 месяцев после трансплантации. Трансплантация ЖЭК позволяет восстановить структуру и функцию уретерия. В отличие от Atala [14], который в качестве источника клеток использовал биопсию мочевого пузыря, мы применяли аутологичные эпидермальные кератиноциты, так как получение аутологичных клеток эпителия мочевыводящих путей приводит к значительному расширению оперативного поля (биопсия мочевого пузыря). Данная технология позволяет решить проблему дефицита пластического материала. Кроме того, это позволяет избежать использования для уретропластики кожи, содержащей волосяные фолликулы, которая часто применяется хирургами в настоящее время.

При использовании в трансплантате аутологичных клеток эпидермиса возможно их встраивание в место дефекта. При этом замещение недостающих тканей может происходить за счет компартамента стволовых и транзиторных клеток, входящих в состав эквивалента. Lehrer и соавт. [15] установили, что в эпидермисе регенерация идет в основном за счет компартамента стволовых клеток базального слоя, а также в значительной степени за счет транзиторных клеток. При этом скорость созревания базальных клеток и их дифференцировка может сокращаться. Li и соавт. [16] показали, что в реконструкции эпидермиса

после трансплантации кератиноцитов, выращенных в культуре пластов, принимали участие не только стволовые клетки, но и часть транзиторных клеток, причем даже некоторые, уже коммитированные к дифференцировке. Полученные нами результаты и анализ опубликованных данных позволяют предполагать, что стволовые и транзиторные клетки эпидермиса, присутствующие в живом эквиваленте кожи, попадая в микроокружение уротелия, не только выполняют его функцию, но и проявляют феномен пластичности, обладая свойствами клеток уротелия.

С целью отслеживания расширения клеточных клонов в организме животного и наблюдения за проявлениями фенотипической пластичности под влиянием микроокружения мы получили культуры эпидермальных кератиноцитов кожи от четырех лабораторных кроликов и трансфицировали их *e-GFP* при помощи лентивирусной конструкции. Через 1 неделю после трансфекции 90% клеток содержали GFP и интенсивно светились в зеленом спектре. Трансфицированные кератиноциты использовали при создании ЖЭК и культивировали в течение 1 недели.

Полученный таким образом трансплантат с аутологичными клетками использовали в создании неоуретры у кроликов по методике, описанной выше. Через 21, 45 и 90 сут после трансплантации проводили гистологическое и иммуногистохимическое исследование. Для усиления сигнала EGFP мы использовали антитела к EGFP. Кроме того, препараты были окрашены антителами к кератинам 14 и 7, а также к уроплакнину 3 (UP3) – маркеру дифференцировки уротелия.

Через 21 сут после трансплантации мы обнаружили в уретре кролика формирующийся эпителий, состоящий из одного–четырех слоев клеток. Иммуногистохимическое выявление EGFP дало положительный результат. Это, вероятнее всего, говорит о том, что мы обнаружили в просвете уретральной трубки прижившиеся кератиноциты кожи, содержащие EGFP. Присутствие UP3 в восстановленном уротелии на данном сроке не обнаружено.

Через 45 сут после трансплантации эпителий уретры был представлен переходным эпителием, состоящим из трех–семи слоев клеток. Меченные EGFP клетки были найдены во всех слоях эпителия уретры (рис. 4), часть которых экспрессируют кератин 14 (рис. 4А,Б).

В то же время обнаружены другие маркеры уротелия, К7 и UP3. Причем, изучив распределение данных маркеров и экспрессию EGFP в клетках неоуретры при большом увеличении, можно с уверенностью говорить о колокализации зеленого белка и маркеров дифференцированных клеток уротелия (рис. 4В–Е).

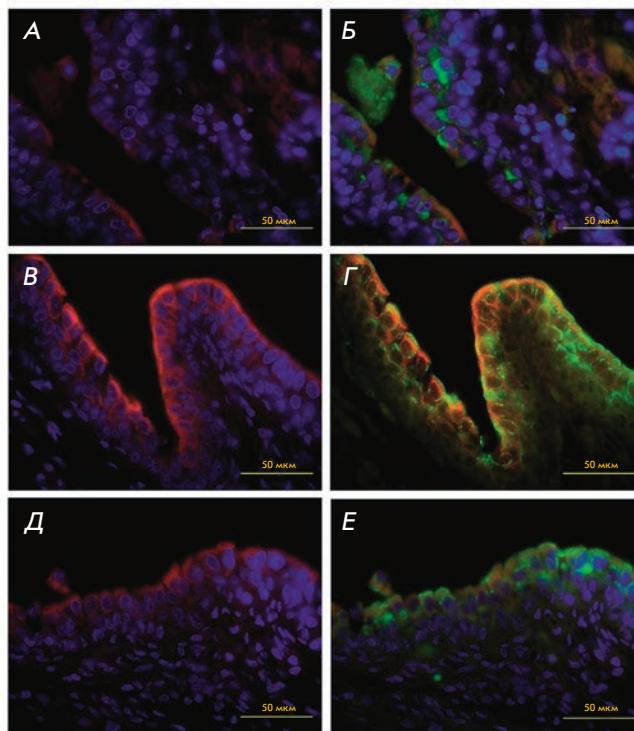


Рис. 4. Поперечные срезы восстановленной уретры кролика через 45 сут после операции. Участок восстановленного уротелия, иммунофлуоресцентное выявление маркеров уротелия. Обнаружена колокализация генетической метки EGFP (на Б, Г и Е – зеленый) и маркеров уротелия – К14 (красное окрашивание на А и Б, К7 (красное окрашивание на В и Г) и UP3 (красное окрашивание на Д и Е). Ядра окрашены DAPI (синее окрашивание)

Через 3 месяца после трансплантации в препаратах восстановленного уротелия нами был обнаружен полностью сформированный уротелий нормального строения, большая часть клеток верхнего слоя которого экспрессировала UP3 (рис. 5). Также обнаружены группы клеток, содержащие EGFP (рис. 5, 6). Такое расположение содержащих метку клеток можно объяснить тем, что скорость регенерации у животных, в частности у кроликов, довольно высокая, и краевая миграция клеток уротелия из верхнего отдела уретры, а также пролиферация единичных клеток уротелия, вероятно оставшихся в месте создания дефекта, проходила параллельно разрастанию островков эпителизации трансплантированных кератиноцитов. Как и в предыдущих экспериментах, на данных сроках все слои неоуретелия экспрессировали кератин 7 (рис. 6).

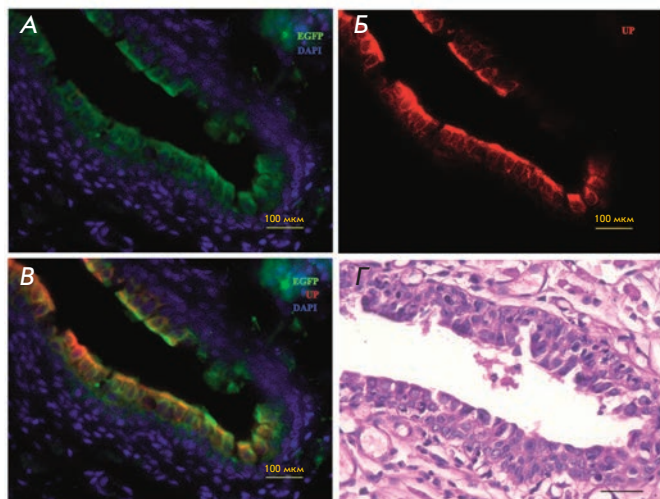


Рис. 5. Поперечные срезы восстановленной уретры кролика через 3 месяца после операции. Участок восстановленного уротелия, иммунофлуоресцентное выявление маркеров уротелия. Колокализация генетической метки EGFP (на А и В – зеленое окрашивание) и маркера уротелия UP3 (на Б и В – красное окрашивание). Ядра окрашены DAPI (синее окрашивание). Г – окраска гематоксилином-эозином

В экспериментах с трансплантацией аутологичных EGFP-содержащих кератиноцитов кожи кролика в уретральную трубку было показано, что через 3 месяца после трансплантации в уретру кератиноциты кожи полностью восстанавливают уротелий. Под влиянием специфического микроокружения уретры клетки меняли свой фенотип, приобретая такие признаки, как наличие кератина 7 и UP3.

Таким образом, при трансплантации в область дефекта уротелия аутологичные кератиноциты кожи встраиваются в структуру уретры, восстанавливая ее целостность, и под воздействием специфического микроокружения приобретают фенотипические признаки клеток уротелия.

Полученные данные позволяют нам предположить, что кератиноциты кожи взрослого организма, выращенные *in vitro* и трансплантированные в уретру, проявляют способность к пластичности. Это предположение согласуется с данными о пластичности взрослых стволовых/прогениторных клеток. В частности, обнаружено, что эпидермальные кератиноциты проявляют способность к пластичности в определенных условиях: под влиянием мезодермы семенных пузырьков новорожденных крысят в дифференцированных клетках уротелия взрослого человека начинается экспрессия новых неспецифических маркеров функциональной и морфологической

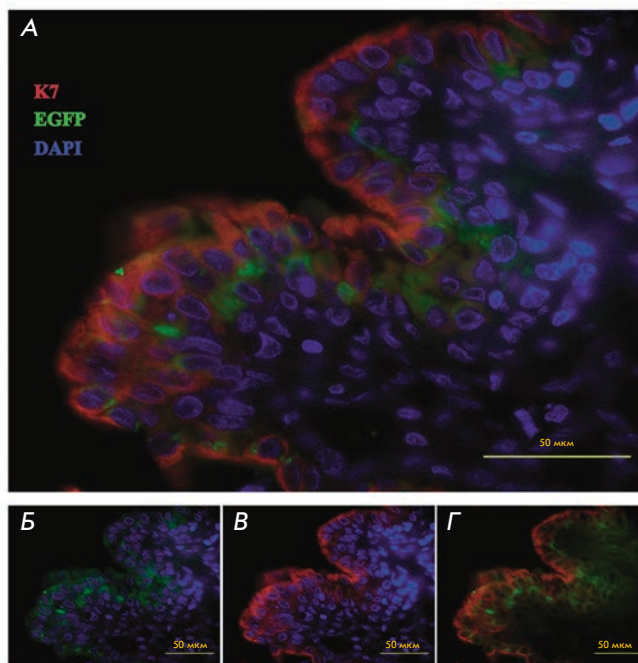


Рис. 6. Поперечные срезы восстановленной уретры кролика через 3 месяца после операции. Участок восстановленного уротелия, иммунофлуоресцентное выявление маркеров уротелия. Колокализация генетической метки EGFP (на А, Б и Г – зеленое окрашивание) и маркера уротелия K7 (А, Б и Г – красное окрашивание). Ядра окрашены DAPI (синее окрашивание)

дифференцировки [17]. Есть данные, показывающие, что клетки роговицы способны трансдифференцироваться в клетки эпидермиса под воздействием сигналов эмбриональной дермы [18]. Пластичность эпидермальных кератиноцитов наблюдали и в экспериментах по трансплантации клеток в роговицу. В работе [5] авторы так же исследовали изменения фенотипа генетически меченных клеток и наблюдали эффект трансдифференцировки, заключающийся в том, что профиль экспрессии эпидермальных кератиноцитов изменялся с K14 на K3/12, характерный для эпителия роговицы.

Сигналы, производимые микроокружением, определяют поведение и свойства стволовых клеток. В частности, сигналы мезенхимы играют важнейшую роль в поддержании их статуса. Ferraris и соавт. использовали межвидовые перекрестные трансплантации [19] и обнаружили, что при трансплантации под капсулу почки сигналы из эмбриональной дермы мыши могут распознаваться эпителием роговицы взрослого кролика. При этом эпителий роговицы трансдифференцируется в эпидермис, содержа-

щий волосяные фолликулы. Влияние уротелиоцитов на фенотип трансплантированных кератиноцитов кожи также является немаловажным фактором, влияющим на направление их дифференцировки. В частности, такой эффект описан для клеток *in vitro*: при культивировании кератиноцитов волосяного фолликула на среде, кондиционированной уротелиоцитами клетки кожи, уже через 2 недели переставали экспрессировать K15, в то же время в них начиналась экспрессия всех кератинов 7 и 18, характерных для эпителия уретры [20].

Полученные результаты имеют не только фундаментальный, но и практический интерес. Дефицит пластического материала приводит к ряду проблем в реконструктивной хирургии мочеполовой системы. В работе Atala [14] описан метод создания уретры *de novo* с использованием клеток мочевого пузыря, выращенных на коллагеновой подложке. Успешность подобных операций позволяет утверждать, что тканеинженерные подходы к реконструкции уретры весьма перспективны. Однако недостатком данного метода является дефицит исходного пластического материала и травматичная процедура по забору биоптата из полости мочевого пузыря. Использование кожи (например, кожи мошонки) как легкодоступного пластического материала для создания искусственного мочеиспускательного канала за многие годы подобных операций показало, что клетки кожи способны приживаться в условиях агрессивной среды (влияние мочи) и брать на себя функции уротелия

[21, 22]. Однако данный метод может приводить к таким осложнениям, как рост волос в просвет уретры в период полового созревания. Предлагаемая нами конструкция создана из кератиноцитов, прошедших стадию культивирования, и не образует волосяных фолликулов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ

Нами разработана методика восстановления уретры с использованием коллагеновой подложки и клеток кожи, прошедших стадию культивирования. В таком эквиваленте уретры отсутствуют волосяные фолликулы, и одновременно решается проблема дефицита пластического материала. Аутологичные кератиноциты кожи, помещенные в микроокружение, специфичное для уротелия, проявляют фенотипическую и функциональную пластичность, принимая на себя функции уротелия.

Трансплантация живого эквивалента кожи с аутологичными кератиноцитами кожи в эпителиальный дефект уретральной трубки кроликов приводит к полному восстановлению структуры уротелия и функции уретры.

После трансплантации кролику в дефект уретры живого эквивалента кожи аутологичные эпидермальные кератиноциты меняют свой фенотип и приобретают признаки (синтез K7 и UP3), характерные для эпителия уретры, что свидетельствует о пластичности взрослых эпидермальных стволовых клеток. ●

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Phinney D.G., Prockop D.J. // *Stem Cells*. 2007. V. 25. № 11. P. 2896–2902.
- Bais M.V., Shabin Z.M., Young M., Einhorn T.A., Kotton D.N., Gerstnefeld L.C. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2012. V. 417. № 1. P. 211–216.
- Baker R.E., Murray P.J. // *Curr. Opin. Genet. Dev.* 2012. V. 22. № 6. P. 607–612.
- De Coppi P., Callegari A., Chiavegato A., Gasparotto L., Piccoli M., Taiani J., Pozzobon M., Boldrin L., Okabe M., Cozzi E., et al. // *J. Urol.* 2007. V. 177. № 1. P. 369–376.
- Meyer-Blazejewska E.A., Call M.K., Yamanaka O., Liu H., Schlötzer-Schrehardt U., Kruse F.E., Kao W.W. // *Stem Cells*. 2011. V. 29. № 1. P. 57–66.
- Mhashilkar A., Atala A. // *Curr. Stem Cell Res. Ther.* 2012. V. 7. № 1. P. 1.
- Fisher M.B., Mauck R.L. // *Tissue Eng. Part B Rev.* 2013. V. 19. № 1. P. 1–13.
- Grinnell F. // *Trends Cell Biol.* 2000. V. 10. № 9. P. 362–365.
- Palmiero C., Imperato G., Urciuolo F., Netti P. // *Acta Biomater.* 2010. V. 6. № 7. P. 2548–2553.
- Tuan R.S. // *Int. J. Oral Maxillofac. Implants.* 2011. V. 26. P. 50–62.
- Peterbauer-Scherb A.I., Danzer M., Gabriel C., van Griensven M., Redl H., Wolbank S. // *J. Tissue Eng. Regen. Med.* 2012. V. 6. № 6. P. 434–442.
- Васильев А.В., Воротеяк Е.А., Киселев И.В., Терских В.В. // *Вестн. Рос. акад. мед. наук*. 2008. № 2. С. 45–53.
- Kim J.H., Kong W.H., Kim J.G., Kim H.J., Seo S.W. // *Artif. Organs*. 2011. V. 35. № 2. P. 122–130.
- Atala A. // *J. Endourol.* 2000. V. 14. № 1. P. 49–57.
- Lehrer M.S., Sun T.-T., Lavker R.M. // *J. Cell Sci.* 1988. V. 111. P. 2867–2875.
- Li A., Pouliot N., Redvers R., Kaur P. // *J. Clin. Invest.* 2004. V. 113. P. 390–400.
- Aboseif S., El-Sakka A., Young P., Cunha G. // *Differentiation*. 1999. V. 65. P. 113–118.
- Peartou D.J., Yang Y., Dhouailly D. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2005. V. 102. P. 3714–3719.
- Ferraris C., Chevalier G., Favier B., Jahoda C.A., Dhouailly D. // *Development*. 2000. V. 127. № 24. P. 5487–5495.
- Drewa T., Joachimiak R., Bajek A., Gagat M., Grzanka A., Bodnar M., Marszałek A., Dębski R., Chłosta P. // *Int. J. Urol.* 2013. V. 20. № 5. P. 537–542.
- Файзулин А.К., Коварский С.Л. // *Андрология и генитальная хирургия*. 2002. № 2. С. 84–85.
- Файзулин А.К., Демин Н.В. // *Андрология и генитальная хирургия*. 2009. № 4. С. 31–35.