

Концепция обмена генетическим материалом между клетками млекопитающих

В. А. Кордюм, С. П. Шпилевая, Т. А. Рубан, Е. М. Сухорада

Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины
Ул. Академика Заболотного, 150, Киев, 03143, Украина

E. mail: kordyum@imbg.org.ua

Представлена концепция обмена генетическим материалом между клетками млекопитающих, подтвержденная как непосредственными экспериментами по переносу генетических маркеров, так и прямыми микроскопическими наблюдениями. Формируется представление о существовании в организме единого информационного пространства, образуемого за счет прижизненного выделения ДНК клетками без нарушения их геномов (и ее поглощения, комплементирующего мутации) или адресной передачи генетического материала специализированными клетками.

Ключевые слова: перенос генетической информации, взаимодействие клеток.

Любое многоклеточное существо представлено взаимодействующей совокупностью очень большого количества разнообразных по своей структуре и функциям клеток, организованных в единое целое благодаря регуляторным и трофическим взаимосвязям и взаимодействиям. Такие связи, согласно общепринятым на сегодня представлениям, обусловлены лигандно-аффинными, слабыми или вообще неспецифическими взаимодействиями внеклеточного окружения с клеточной мембраной и прямыми (непосредственно межклеточными) объединениями через щелевые контакты (рис. 1). Обычно этим и ограничиваются. Однако весьма многочисленные (хотя и разрозненные) литературные данные и наш анализ, изложенный в предыдущих публикациях [1—7], показывают возможность существования еще одного типа связей — информационного, осуществляемого посредством межклеточного обмена генетическим материалом в пределах индивидуального организма без нарушения при этом полноценности геномов клеток. Подобное

принципиально возможно за счет явлений амплификации — процессов, в основе которых лежат механизмы магнификации, АРС-ов и т. д.

Для оценки фактических данных о переносе в организме генетического материала необходимо иметь целостное представление о масштабах такого переноса, его разнообразии и возможном значении. Настоящая работа является одним из первых этапов формирования такого представления — феноменологическим (вначале — только феноменологическим) описанием разнообразия и масштаба генетического обмена между клетками млекопитающих (как всегда, когда что-то начинается, — на модельных объектах) с обоснованием и анализом предполагаемого значения такого обмена.

В предыдущих публикациях [2, 3, 5, 7] описаны эксперименты, показывающие передачу генетически обусловленных признаков при взаимодействии (или относительно кратковременном совместном культивировании) генетически маркированных клеточных популяций. Наиболее существенным в этих взаимодействиях была частота переносов, которая во много раз превышала таковую при транс-

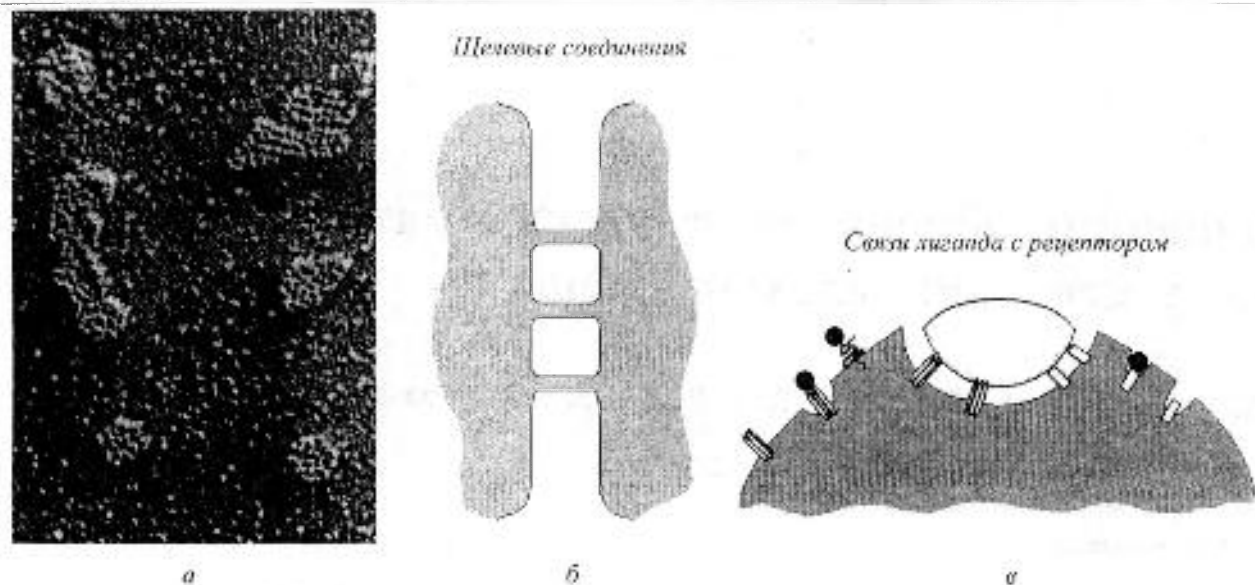


Рис. 1. Согласно существующим представлениям, клеточные взаимодействия в организме функционируют по двум механизмам: *а*, *б* — через клеточные соединения при помощи щелевых контактов с размерами пор 1,5—2 нм. Эти каналы (*а* — электронная микрофотография, *б* — схематическое изображение) способны пропускать (как принято считать) только мелкие молекулы и электрические сигналы; *в* — различного рода рецептор-опосредованным сигнальные и трофические взаимодействия

Клонирование контрольной культуры CHO-K1 pro^{-} , neo^{-} , GFP^{+} Tk_{HV}^{+} Hig^{R} на различных средах

Вариант среды	Количество клонов	Светящиеся клоны, %
pro^{-}	0	0
pro^{+}	365	100
pro^{+} G418 ⁺	300	100
pro^{+} Hig ⁺	200	100
pro^{+} G418 ⁺ Hig ⁺	140	55

формации с использованием искусственных воздействий. Еще ярче это проявлялось при использовании клеток с большим числом маркеров. Вот один из примеров таких экспериментов.

В качестве первого партнера была взята полученная ранее линия CHO-K1, несущая маркеры pro^{-} , neo^{+} , GFP^{+} , Tk_{HV}^{+} , Hig^{+} [8, 9]. Эти клетки обладали следующими свойствами: они ауксотрофны по пролину, устойчивы к антибиотику гигромицину, но одновременно чувствительны к действию ганцикловира, флуоресцируют в зеленой области спектра при возбуждении ультрафиолетовым излучением. Вторым партнером служили клетки эмбриональной печени мыши, которые соответственно имели маркеры pro^{+} , neo^{-} , GFP^{-} , Tk_{HV}^{-} , Hig^{-} .

Использование множественно маркированных линий имеет свои особенности. Поскольку любая

популяция клеток неоднородна, действие селективных факторов также неидентично, даже при использовании перевиваемых линий. Это хорошо видно из результатов контрольных высевов, представленных в таблице. Добавление селективных агентов снижало эффективность клонирования, а их совместное действие в значительной мере гасило и люминесценцию GFP. Последнее свидетельствует об угнетении токсичными агентами клеточного метаболизма, несмотря на наличие генов, кодирующих синтез белков, которые в свою очередь блокируют такое токсическое действие. Это необходимо учитывать при оценке количества колоний, вырастающих в эксперименте.

Как следует из приведенных в таблице данных, после совместной инкубации появлялись клоны с разными сочетаниями маркеров (что видно по количеству выросших колоний из рассевов предыдущих клонов, отбор которых вели в других селективных условиях).

После приведения клеток-партнеров в соприкосновение (на газон с CHO наносили клетки эмбриональной печени) их инкубировали в течение 1 ч, а затем отмывали. Оставались только клетки эмбриональной печени мыши, вступившие в контакт с клетками CHO. Далее материал разделяли на две группы. Первую снимали с пластика через 1 сут, а вторую — через 17 сут совместной инкуба-

ции. В снятом материале учитывали количество клеток и аликвоту, содержащую 400 клеток, высевали на чашку Петри в среду с разными селективными агентами. Через 14 сут роста на вновь выросшем материале процедуру повторяли. Схема опыта и его результат представлены на рис. 2.

Такой характер взаимодействия не имел объяснения в рамках общепринятых представлений. Он стал понятным лишь после того, как удалось визуализировать некоторые этапы. Это достигается специальной прижизненной окраской ДНК. Из всех известных соединений, связывающихся с ДНК, согласно существующим взглядам, наибольшей избирательностью характеризуются те, у которых взаимодействие происходит по малой бороздке ДНК. Их избирательность носит почти абсолютный характер [10]. Это объясняется тем, что такой структуры, как малая бороздка двойной спирали ДНК, в сочетании с молекулярными группами, ее формирующими, нет более ни у одного вещества. Красители, обладающие подобной специфичностью, начинают заметно флуоресцировать лишь после того, как их молекулы расположатся в малой бороздке двойной спирали ДНК. К таким флуорохромам относят соединения группы Hoechst. Их избирательная идентификация генетического материала исключительно высока. Ее может не быть, если белки или иные молекулы сделают ДНК недоступной для красителя (окрашивание чаще всего ведется прижизненно, а не на фиксированном материале, где все лишнее можно убрать) или изменят ее структуру. Но уж если окраска имеется, то визуализирует она почти исключительно ДНК. Обычно для таких исследований используют Hoechst 33342.

Доказательства чрезвычайно высокой избирательности окраски Hoechst 33342 представлены в опытах по разделению клеток на основании измерений интенсивности флуоресценции их ядер [11, 12]. Результаты сортировки Т и В лимфоцитов селезенки мыши, окрашенных небольшими количествами Hoechst 33342 (1 мкг/мл) на FACS (Fluorescence-Activated Cell Sorter), коррелировали с результатами деления этих клеток иммунохимическими методами при использовании антигенных маркеров клеточной поверхности. Необычное свойство Hoechst 33342 проявляется также в свечении окрашенной ДНК в двух разных областях спектра (голубой и красной), которое, как оказалось, находится в зависимости от функционального состояния хроматина ядер [13]. При возбуждении свечения

красителя ультрафиолетовым светом с использованием фильтра с максимумом пропускания 350—363 нм эмиссия флуоресценции в голубой области спектра регистрируется на длинах волн выше 450 нм. Красное свечение наблюдается при использовании светофильтров с максимумом пропускания при 610 нм. В живых клетках Hoechst 33342 обеспечивает достаточно высокое пропорциональное окрашивание ДНК в ядрах, что позволяет рассматривать его как индикатор клеточного цикла и количества ДНК в ядре, которое увеличивается при переходе от G_0 — G_1 к S и G_2 —M фазам [14]. Для прижизненного окрашивания клеток с помощью Hoechst 33342 рекомендуют использовать концентрации красителя в пределах 5—10 мкг/мл на 10^6 клеток/мл [15].

Мы использовали более низкие концентрации Hoechst 33342 (0,05—0,05 мкг/мл), которые не оказывали отрицательного воздействия на растущие клетки даже при длительном культивировании (целенаправленную проверку влияния указанных концентраций красителя на культуру СНО-К1 проводили в течение 8 сут, она продемонстрировала отсутствие каких-либо угнетающих воздействий на клетки).

Таким образом, применение для окрашивания ДНК минимальных количеств красителя, заведомо не вызывавших выявляемых физиологических изменений в клетках, позволило установить межъядерные и межклеточные информационные взаимодействия в 1, 2 и 3-сут культурах клеток СНО-К1, 2-сут культурах L-M (TK⁻, APRT) и фибробластах 16-сут эмбриона мыши ICR. Препараты исследовали на люминесцентном (Л-М2) и конфокальном (LSM 510 ZEISS) микроскопах с применением фильтров, необходимых для визуализации ядер, окрашенных Hoechst 33342.

Независимо от сроков культивирования (1—3 сут) на поверхности интерфазных ядер части клеток фибробластов и СНО-К1 наблюдалось появление выпячиваний ядерной оболочки. У некоторых ядер таких выпячиваний ядерной мембраны могло быть несколько. Их размеры заметно варьировали — от очень мелких, не превышающих 1 мкм, до нескольких микрометров. Выступы ядерной оболочки заметно увеличивались, округлялись и вместе с перешедшим в них хроматином отпочковывались от ядра и формировали микроядра в цитоплазме клетки (рис. 3, а). Часть микроядер покидала пределы клетки и мигрировала в окружа-

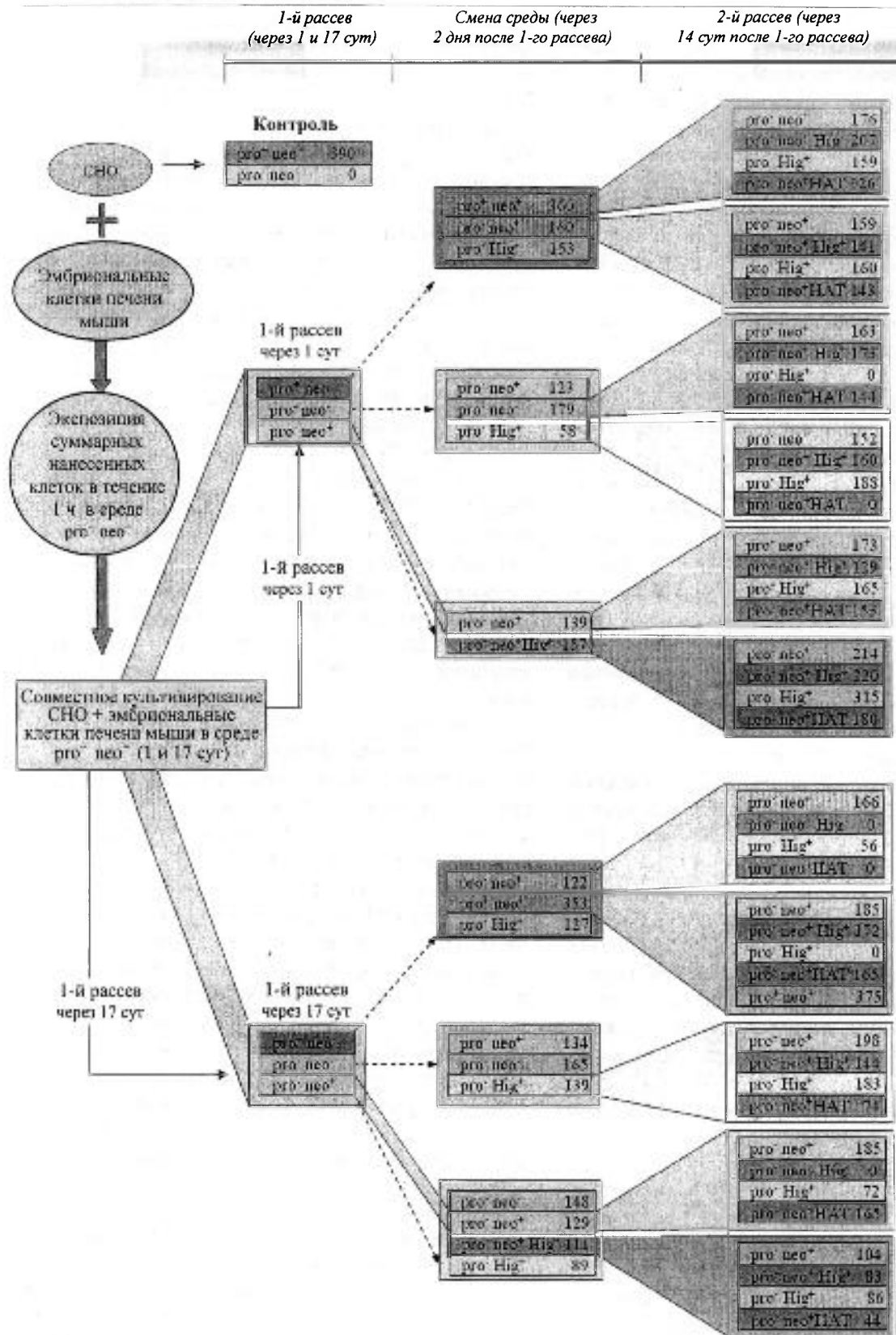


Рис. 2. Схема опыта по передаче генетических признаков при использовании сред с различными селективными агентами

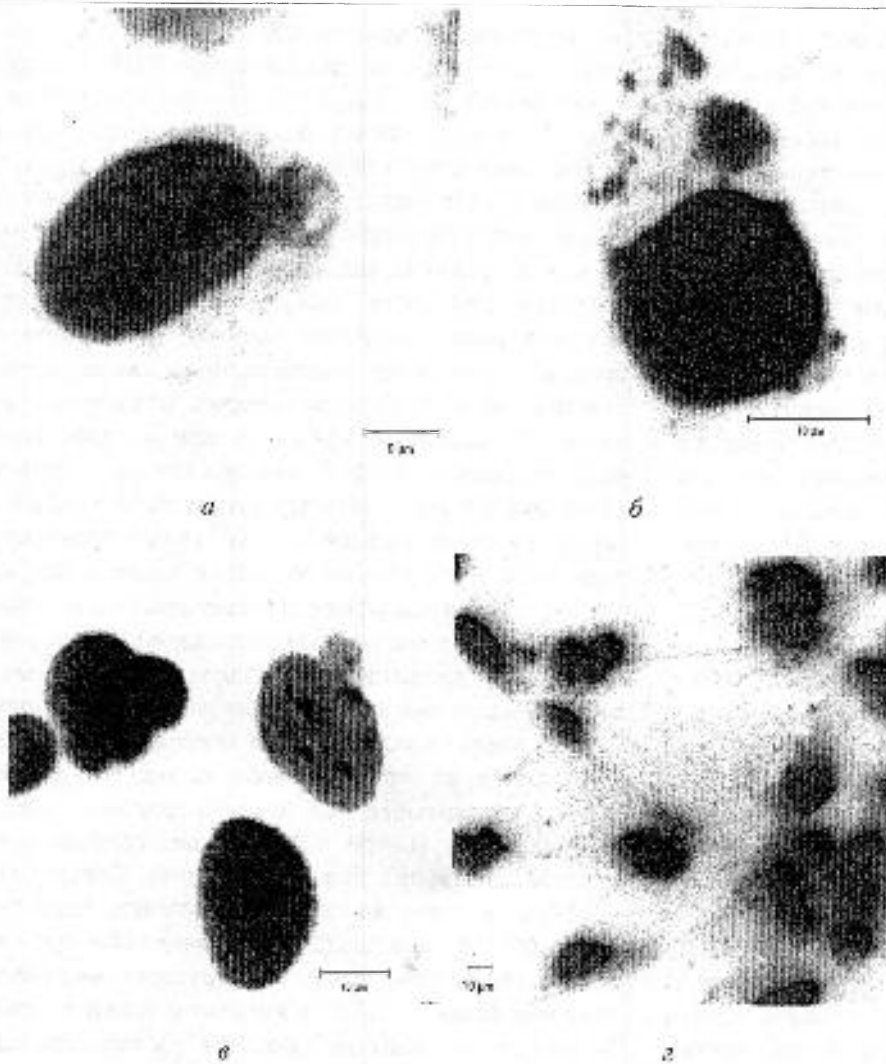


Рис. 3. Информационные взаимодействия в культуре клеток *in vitro*: а — выход хроматина из ядра СНО-К1 и формирование микроядра; б — множественные выбросы хроматина из ядра фибробласта 16-сут эмбриона мыши (в цитоплазме клетки много мелких хроматиновых образований наряду с более крупными формированиями); в — отпочковывание микроядра, мелкие хроматиновые капли перемещаются к периферии клетки, культура Litk⁻; г — связующие хроматиновые нити между ядрами клеток фибробластов 16-сут эмбриона мыши (мелкие хроматиновые образования в цитоплазме отдельных клеток и в межклеточном пространстве)

ющую среду. Некоторые из этих шаровидных отпочкований ядра, удаляясь от его поверхности к периферии клетки, продолжали сохранять связь с ядром в виде длинных хроматиновых тяжей.

В других случаях отмечены множественные выходы совсем мелких хроматиновых образований (рис. 3, б): при большом увеличении видно, что они не имеют какой-либо оформленной оболочки и представлены тонкими скрученными хроматиновыми нитями. Эти хроматиновые образования независимо от их размера не задерживаются в цитоплазме и выходят за пределы клетки (рис. 3, в). Такие картины отличаются от существующих при гибели клеток вследствие апоптоза или некроза.

Формирование подобных микроядер разного размера связывают с внутриядерными перемещениями экстрахромосомной ДНК, содержащей амплифицированные гены [16], их наблюдают также в

трансформированных (опухолевых) клетках [17]. На примере культуры клеток сирийского хомячка показано, что амплифицироваться могут большие участки ДНК, включая целые плечи хромосом, и первичные события амплификации являются не только следствием простой гиперрепликации ДНК, но иногда сопровождаются и рекомбинацией с неравным распределением ДНК в две дочерние клетки [18]. С другой стороны, описаны эксперименты по формированию выпуклостей ядерной оболочки — почек в ответ на обработку гипотоническим шоком клеток СПЭВ и HeLa [19]. Для клеток, меченных бромдезоксипуридином до обработки их гипотоническим раствором, показано, что такие выступы-почки с ядерным материалом возникали в S фазе клеточного цикла, предположительно, в ее конце. Однако в описываемых нами опытах никаких экспериментальных воздействий на клетки не

осуществляли и наблюдавшиеся почкование ядер и выход части хроматина ядер в виде как микроядер, так и мелких хроматиновых образований в цитоплазму являлись естественными процессами.

Появление совсем мелких хроматиновых образований, очевидно, — тоже не исключение. Подобные структуры обнаруживаются в ооцитах насекомых [20], они выявлены в цитоплазме клеток джунгарского хомяка, резистентных к колхицину, их рассматривают как структуры, являющиеся местом локализации автономно реплицирующихся амплифицированных последовательностей ДНК [21]. Авторадиографическим методом показано, что мелкие хроматиновые образования обладают способностью реплицироваться не только в S фазе клеточного цикла, но и в G₂ фазе, т. е. ДНК в этих образованиях реплицируется независимо от хромосомной ДНК.

По-видимому, процессы формирования микроядер и появления мелких хроматиновых образований в цитоплазме клеток исследуемых нами культур также в какой-то мере могут быть объяснены следствием амплификации части ядерного материала (хотя не исключаются и иные причины их возникновения). При значительных увеличениях, которые позволяет разрешающая способность конфокального микроскопа, между отдельными клетками культур СНО-K1, L-M (TK⁻ APRT) и фибробластов 16-сут эмбриона мыши, кроме мелких хроматиновых гранул, отмечены длинные тонкие хроматиновые тяжи, окруженные очень тонким слоем цитоплазмы и соединяющие ядра нескольких клеток (рис. 3, 2). Иногда у таких тяжей с ядром клетки соединен только один конец, а на втором (свободном) — расположен небольшой хроматиновый сгусток. Протяженность тяжей хроматина часто превышала длину нескольких диаметров клеток, между которыми они находились. Такое информационное взаимодействие двух и более клеток не было исключительным и наблюдалось во все сроки культивирования клеток, хотя более часто встречалось в фибробластоподобных клетках на второй—третий день культивирования. Плотность посева клеток в определенных пределах (50, 100 и 200 тыс. клеток на поверхности покровного стекла размером 18 × 18) также не имела решающего значения для появления между клетками связующих нитей хроматина.

Ранее обсуждалась возможность горизонтального переноса генетической информации в культу-

рах трансформированных клеток при выходе экстрахромосомной цитоплазматической ДНК в окружающую среду и поглощении ее другими клетками [16, 17]. Но дальше осторожных допущений (да и то вскользь) ничего не предпринималось.

Мы предположили, что такой перенос генетического материала при клеточных соприкосновениях или сближениях является одним из очень существенных элементов унификации геномов клеток — в роли механизма защиты от мутаций в пределах компактно расположенной ткани, представляя собой некое «генетическое кондиционирование». Спонтанный мутагенез при реально идущих его скоростях неизбежно должен приводить к очень быстро нарастающему ругуляторно-трофическому хаосу. В каждой клетке ткани возникнут свои мутации и унифицированное взаимодействие клеток нарушится. Обмен же генетическим материалом, генетическое кондиционирование, будет унифицировать геномы клеток и одновременно поставлять полноценный материал для рекомбинационного (или иного) восстановления поврежденного гена. В общем пуле при случайно идущих мутациях каждый конкретный ген будет в основной массе полноценным. И при неслучайных комбинациях материала для них будет достаточно. Контактная передача генетической информации очень наглядно видна (рис. 4) при длительном совместном культивировании клеток с визуализируемым маркером (зеленый белок — GFP) и комочком ткани печени. Буквально по дням наблюдается распространение «зеленой волны» по такому кусочку ткани.

Суть эксперимента заключалась в следующем. Измельченные кусочки печени 17-сут эмбрионов мышей линии ICR продавливали через сито (gma, США, 40—50 mesh screens) и после пассивного осаждения суспензии и промывания мелкие комочки печеночной ткани, не осевшие с крупными конгломератами и состоящие из нескольких десятков клеток, наслаивали на светящиеся клетки СНО-K1, предварительно трансфицированные плазмидой *pEGFP-C1*.

В течение первых 1—2 сут культивирования кусочки печени проявляли слабую автолюминесценцию в зеленой области спектра и на фоне ярко светящихся клеток СНО-K1 практически были не видны (рис. 4, а, б). Зеленая люминесценция в них начинала проявляться на третьи сутки, затем интенсивность свечения клеток в кусочках печени резко возрастала с каждым последующим днем

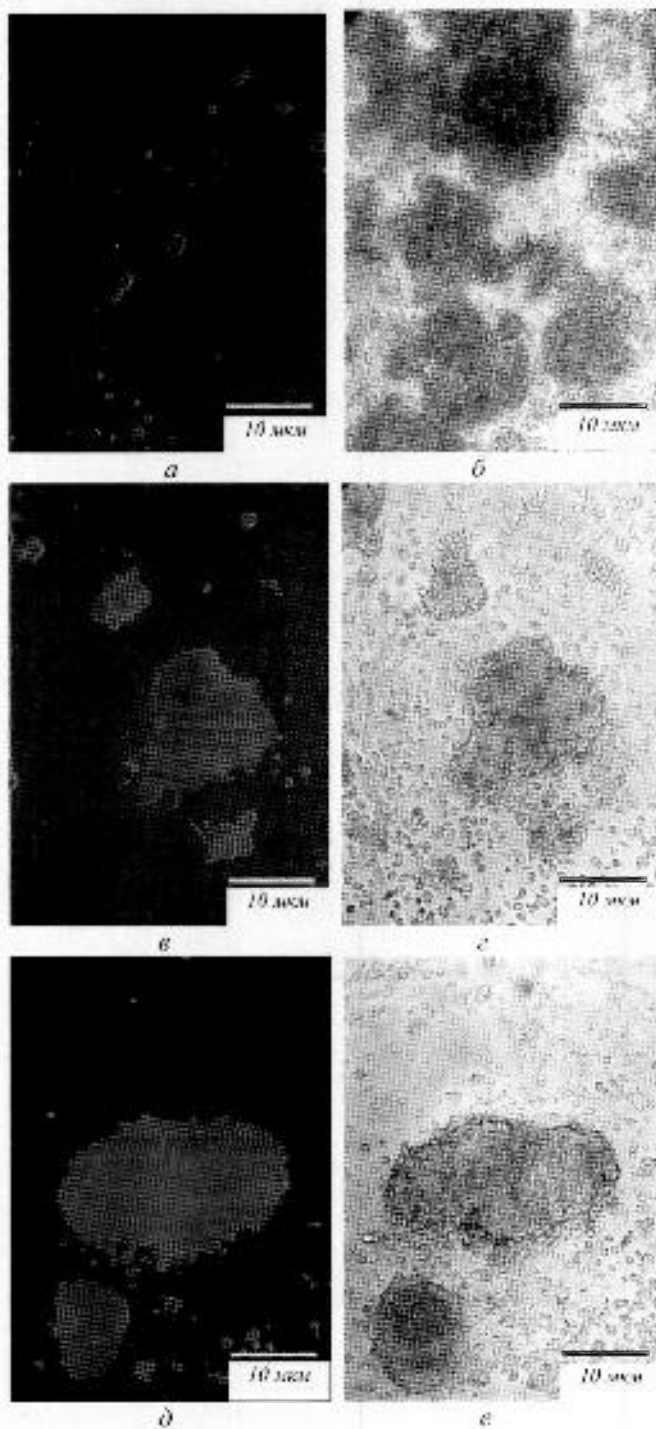


Рис. 4. Проникновение в наслоенные на светящуюся культуру СНО-К1 кусочки печени 17-сут эмбриона мыши ICR маркерного гена *gfp* и наработка продукта его экспрессии – белка GFP. Микрофотографии одного и того же кусочка печени в свете флуоресценции (*a*, *b*, *d*) и в проходящем свете (*b*, *e*, *e*) через разные сроки кокультивирования (*a*, *b* – 1 сут; *a*, *e* – 5 сут; *d*, *e* – 10 сут)

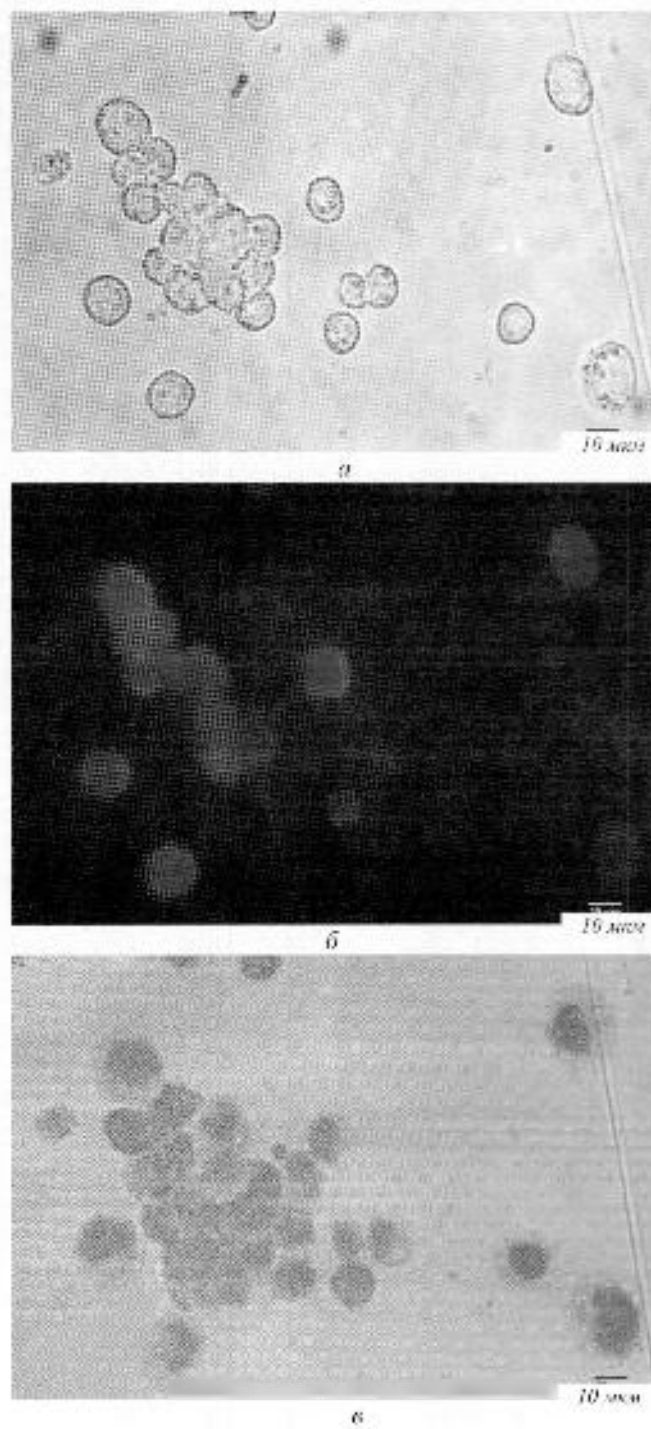


Рис. 5. Клон, состоящий из паренхиматозных клеток печени 17-сут эмбриона мыши, развившийся из отдельных клеток размещенного кусочка печени после 5 сут его кокультивирования со светящейся культурой СНО-К1: *a* – фазовый контраст; *b* – свечение белка GFP в гепатоцитах; *e* – тот же клон, окраска клеток по Романовскому

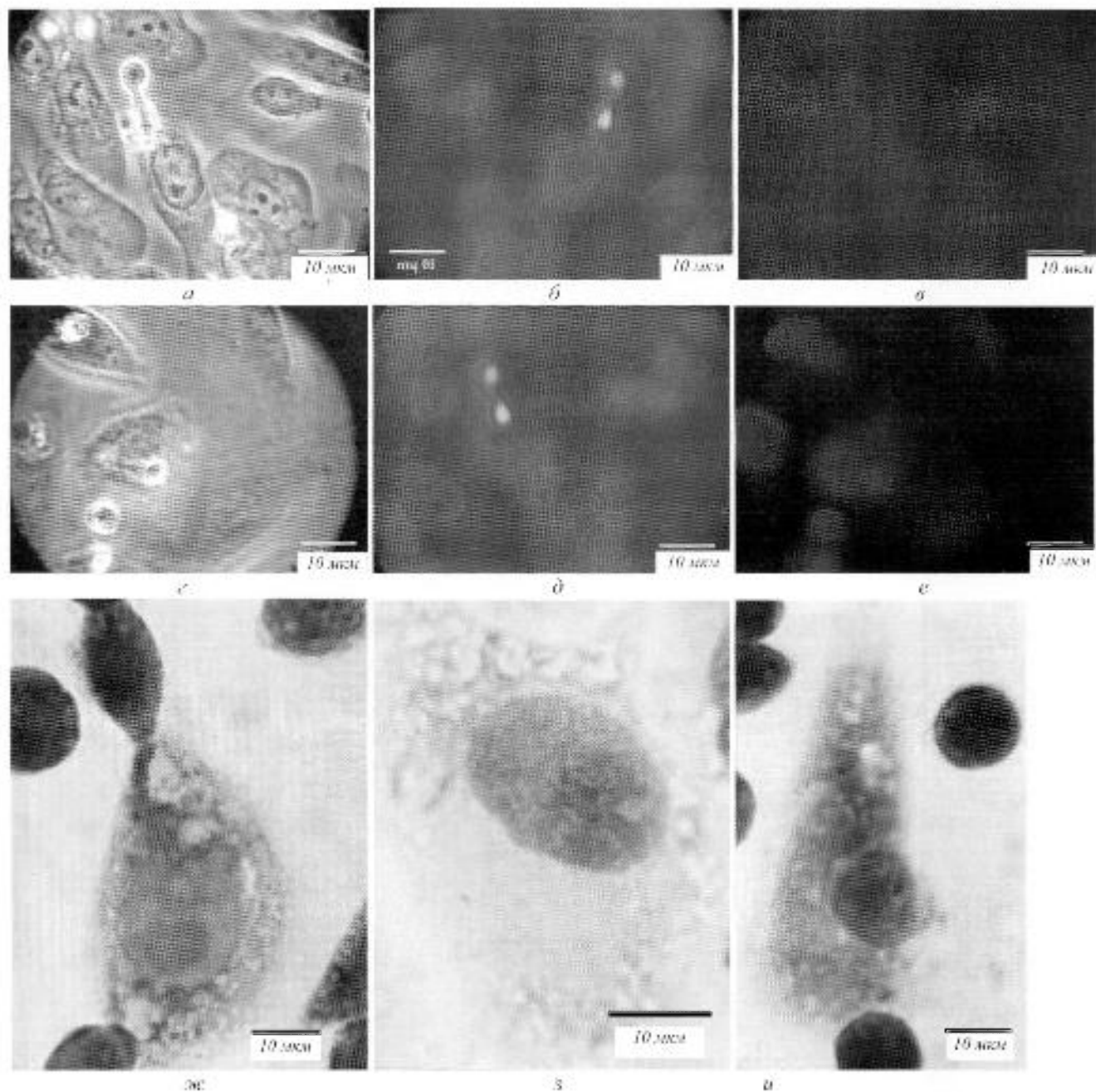


Рис. 6. Взаимодействие клеток 17-сут эмбриональной печени с клетками CHO-K1: а-в – визуализация ядерного интервала клетки-реципиатора на поверхности клетки CHO-K1; д-е – пролиферация хроматина ядра клетки-реципиатора в ядро CHO-K1 (д-е – окраска Hoechst 33342); ж-и – перемещение хроматина ядра клетки-реципиатора по цитоплазме при значительном расстоянии между ядрами; з – этап слияния ядер, выделен более темный, еще платно-конденсированный хроматин клетки-реципиатора; и – размещение ядра клетки CHO-K1 вблизи ядра клетки-реципиатора (ж-и – окраска по Романовскому)

(рис. 4, в, г) вплоть до 10-х сут наблюдения (рис. 4, д, е).

Для выяснения вопроса о том, действительно ли в нанесенных кусочках печени светятся гепатоциты, а не, к примеру, проросшие в них клетки СНО-К1, провели контрольные исследования. Отдельный ярко светящийся кусочек печени извлекали из чашки и разбивали на отдельные клетки, которые вносили в чашки Петри с исчерченным дном (для удобства дальнейшей идентификации отдельных клонов и клеток) и затем культивировали в течение нескольких дней. Светящиеся гепатоциты прикреплялись ко дну чашки и формировали микроколонии из характерных крупных округлых клеток с большим ядром. Отмеченные отдельные клоны гепатоцитов последовательно фотографировали в фазовом контрасте и в люминесцентном микроскопе для определения наличия флуоресценции *in vitro* (рис. 5, а, б). Затем препарат окрашивали по Романовскому и проводили морфологические исследования отмеченных ранее клонов и клеток (рис. 5, в). Клетки, из которых состояли клоны, были одноядерными, имели густую цитоплазму и их ядерно-цитоплазматическое отношение соответствовало таковому у гепатоцитов.

Дополнительными доказательствами для идентификации служило выявление в клетках клонов специфического фермента гепатоцитов — глюкозо-6-фосфата, в результате чего места локализации фермента окрашивались в коричневый цвет [22].

Появление зеленой флуоресценции у кусочков мышинной печени, помещенных на светящуюся культуру клеток СНО-К1, содержащую маркерный ген *gfp*, рассматривали как свидетельство проникновения этого гена в клетки привнесенной ткани печени и его дальнейшего активного функционирования в них, что визуально проявлялось в наработке значительных количеств флуоресцирующего белка GFP. Проведенный эксперимент подтвердил возможность визуализации непосредственной передачи генетического материала между клетками.

Так обстоит дело с контактным генетическим обменом. Кроме него, существует и дистанционный, также в пределах индивидуума. Он осуществляется, судя по морфологии, различными клеточными популяциями. Это хорошо прослеживается как на фиксированных и окрашенных препаратах, так и непосредственно *in vitro* в культуре при соприкосновении разных популяций. Опыты по взаимодействию клеток СНО-К1 с клетками пече-

ни 17-сут эмбрионов мыши ICR послужили иллюстрацией к вышеизложенному. Для усиления взаимодействия партнеров клетки СНО-К1 и эмбриональной печени мыши брали в избытке. Популяция взаимодействующих клеток эмбриональной печени неоднородна по своему составу, и размеры составляющих ее клеток варьировали от 4—5 до 12 мкм. Эти клетки отличались высоким ядерно-цитоплазматическим отношением и очень плотно упакованным хроматином. В части этих клеток отмечена характерная интенсивная флуоресценция хроматина, на основании чего мы их предположительно идентифицировали как лимфоциты [11, 12, 23]. Другие типы клеток, вступающие в контакт с СНО-К1, но не проникающие в них, имели более тусклое свечение.

Окрашенные Hoechst 33342 клетки, участвующие во взаимодействии, демонстрировали интенсивное свечение в голубой и красной областях спектра, что является отличительным признаком, присущим стволовым клеткам.

Время контакта взаимодействующих клеток в различных экспериментах варьировали от 20 мин до 1—2 ч. Первые контакты поверхностей клеток и начальные этапы проникновения в цитоплазму клеток СНО-К1 наблюдались уже через 20—30 мин. Характер протекания взаимодействий зависит от того, какая эмбриональная клетка контактирует с клеткой СНО-К1, насколько тесный контакт формируется между этими двумя клетками, где локализовано ядро клетки-мишени: вблизи или вдали от места контакта и др. Существуют различные варианты передачи генетического материала. Часто контакт клеток завершается проникновением в цитоплазму контактирующей клетки и слиянием двух ядер, хотя у части клеток эмбриональной печени, взаимодействующих с поверхностью клетки СНО-К1, происходил разрыв клеточной мембраны и на поверхность клетки-мишени (обычно в районе расположения ее ядра) выплескивался клубок тонких деспирализирующихся нитей хроматина (рис. 6, а—е).

Проникновение клетки-реставратора может сопровождаться разрушением ограниченного участка мембраны клетки СНО-К1, и хроматин контактирующей клетки эмбриональной печени проникает в цитоплазму, а затем и в ядро в виде тонкой струи (рис. 6, г—е). В случае значительного удаления ядра клетки-мишени от места контакта можно было наблюдать довольно протяженный тяж хрома-

тина ядра контактирующей клетки, который передвигался на значительное расстояние по цитоплазме СНО-К1, направляясь к ее ядру (рис. 6, ж).

Наблюдениями с использованием цейтраферной фоторегистрации взаимодействия ядер двух клеток в течение 2,5—3 ч установлено, что активно передвигается в цитоплазме только вошедшее ядро, но иногда отмечаются встречное смещение ядра клетки-мишени, а также случаи его удаления от контакта. В месте контакта двух ядер происходят лизис участка ядерной мембраны клетки-хозяйина и проникновение внутрь него хроматиновых нитей из вошедшего ядра. Полному слиянию хроматинов двух ядер всегда предшествовал этап постепенной деконденсации хроматина вошедшего ядра, пока хроматин обоих ядер не становился морфологически однородным. В течение некоторого времени на фоне интерфазного ядра клетки СНО-К1 еще виден более компактный, интенсивнее окрашенный хроматин вошедшего ядра (рис. 6, з). Клетки эмбриональной печени проявляли повышенную адгезивность в отношении культуральных клеток и сливались с последними независимо от стадии клеточного цикла, на котором они находились. Неоднократно отмечалось их проникновение в клетки СНО-К1 и L-M (TK⁻, APRT⁻), находящиеся на стадии метафазы клеточного цикла.

Мы предположили, что такое взаимодействие может выполнять «исправительные функции» — донорская клетка, непосредственно стволовая или производная от стволовой, передавая часть своего генетического материала (в этом случае не в копии, а в виде непосредственно хромосомного), обеспечивает замещение им части генома реципиента. По сути процесса это будет своеобразная генетическая реставрация и клетки, обеспечивающие такое, могут быть названы реставраторами. Наиболее существенно здесь то, что имеет место не замещение поврежденной клетки полноценной, производной от стволовой, а ее восстановление. Крайним проявлением такого восстановления будет полное ядерное замещение. Его элементы можно наблюдать как на фиксированных и затем окрашенных, так и на прижизненно окрашенных препаратах (рис. 6, и) *ex vivo*.

В отдельных случаях при таком типе взаимодействий наблюдается смещение ядра клетки-мишени в сторону, противоположную от вошедшего ядра, изгибание его поверхности и приобретение формы боба (рис. 6, и). На более поздних этапах

подобного взаимодействия ядро клетки СНО-К1 теряет свою структурированность и начинает гомогенно окрашиваться, как это характерно для пикнотических ядер. В то же время хроматин вошедшего ядра клетки-реставратора сначала выглядит, как клубок плотно конденсированных хромосом, затем ядро увеличивается в размерах, а его хроматиновые нити теряют свою базофильность и ядро приобретает структуру, характерную для интерфазных ядер.

Ядерное замещение может обеспечить полное восстановление клеток без изменения архитектуры ткани. В своей совокупности локальный и дистанционный перенос генетического материала создают единое внутриорганизменное информационное пространство. И хотя оно обеспечивается самими клетками (в том числе и стволовыми), оно по своим возможностям и последствиям принципиально отличается от возможностей и последствий, реализуемых стволовыми клетками в их современном общепризнанном понимании.

Принято считать, что стволовые клетки через их производные замещают отмершие или добавляют новые к уже имеющимся. Так оно и есть. Но не только так. Функционирование информационного пространства, в котором стволовые клетки и их производные тоже участвуют, но уже как реставраторы, обеспечивает не замещение (или добавление) клеток (вернее, не только замещение и добавление), а их сохранение, восстановление без изменения архитектуры ткани и органа. Это особенно важно для клеток долгоживущих, образующих сложную архитектуру ткани, например, головного мозга. Если клетка погибла — ее надо заменить. И это выполняется именно по принципу замещения. Но если клетка повреждена и ее геном уже не может обеспечивать нормальное функционирование, то не дать ей погибнуть, реставрировать ее наследственный аппарат — это значит сохранить архитектуру ткани. Оба процесса необходимы для поддержания жизнеспособности и целостности организма. Пока общепринятым является только один из них — замещение/добавление. Мы описываем феноменологию, постулируем процесс и предлагаем второй вариант клеточного сохранения. Как все принципиально новое, наша концепция начинается с начала. Как всегда, вначале вопросов больше, чем возможных ответов. На то оно и начало. Иначе не бывает.

V. A. Kordyum, S. P. Shpilevaya, T. O. Ruban, O. M. Sukhorada

The concept of genetic material exchange between mammalian cells

Summary

The concept presented is confirmed by both direct experiments on the genetic markers transfer and microscopic observations. The authors formulate an idea that there is a universal informational space of the organism, created due to the DNA release within the lifetime of cells without destroying their genomes (and DNA absorption, complementing the mutations) or due to the addressed transfer of genetic material by specialized cells.

Key words: genetic information transfer, cells interaction.

B. A. Кордюм, С. П. Шпилева, Т. А. Рубан, О. М. Сухорада

Концепція обміну генетичним матеріалом між клітинами ссавців

Резюме

Представлено концепцію обміну генетичним матеріалом між клітинами ссавців, яку підтверджено як безпосередніми експериментами з переносу генетичних маркерів, так і прямими мікроскопічними спостереженнями. Формується уявлення про існування в організмі єдиного інформаційного простору, створеного за рахунок прижиттєвого виділення ДНК клітинами без порушення їхніх геномів (і її поглинання, яке комплементує мутації) або адресної передачі генетичного матеріалу спеціалізованими клітинами.

Ключові слова: перенос генетичної інформації, взаємодія клітин.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Кордюм В. А. Наша шагреневая кожа — это наша проблема. Нам ее и решать. 3. Недостающее звено // Биополимеры и клетка.—2003.—19.—С. 473—491.
2. Kordyum V., Sukhorada O., Ruban T., Shpilevaya S., Andrienko V., Deryabina O. Transfer of genetic information in an organism // First Ukr. Congr. for Cell Biol.—Lviv, 2004.—P. 146.
3. Shpilevaya S. P., Andrienko V. I., Sukhorada O. M., Ruban T. A., Deryabina O. G., Likhacheva L. L., Irodov D. M., Kordyum V. A. Interaction of mouse fetal liver cells with CHO-K1 cells *in vitro* accompanying with genetic information transfer // Joint Meeting «Tissue Engineering Society International» and «European Tissue Engineering Society»: Abstract book.—Lausanne, 2004.—P. 229.
4. Шпилева С. П., Андриенко В. И., Рубан Т. А., Сухорада Е. М., Иродов Д. М., Кордюм В. А. Взаимодействие эмбриональных клеток печени мыши с клетками CHO-1 // Фактори експериментальної еволюції організмів.—Київ, 2004.—Т. 2.—С. 83—87.
5. Sukhorada O., Ruban T., Deryabina O., Toporova O., Kordyum V. Transformation of mammalian cells during interaction of two partners consisting of different cells: Abstracts XXX Annu. ESAO Congr. // Int. J. Artificial Organs.—2004.—27.—2004.—P. 608.
6. Кордюм В. А., Шпилева С. П., Рубан Т. А., Сухорада Е. М., Андриенко В. И. Автотрансформация клеток млекопитающих // Биополимеры и клетка.—2005.—21.—С. 120—126.
7. Kordyum V., Shpilevaya S., Andrienko V., Sukhorada O., Ruban T., Deryabina O. Transfer of genetic information in an organism // Cell Biol. Int.—2005.—29.—P. 95—97.
8. Кордюм В. А., Топорова Е. К., Окунев О. В., Похолоденко

Я. А., Сухорада Е. М., Рубан Т. А., Андриенко В. И., Иродов Д. М. Новая множественно маркированная линия клеток — производная от CHO-K1 // Биополимеры и клетка.—2003.—19.—С. 252—258.

9. Похолоденко Я. А., Сухорада О. М., Рубан Т. О., Топорова О. К., Окунев О. В., Андриенко В. И., Кордюм В. А. Створення трансгенних субліній ссавців з множинними маркерами селекції // Фактори експериментальної еволюції організмів.—Київ: Аграр. наука, 2003.—С. 399—404.
10. Baraldi P. G., Bovero A., Frutarolo F., Preti D., Tabrizi M. A., Pavani M. G., Romagnoli R. DNA minor groove binders as potential antitumor and antimicrobial agents // Med. Res. Rev.—2004.—24.—P. 475—528.
11. Loken M. R. Separation of viable T and B lymphocytes using a cytochemical stain, Hoechst 33342 // J. Histochem. and Cytochem.—1980.—28.—P. 36—39.
12. Loken M. R. Simultaneous quantitation of Hoechst 33342 and immunofluorescence on viable cells using a fluorescence activated cell sorter // Cytometry.—1980.—1.—P. 136—142.
13. Goodell M. A., Brose K., Paradis G., Conner A. S., Mulligan R. C. Isolation and functional properties of murine hematopoietic stem cells that are replicating *in vivo* // J. Exp. Med.—1996.—183.—P. 1797—1806.
14. Berardi A. C., Wang A., Levine J. D., Lopez P., Scadden D. T. Functional isolation and characterization of human hematopoietic stem cells // Science.—1995.—267.—P. 104—108.
15. Культура животных клеток. Методы.—М.: Мир, 1989.—332 с.
16. Shimizu N., Iton N., Utiyama H., Wahl G. M. Selective entrapment extrachromosomally amplified DNA by nuclear budding and micronucleation during S phase // J. Cell Biol.—1998.—140.—P. 1307—1320.
17. Sait S. N. J., Qadir M. U., Cnroy J. M., Matsui S.-I., Novak N. J., Baer M. R. Double minute chromosomes in acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome: identification of new amplification region by fluorescence *in situ* hybridization and spectral karyotyping // Genes, Chromosomes and Cancer.—2002.—34.—P. 42—47.
18. Stark G. R. Regulation and mechanisms of mammalian gene amplification // Adv. Cancer Res.—1993.—61.—P. 87—113.
19. Курчатова С. Ю., Куреев И. И., Поляков И. Ю. Исследование локальной реорганизации ядерной оболочки, выявляемой при гипотонической обработке живых клеток, находящихся в S-фазе клеточного цикла // Микроскопические исследования.—М.: Изд-во МГУ, 2004.—С. 20—30.
20. Gall J. G., Rochaix J.-D. The amplified ribosomal DNA of Dytiscid beetles // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1974.—71.—P. 1819—1823.
21. Копнин Б. П., Гудков А. В. Амплификация участков генома в соматических клетках млекопитающих, устойчивых к колхицину. III // Генетика.—1982.—18.—С. 1683—1692.
22. Лилли Р. Патологическая техника и практическая гистохимия.—М.: Мир, 1969.—645 с.
23. Lalande M. E., Miller R. G. Fluorescence flow analysis of lymphocyte activation using Hoechst 33342 dye // J. Histochem. and Cytochem.—1979.—27.—P. 394—397.

УДК 577.24
Надійшла до редакції 20.12.04