

Экспериментальная обработка методов введения

кишечного эпителия в культуру

А.П.КОШЕЛЬ, Н.В.СЕВОСТЬЯНОВА, К.А.НЕЧАЕВ, С.С.КЛОКОВ, А.В.КАРПОВИЧ,
И.В.ПАНКРАТОВ, С.И.МАРТОВ, Е.В.ЗАЛЕСНАЯ

Experimental work through of the in-culture introduction techniques for intestinal epithelium

A.P.KOSHEL', N.V.SEVOST'YANOVA, K.A.NECHAEV, S.S.KLOKOV, A.V.KARPOVICH,
I.V.PANKRATOV, S.I.MARTOV, E.V.ZALESNAJA

НИИ гастроэнтерологии им. Г.К.Жерлова Сибирского государственного медицинского университета

Исследование «рака» подразумевает изучение опухолей эпителиального происхождения, что определяет приоритет направления исследования в системе «эпителий-строма». Значимость «эпителиального» компонента подтверждается многочисленными исследованиями, однако литературные данные свидетельствуют о зависимости состояния эпителия от соединительнотканной основы. Проведенный эксперимент свидетельствует, о том что для установления культуры клеток эпителия толстой кишки наиболее оптимальным оказалось использование первичной плотности посева не менее 3×10^6 клеток на лунку. Благоприятным эффектом на культивируемые клетки обладает введение в культуру подложки из коллагена I типа, что способствует стабилизации культуры и фактора роста эпителия (EGF), который способствует адаптации пролиферативного потенциала к условиям *ex vivo*.

Ключевые слова: хирургическое лечение, рак толстой кишки, экспериментальная хирургия

The investigation of "cancer" implies the study of epithelial tumors that determines the major priority of research in "epithelium-stroma" system. The value of the "epithelial" component is proved by numerous studies however published data testifies to dependence of epithelium condition on connective tissue base. The conducted experiment shows that usage of the primary density of plating no less then 3×10^6 units per socket is the most appropriate for large intestine epithelial cell culture establishment. The in-culture introduction of collagen type I substrate has a favorable effect on cultured cells that contributes to stabilization of the culture and epithelial growth factor (EGF) production which assists proliferative potential adaptation to *ex vivo* conditions.

Key words: surgical treatment, large intestine cancer, experimental surgery

Понимание природы опухолевого роста стало принимать более очерченные формы благодаря взрывоподобному развитию молекулярной, клеточной биологии и онкологии [3]. В большинстве случаев исследование «рака» подразумевает изучение опухолей эпителиального происхождения, что определяет приоритет направления исследования в системе «эпителий-строма» [1]. Значимость «эпителиального» компонента подтверждается многочисленными исследованиями [4], однако литературные данные свидетельствуют о зависимости состояния эпителия от соединительнотканной основы. Эксперименты демонстрируют, что населяющие опухоль фибробласты отличаются от своих «нормальных» гомологов и также играют активную роль в процессе канцерогенеза. Развитие выраженного неопластического статуса возможно лишь при совместном культивировании клеток с фибробластами, полученными из опухоли, а сокультивирование с нормальными клетками не приводит к прогрессии малигнизации [2].

Таким образом, для изучения инициации феномена «геномной нестабильности», характерного для

опухолевого процесса и поиска достоверных молекулярных маркеров прогресса неоплазии необходима разработка прогностической модели «эпителиальный компонент»-«стромальный компонент», основанной на исследованиях с использованием культуры клеток и тканей опухоли.

Целью работы явилось экспериментальное установление наиболее оптимальной процедуры введения кишечного эпителия и выделения суспензии клеток из операционного материала, максимально способствующий сохранению жизнеспособности клеток. При этом были отработаны методы механической, ферментативной и смешанной диссоциации.

Материалы и методы

Для обработки операционного материала и последующего установления первичной культуры использовали различные модификации методики, предложенной Kalabis J. и соавторами [5].

Просвет фрагмента толстой кишки при оперативном вмешательстве у онкологических пациентов вскрывался и трехкратно отмывался стерильным 0,9%

раствором натрия хлорида. После этого, стерильными ножницами вырезали фрагмент слизистой площадью около 2,0-3,0 см² и помещали его в транспортную среду, содержащую смесь пенициллина и стрептомицина в концентрациях 500 Ед/мл и 0,5 мг/мл, соответственно. Доставка в лабораторию осуществлялась при условии неглубокого охлаждения. Затем полученный материал трехкратно отмывали стерильным сбалансированным солевым раствором Хэнкса (HBSS) («Биолот», Новосибирск, Россия), в течение 10 минут инкубировали в среде, содержащей 20 мг/мл Mucosust (Sigma, St. Louis, MO) для удаления поверхностной слизи. После окончания этой процедуры материал измельчали стерильными ножницами, а полученные крупные агрегаты разбивали пипетированием. Полученную грубую суспензию фильтровали через нейлоновые фильтры (BD Bioscience, UK) с уменьшающимся диаметром пор (100-70-40 мкм). Полученную тонкую суспензию трехкратно отмывали в стерильном HBSS, центрифугировали и доводили до объема 1,0 мл. Подсчет клеточности и жизнеспособности осуществляли в камере Горяева по стандартной методике исключения трипанового синего.

Результаты. Для ферментативной обработки тканевого материала использовали смесь коллагеназы – трипсина – ЭДТА в концентрациях 0,2 мг/мл, 0,01 мг/мл и 0,1 мМ, соответственно. Для эксперимента были использованы аналогичные фрагменты ткани. Полученный материал трехкратно отмывали стерильным HBSS и в течение 10 минут инкубировали в среде, содержащей 20 мг/мл Mucosust (Sigma, St. Louis, MO) для удаления поверхностной слизи. На следующем этапе фрагменты ткани инкубировали в вышеописанной смеси реагентов при температуре 37 градусов, начиная с 3 до 40 минут с десятиминутным интервалом. При наступлении контрольной точки материал интенсивно обмывался, клеточный материал собирался в пробирки (рис. 1). Активность ферментов гасили внесением в инкубационную среду избытка ЭТС. Суспензию центрифугировали в течение 10 минут при



Рис 1. Первичная культура эпителиальных клеток тонкой кишки. Плотность посева 3×10^6 , увеличение 160.

скорости 1500 об./мин. Супернатант удаляли, осадок отмывали HBSS, объем суспензии доводили до 1 миллилитра. Подсчет клеточности и жизнеспособности осуществляли по стандартным методикам. Третий блок экспериментальных работ представлял собой сочетание двух предыдущих и был назван «смешанный» (рис. 2). Полученные результаты представлены в таблице 1.

Второй блок экспериментальных работ имел своей целью определить наиболее оптимальную концентрацию клеток для установления первичной культуры, выбор базисной среды, состав полной культуральной среды и характер покрытия культуральной посуды. По результатам предыдущего блока экспериментов было решено осуществлять выделение клеточной суспензии путём механической диссоциации

Для этого блока работ в качестве базисных сред были использованы DMEM, RPMI-1640, MEM и 199 среды «Биолот» (Новосибирск, Россия). Для выявления оптимальной плотности посева на базе этих сред были приготовлены полные среды, содержащие, помимо базисного компонента 15% по объёму ЭТС, 100 Ед/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина, 146 мг/100мл L-глутамина. Посев осуществляли в 6-ти луночные планшеты (Orange Scientific, Belgium) при первичной плотности посева $1,0 \times 10^6$, $1,5 \times 10^6$, $2,0 \times 10^6$, $2,5 \times 10^6$, $3,0 \times 10^6$, $3,5 \times 10^6$ клеток на лунку. Посев осуществляли в необработанную посуду. В течение первых суток культивирования отмечалось прикрепление клеток ко дну лунки, однако, даже при незначительном механическом воздействии клетки откреплялись от субстрата. Первая смена среды следовала через сутки культивирования, это оправдано тем, что при этом из культуры удаляются неприкрепленные и погибшие клетки. Было отмечено, что независимо от плотности посева через сутки культивирования из лунки удаляется порядка $370-480 \times 10^3$ клеток.

Дальнейшее ведение культур осуществлялось при полукондиционных условиях с двукратной в течение недели заменой среды (через 72 часа). После пер-



Рис 2. Первичная культура эпителиальных клеток толстой кишки. Плотность посева 3×10^6 , увеличение 160.

Таблица 1

Характеристика методов выделения клеток по выходу и жизнеспособности клеточного материала

Метод обработки материала	Пробы	Клеточность материала (млн/ мл)/ жизнеспособность (%)	Среднее арифметическое клеточности материала и жизнеспособности
Механический	Проба 1	12,3 / 89	13,00 / 82,5
	Проба 2	14,6 / 82	
	Проба 3	12,9 / 74	
	Проба 4	12,2 / 85	
Ферментативный	Проба 1 3 минуты	1,7 / 97	2,30 / 93,75
	Проба 2 3 минуты	2,1 / 94	
	Проба 3 3 минуты	2,3 / 92	
	Проба 4 3 минуты	3,1 / 92	
	Проба 1 10 минут	6,7 / 87	6,52 / 87,25
	Проба 2 10 минут	6,4 / 89	
	Проба 3 10 минут	7,6 / 86	
	Проба 4 10 минут	5,4 / 87	
	Проба 1 20 минут	8,6 / 84	7,95 / 78,50
	Проба 2 20 минут	8,1 / 76	
	Проба 3 20 минут	7,7 / 78	
	Проба 4 20 минут	7,4 / 76	
	Проба 1 30 минут	11,7 / 63	11,75 / 63,00
	Проба 2 30 минут	12,1 / 60	
	Проба 3 30 минут	11,8 / 73	
	Проба 4 30 минут	11,4 / 56	
	Проба 1 40 минут	15,8 / 43	16,37 / 45,50
	Проба 2 40 минут	16,2 / 49	
	Проба 3 40 минут	16,4 / 34	
	Проба 4 40 минут	17,1 / 56	
Смешанный	Проба 1 3 минуты	4,3 / 89	4,62 / 91
	Проба 2 3 минуты	3,5 / 92	
	Проба 3 3 минуты	5,1 / 90	
	Проба 4 3 минуты	5,6 / 93	
	Проба 1 10 минут	8,4 / 78	8,92 / 80,50
	Проба 2 10 минут	9,2 / 74	
	Проба 3 10 минут	8,7 / 84	
	Проба 4 10 минут	9,4 / 86	
	Проба 1 20 минут	11,2 / 63	11,8 / 65,25
	Проба 2 20 минут	12,4 / 67	
	Проба 3 20 минут	11,5 / 70	
	Проба 4 20 минут	12,1 / 61	
	Проба 1 30 минут	13,1 / 54	12,82 / 56,75
	Проба 2 30 минут	12,1 / 60	
	Проба 3 30 минут	12,4 / 56	
	Проба 4 30 минут	13,7 / 57	
	Проба 1 40 минут	12,2 / 54	12,32 / 45,50
	Проба 2 40 минут	12,3 / 45	
	Проба 3 40 минут	12,7 / 34	
	Проба 4 40 минут	12,1 / 49	

вой недели культивирования был проведён сводный анализ, включавший морфологическое описание, подсчёт клеточности и жизнеспособности (рис. 3).

Для сравнения экспериментальные работы аналогичного дизайна были проведены для полных сред

с добавлением 10 нг/мл фактора роста эпителия (EGF). Посев осуществляли в 6-ти луночные планшеты (Orange Scientific, Belgium) при первичной плотности посева $1,0 \times 10^6$, $1,5 \times 10^6$, $2,0 \times 10^6$, $2,5 \times 10^6$, $3,0 \times 10^6$, $3,5 \times 10^6$ клеток на лунку. Посев осуществляли в необработанные

Таблица 2

Поддержание клеточных культур и пролиферативная активность

Плотность посева	Пролиферация (DMEM)	Пролиферация (199)
$1,0 \times 10^6$	$5,4 \times 10^6$	$6,2 \times 10^6$
$1,5 \times 10^6$	$7,0 \times 10^6$	$8,7 \times 10^6$
$2,0 \times 10^6$	$8,2 \times 10^6$	$6,5 \times 10^6$
$2,5 \times 10^6$	$8,7 \times 10^6$	$9,1 \times 10^6$
$3,0 \times 10^6$	$9,6 \times 10^6$	$9,4 \times 10^6$
$3,5 \times 10^6$	$10,4 \times 10^6$	$11,7 \times 10^6$

Таблица 3

Поддержание клеточных культур и пролиферативная активность

Плотность посева	Пролиферация (DMEM)	Пролиферация (199)
$1,0 \times 10^6$	$8,1 \times 10^6$	$7,3 \times 10^6$
$1,5 \times 10^6$	$8,8 \times 10^6$	$8,7 \times 10^6$
$2,0 \times 10^6$	$10,4 \times 10^6$	$9,6 \times 10^6$
$2,5 \times 10^6$	$11,5 \times 10^6$	$11,3 \times 10^6$
$3,0 \times 10^6$	$11,9 \times 10^6$	$11,7 \times 10^6$
$3,5 \times 10^6$	$14,4 \times 10^6$	$11,1 \times 10^6$



Рис 3. Первичная культура эпителиальных клеток толстой кишки. Плотность посева 1×10^6 , 72 часа культивирования на подложке: коллаген I типа и в присутствии EGF увеличение 160. Заметно более диффузное распределение клеточного материала по площади культуральной посуды.



Рис 4. Первичная культура эпителиальных клеток толстой кишки. Плотность посева 3×10^6 , 72 часа культивирования в присутствии подложки: коллаген I типа и EGF, увеличение 160. В поле зрения визуализируются элементы организации в виде островков пролиферации.

ную посуду. Так же, как и в предыдущем случае, достаточной степени прикрепление было отмечено не ранее чем на вторые сутки культивирования. Первая смена среды осуществлялась на первые сутки, дальнейшее ведение – при полукондиционных условиях с заменой среды каждые 72 часа.

Эксперименты с вышеперечисленными средами и фактором роста эпителия были выполнены и при условии покрытия дна посуды коллагеном I типа (рис. 4). Коллаген I типа выделяли из хрящей крысиных хвостов и обрабатывали в соответствии с рекомендациями Вильсон и соавторов. Для дальнейшего использования отбирали аликвоту в 0,5 миллилитров и обрабатывали дно посуды, после чего поверхность подвергали воздействию паров концентрированного гидроксида аммония в течение 10 минут. Обработанную таким образом поверхность прикрывали средой

MEM, содержащей 8% сыворотки до использования. Дизайн эксперимента не отличался от предыдущих, были использованы те же варианты сред и комбинация с EGF.

При сравнении эффективности ведения культур клеток на разных средах было выявлено следующее: наилучшими вариантами для поддержания культур клеток показали себя среды, приготовленные на базе DMEM и 199. В этих средах, по окончании недельного срока культивирования, прирост клеток был наибольшим (табл. 2). Еще больший эффект пролиферации был отмечен при сочетании сред с EGF (10 мкг/мл) (табл. 3). Исходя из полученных результатов, дальнейшее ведение исследований было решено проводить с использованием сред на базе DMEM с внесением в смесь 10 мкг/ EGF (рис. 4).

Выводы

1. Для введения кишечного эпителия была установлена культура клеток эпителия толстой кишки оптимальным на наш взгляд, оказалось использование первичной плотности посева не менее 3×10^6 клеток на лунку. Благоприятным эффектом на культивируемые клетки обладает введение в культуру подложки из коллагена I типа, что способствует стабилизации культуры и фактора роста эпителия (EGF), который способствует адаптации пролиферативного потенциала к условиям *ex vivo*.

2. Работа выполнена при поддержке ФЦП «Проведение поисковых научно-исследовательских работ по направлению «Физико-химическая молекулярная и клеточная биология» направления 1 «Стимулирование закрепления молодежи в сфере науки, образования и высоких технологий» федеральной целевой программы «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009–2013 годы. ГК № П805 от 17.08.2009 г.

Список литературы

1. *Адамс Р.* Методы культуры клеток для биохимиков: Пер. с англ. М.: Мир. 1983; 257.
2. *Аруин Л.И., Капуллер Л.Л., Исаков В.А.* Морфологическая диагностика болезней желудка и кишечника. М.: Триада-Х. 1998; 80-85, 272.
3. *Имянитов Е.Н., Хансон К.П.* Молекулярная генетика в клинической онкологии. Сибирский онкологический журнал. 2004; 2-3: 40-47.
4. *Имянитов Е.Н., Хансон К.П.* Фундаментальная онкология: наиболее примечательные события 2004 года. Практическая онкология. 2005; 6: 1: 32-35.
5. *Kalabis J., Patterson M.J., Enders J.H., Marian B. et al.* Stimulation of human colonic epithelial cells by leukemia inhibitory factor is dependent on collagen-embedded fibroblasts in organotypic culture. The FASEB J. 2003; 244.

Поступила 27.03.2011 г.

Информация об авторах

1. Кошель Андрей Петрович – д.м.н., проф., директор НИИ гастроэнтерологии им. Г.К.Жерлова Сибирского государственного медицинского университета, г. Северск; e-mail: sev_nv@mail.ru
2. Севостьянова Наталия Владимировна – зам. директора НИИ гастроэнтерологии им. Г.К.Жерлова Сибирского государственного медицинского университета по научной работе, г. Северск, доктор медицинских наук, профессор; e-mail: sev_nv@mail.ru
3. Клоков Сергей Сергеевич – к.м.н., зам. директора НИИ гастроэнтерологии им. Г.К.Жерлова Сибирского государственного медицинского университета по клинической работе; e-mail: sev_nv@mail.ru
4. Карпович Александр Викторович – старший научный сотрудник НИИ гастроэнтерологии им. Г.К.Жерлова Сибирского государственного медицинского университета, г. Северск; e-mail: sev_nv@mail.ru
5. Мартов Сергей Иванович – аспирант НИИ гастроэнтерологии им. Г.К.Жерлова Сибирского государственного медицинского университета, г. Северск; e-mail: sev_nv@mail.ru
6. Нечаев Кирилл Андреевич – аспирант НИИ гастроэнтерологии им. Г.К.Жерлова Сибирского государственного медицинского университета, г. Северск; e-mail: sev_nv@mail.ru
7. Карпович Александр Викторович – научный сотрудник НИИ гастроэнтерологии им. Г.К.Жерлова Сибирского государственного медицинского университета, г. Северск; e-mail: sev_nv@mail.ru
8. Панкратов Иван Владимирович – научный сотрудник ИИ гастроэнтерологии им. Г.К.Жерлова Сибирского государственного медицинского университета, г. Северск; e-mail: sev_nv@mail.ru
9. Залесная Елена Владимировна – аспирант НИИ гастроэнтерологии им. Г.К.Жерлова Сибирского государственного медицинского университета, г. Северск; e-mail: sev_nv@mail.ru