

# Медицина

---

УДК 57.085.23

Буланин Д.С., Аскарова Ш.Н., Яңын Ж.И., Адамбеков Ш.К., Жанбосинов А.Ж.

## СОВРЕМЕННЫЕ МЕТОДЫ ВЫДЕЛЕНИЯ И КУЛЬТИВИРОВАНИЯ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК КОЛОРЕКТАЛЬНОГО ОТДЕЛА КИШЕЧНИКА

Центр наук о жизни, Назарбаев Университет, Астана

Взрослые стволовые клетки, присутствующие в организме человека, имеют большой потенциал в качестве аутологичного материала для трансплантации при различных заболеваниях. Однако для сохранения мультипотентности и пролиферативного потенциала клеток необходимы четко разработанные протоколы их выделения и культивирования. Исходя из вышеуказанного, целью настоящего исследования явилась оптимизация методов выделения стволовых клеток эпителия толстого кишечника, и их дальнейшая характеристика. В работе были использованы оригинальные методы выделения, культивирования и дифференцировки кишечных стволовых клеток. Анализ клеточной популяции проводился с применением техники проточной цитофлюорометрии. В результате проведенных исследований была выделена популяция клеток эпителия толстого кишечника, способная сохранять пролиферативные свойства *in vitro* и дифференцироваться в энтероцитоподобные клетки; кроме того, были идентифицированы некоторые специфичные маркеры стволовых клеток. Полученные результаты обладают несомненной научной и практической значимостью, так как могут быть использованы для дальнейших исследований в области биологии кишечных стволовых клеток, а также внедрены в практическое здравоохранение для лечения некоторых заболеваний желудочно-кишечного тракта.

Взрослые стволовые клетки, ответственные за физиологическую и репаративную регенерацию органов и тканей человека и животных, обладают большим пролиферативным потенциалом и способностью дифференцироваться в другие клеточные линии органа, из которого они выделены [1]. Одной из разновидностей взрослых стволовых клеток являются стволовые клетки кишечника, которые располагаются в основании крипты и дают начало всем остальным типам клеток кишечного эпителия [2, 3].

Было показано, что сигнальный каскад Wingless (Wg) является ключевым регулятором обновления эпителия тонкого кишечника [3], и блокировка Wg каскада приводит к потере клеточной пролиферации и полной деградации эпителия [4]. Wg является активатором множества генов, специфично экспрессирующихся в кишечнике [5], из которых только сравнительно небольшая группа генов активируется в клетках, расположенных в основании крипты [6]. Один из них *lgr5* является уникальным маркером кишечных стволовых клеток, так как клетки, несущие этот маркер, могут дифференцироваться во все типы клеток кишечного эпителия [3]. Необходимо отметить, все вышеизложенные результаты относятся исключительно к стволовым клеткам, выделенным из тонкого кишечника, в то время как стволовые клетки колоректального отдела кишечника нуждаются в дальнейших исследованиях. Исходя из вышеизложенного, целью данного исследования явилось выделение клеток эпителия колоректального отдела кишечника, экспрессирующих *lgr5*, их культивирование и анализ на наличие специфичных маркеров стволовых клеток.

### Материалы и методы

#### 2.1 Выделение и культивирование стволовых клеток эпителия толстого кишечника мыши

Выделение клеток из кишечника мыши осуществлялось с использованием трипсина и коллагеназы II (1мг/мл) по ранее описанному методу (7). Мыши (дикий тип C57Bl6) забивались, проводилось вскрытие брюшной полости с последующим извлечением колоректального отдела кишечника. Отмытый кишечник измельчали до порошкообразного состояния. Кусочки ткани З

раза обрабатывались коллагеназой II и трипсином, центрифугировались, после чего выделенная клеточная фракция высевалась на чашки Петри, содержащие фидерные (поддерживающие) клетки, представляющие собой облученные клетки линии LA7. При последующем пересеве, питательную среду аспирировали и клетки отмывали в EBSS + EGTA (1мМ) + Непес (1%). Затем клетки инкубировались 10 минут в растворе трипсина, промывались и переносились в полную среду для дальнейшего культивирования.

## 2.2 Иммуногистохимический анализ

Клетки фиксировались в 4% растворе формальдегида, промывались несколько раз в растворе PBS, после чего инкубировались в растворе первичных антител к специальному для энteroцитов маркеру вилину (villin), с последующим добавлением вторичных флуоресцентных антител.

## 2.3 Проточная цитофлуориметрия

Клетки инкубировались в 0,25% растворе трипсина в течение 10 минут, промывались и распределялись равными объемами в пробирки с окружным донышком из расчета 400тыс – 1 млн клеток на одну реакцию. Клеточный осадок растворялся в 50-100 мкл буфера для проточной цитофлуориметрии. Необходимый объем антител растворялся в 50-100 мкл буфера для проточной цитофлуориметрии, смешивался с суспензией клеток и инкубировался на льду в течение 1 часа. На последнем этапе, клеточный раствор пропускался через фильтр для удаления клеточных сгустков и помещался в поточного цитофлюориметр FACS Aria II для дальнейшего анализа.

## Результаты и обсуждение

### 3.1 Выделение стволовых клеток эпителия кишечника

Как уже упоминалось, клетки, выделенные из кишечника, высаживались в культуру фидерных клеток, после чего их рост наблюдался на протяжении 3-4 недель. Согласно проведенным наблюдениям рост клеток происходит путем внедрения стволовых клеток между фидерными клетками, а не на их поверхности; стволовые клетки образуют компактные колонии, которые растут как монослои на поверхности матраса в окружении фидерных клеток (рисунок 1). Последняя характеристика чрезвычайно важна, так как стволовые клетки, выделенные из желудка и пищевода, растут как многослойные колонии. На рисунке 1 показаны колонии клеток на 6, 10, 14 и 21 день культивирования. Клетки сохраняют пролиферативную активность и недифференцированное состояние на протяжении 11-ти пересевов. Это доказывает, что данные клетки сохраняют пролиферативный потенциал, присущий стволовым клеткам в условиях *in vitro*.

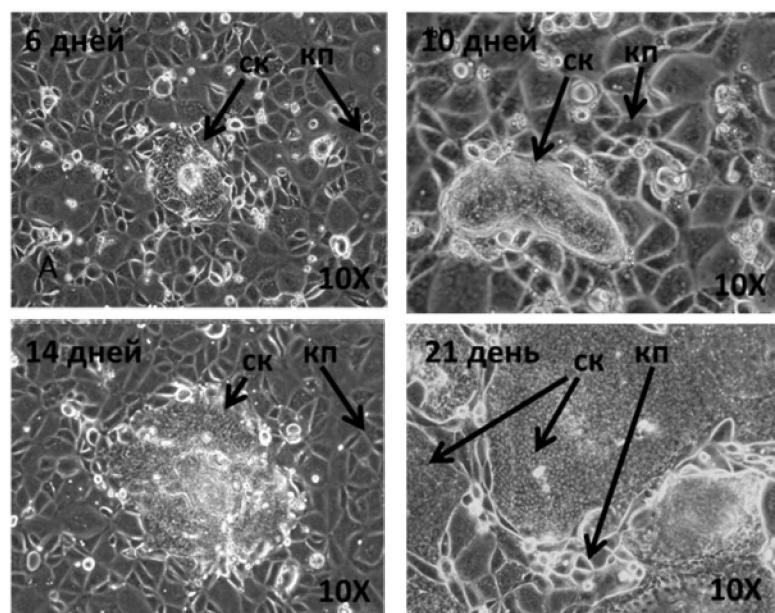


Рис. 1. Стволовые клетки кишечника (ск), выращиваемые *in vitro* с использованием фидерных клеток (кп)

### 3.2 дифференцировка клеток кишечного эпителия

Для дальнейшего доказательства стволовой природы выделенных клеток необходимо проанализировать их способность к дифференцировке в клеточные линии, в норме присутствующие в стенке кишечника, включая бокаловидные клетки, энteroэндокринные клетки и т.д. Одним из методов клеточной дифференцировки *in vitro* является использование матригеля (Matrigel, Invitrogen, USA), который содержит набор стандартных факторов дифференцировки и имеет способность затвердевать при температуре 37°C. Для оценки способности выделенных клеток к дифференцировке матригель использовался в комбинации с полной питательной средой.

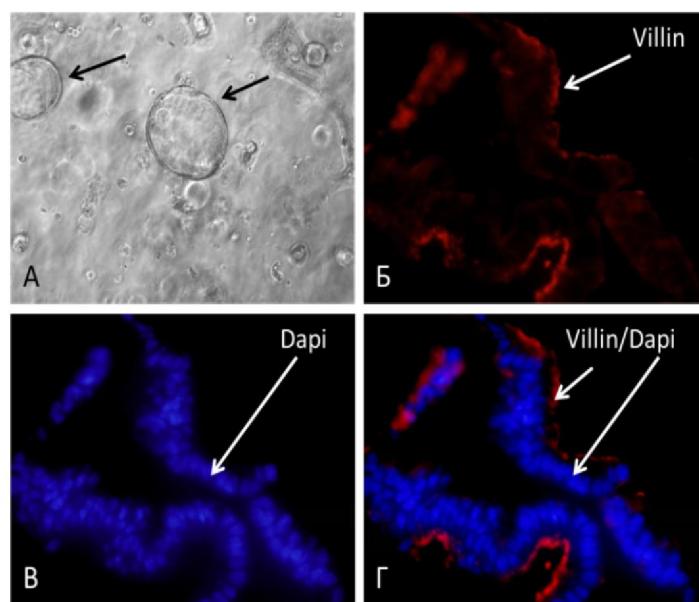


Рис. 2. Дифференцировка стволовых клеток кишечника с использованием матригеля.

На рисунке 2А изображена сферическая структура, состоящая из клеток, делящихся в матригеле, и представляющая собой промежуточный этап дифференцировки клеток. Результаты иммуногистохимического анализа выявили группу клеток, экспрессировавших специфичный для энteroцитов маркер Villin (рис. 2. Б, В, Г), что свидетельствовало об успешной дифференцировке исследуемых клеток в культуре. Исходя из того факта, что энteroциты являются высоко-дифференцированными клетками, в норме присутствующими в стенке кишечника, можно с высокой вероятностью заключить, что выделенные нами клетки являются стволовыми.

### 3.3 Поиск потенциальных маркеров стволовых клеток кишечника

Поиск маркеров различных стволовых клеток является важным элементом для последующей характеристики этих клеток и разработки потенциальных терапевтических методов. Наличие специфичных маркеров облегчает процесс выделения и культивирования стволовых клеток, а также ускоряет экспериментальный процесс. Скрининг маркеров осуществляется методом проточной цитометрии, который позволяет разделять и анализировать клетки в зависимости от их размера, формы, а также наличия флуоресцентных меток на их поверхности. Флуоресцентное мечение клеток осуществляется с помощью флуоресцентных антител к специфичным маркерам, которые могут присутствовать на поверхности изучаемых клеток. Подбор маркеров проводился на основании уже имеющихся сведений, полученных для других типов клеток.

В ходе эксперимента был проведен скрининг 11 различных маркеров, специфично экспрессирующихся на поверхности стволовых клеток различных тканей, с целью выявления маркеров, специфичных для стволовых клеток кишечного эпителия. Эксперимент был проведен в трех повторностях с использованием трех различных линий стволовых клеток. Клеточные культуры подвергались 5, 7 и 8 пересевам (P5, P7, P8). Контролем для данного эксперимента служили клетки, выделенные непосредственно из кишечного эпителия в день эксперимента. Названия маркеров и результаты эксперимента представлены в Таблице 1.

Результаты исследований показали, что в культуре стволовых клеток эпителия толстого кишечника два маркера CD133 и CD26 экспрессируются в наибольшем количестве. Так, маркер CD133 был обнаружен у 98% культивированных *in vitro* стволовых клеток, тогда как только 4% клеток, выделенных непосредственно из кишечного эпителия, имели этот маркер. В то же самое время 66% стволовых клеток экспрессировали маркер CD26 по сравнению с 0.1% клеток у контрольной группы. Полученные результаты позволяют сделать предположение о том, что маркеры CD133 и CD26 являются специфичными для стволовых клеток эпителия кишечника.

**Таблица 1.** Анализ наличия 11 маркеров на поверхности стволовых клеток кишечника клетки после пяти, семи и восьми пересевов

маркер/генотип	(P5)	(P8)	(P7)	Первичные	EpCam
	+ -	+ -	+ -	+ -	
<b>CD49f</b>	97% <sup>+</sup>	84% <sup>+</sup>	80% <sup>+</sup>	93 % <sup>+</sup>	+
<b>CD29</b>	100% <sup>+</sup>	98% <sup>+</sup>	99% <sup>+</sup>	58% <sup>+</sup>	+
<b>CD117</b>	100% <sup>-</sup>	100% <sup>-</sup>	100% <sup>-</sup>	100% <sup>-</sup>	+
<b>CD90/Thy1</b>	100% <sup>-</sup>	0.05% <sup>+</sup> 99% <sup>-</sup>	100% <sup>-</sup>	0.7% <sup>+</sup> 99.1% <sup>-</sup>	+
<b>CD9</b>	96% <sup>+</sup>	77% <sup>+</sup>	84% <sup>+</sup>	30% <sup>+</sup>	+
<b>CD44</b>	3.3% <sup>+</sup> 95% <sup>-</sup>	3.2% <sup>+</sup> 95% <sup>-</sup>	3.6 % <sup>+</sup> 94% <sup>-</sup>	2.5% <sup>+</sup> 95.5% <sup>-</sup>	+
<b>CD166</b>	88% <sup>+</sup>	89% <sup>+</sup>	67% <sup>+</sup>	18% <sup>+</sup> 82% <sup>-</sup>	+
<b>CD54</b>	15% <sup>+</sup> 82% <sup>-</sup>	2% <sup>+</sup> 96% <sup>-</sup>	0.5 % <sup>+</sup> 96% <sup>-</sup>	0.2% <sup>+</sup> 99.4% <sup>-</sup>	+
<b>CD13</b>	0.38% <sup>+</sup> 98% <sup>-</sup>	0.9% <sup>+</sup> 98% <sup>-</sup>	0.05% <sup>+</sup> 98% <sup>-</sup>	0.3% <sup>+</sup> 99.2% <sup>-</sup>	+
<b>CD133</b>	96% <sup>+</sup>	96% <sup>+</sup>	98% <sup>+</sup>	4% <sup>+</sup> 95.2% <sup>-</sup>	+
<b>CD26</b>	92% <sup>+</sup>	66% <sup>+</sup>	40% <sup>+</sup>	0.11% <sup>+</sup> 99.7% <sup>-</sup>	+

Примечания:  
+ клетки, положительные по данному маркеру; - клетки, отрицательные по данному маркеру.  
Зеленый – значительно увеличено.  
Красный – без изменений.  
Серый – потенциальное увеличение

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенных исследований были оптимизированы методы выделения стволовых клеток эпителия кишечника мелких лабораторных животных. Было установлено, что выделенные клетки могут эффективно культивироваться *in vitro*, не теряя при этом способности к дальнейшей дифференцировке. Было показано, что инкубация полученных клеток в матригеле может приводить к появлению, по крайней мере, одного типа дифференцированных клеток – энteroцитов. Было установлено, что маркеры CD133 и CD26 являются специфичными для стволовых клеток эпителия толстого кишечника. Полученные результаты обладают несомненной научной и практической значимостью, так как могут быть использованы для дальнейших исследований в области биологии кишечных стволовых клеток, а также внедрены в практическое здравоохранение для лечения некоторых заболеваний желудочно-кишечного тракта.

## ЛИТЕРАТУРА

- Pantic I. Cancer stem cell hypotheses: impact on modern molecular physiology and pharmacology research. *J Biosci.*, 2011, 957-61.
- Heath JP. Epithelial cell migration in the intestine. *Cell Biol Int.*, 1996, 139-46.
  - Vries RG, Huch M, Clevers H. Stem cells and cancer of the stomach and intestine. *Mol Oncol.*, 2010, 373-84.
  - Barker N, van Es JH, Kuipers J, Kuijala P, van den Born M, Coijnsen M, et al. Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene Lgr5. *Nature*, 2007, 1003-1007.
  - Van de Wetering M, Sancho E, Verweij C, de Lau W, Oving I, Hurlstone A, et al. The beta-catenin/TCF-4 complex imposes a crypt progenitor phenotype on colorectal cancer cells. *Cell*, 2002, 241-50.

6. Van der Flier LG, Sabates-Bellver J, Oving I, Haegebarth A, De Palo M, Anti M, et al. The Intestinal Wnt/TCF Signature. *Gastroenterology*, **2007**, 628-632.
7. Odoux C., Fohrer F., Hoppo T., Guzik T., Cavelli A., Stoltz D.B., Lewis D.W., Gollin S.M., Gamblin T.C., Geller D.A., and Lagasse E. A Stochastic Model for Cancer Stem Cell Origin in Metastatic Colon Cancer. *Cancer Res.*, **2008**, 6932-6941.

*Буланин Д.С., Аскарова Ш.Н., Янцен Ю.И., Адамбеков Ш.К., Жанбосынов А.Ж.*

**ШЕКТИҚ КОЛОРЕКТАЛЬДЫ БӨЛІМІНІҢ ДІҢ ЖАСУШАЛАРЫН КЛЕТКАЛАРЫН БӨЛІП АЛУ  
ЖӘНЕ ӨСІРУДІҢ ҚАЗІРГІ ЗАМАН ӘДІСТЕРІ**

Адам ағзасында болатын ересек дің жасушалар әртүрлі аурулар үшін қолданылатын трансплантацияға арналған аутологиялық материал ретінде үлкен әлеуетке ие. Бірақ жасушалардың мультипотенттілігін және бөлінуге қабілеттілігін сактау үшін жасушаларды бөліп алу және өсіруге арналған нақты құрастырылған нұсқаулықтар қажет. Жоғарыда айтылғанға негізделіп, бұл зерттеудің мақсаты тоқ ішек эпителийінің ересек дің жасушаларын бөліп алу және өсіруге арналған әдістерді оңтайландыру және сипаттау болды. Бұл зерттеуде ішек дің жасушаларын бөліп алу, өсіру және дифференциациялауға арналған өзіндік әдістер қолданылған. Жасушалық популяцияларды талдау ағынды цитофлюорометрия тәсілі арқылы жүргізілді. Зерттеудің нәтижесінде, *in vitro* жағдайында пролиферативті қасиеттерді сактауға қабілеті бар және энтероцит тәріздес жасушаларға айналатын, тоқ ішек эпителийінің жасушаларының популяциясы бөлініп алынды. Бұдан басқа, дің жасушалардың кейбір ерекше маркерлері анықталды. Алынған нәтижелер күмәнсіз ғылыми және тәжірибелік маңыздылыққа ие, себебі бұл нәтижелерді ішек дің жасушалар биологиясына арналған одан әрі жүргізілетін зерттеулерде қолдануға болады. Сонымен қатар бұл зерттеулердің ішек-қарын жолының кейбір ауруларын емдеуге бағытталған тәжірибелік деңсаулық сактауда енгізуге болады.

*Bulanin D.S., Askarova S.N., Jantsen J.I., Adambekov S.K., Ganbosinov A.G.*

**MODERN METHODS OF ALLOCATION AND CULTIVATE FOUNDER CELLS COLORECTAL  
OF THE DEPARTMENT OF INTESTINES**

Adult stem cells that are present in the human body have a great potential for autologous cell transplantation in different pathological conditions. However strict protocols for isolation and subsequent culture should be used to maintain its multipotent state and proliferative potential. Thus, the aim of this research was to optimize the methods of isolation of stem cells from large intestine and their characterization. Original methods of intestinal stem cell extraction, cultivation and differentiation were used in this research. For cell analysis, the method of fluorescent flow cytometry was applied. As a result, a population of cells from larger intestine capable of *in vitro* proliferation and differentiation has been isolated. Moreover, several stem cell specific markers has been identified. The results of this research can be used for further investigations of intestinal stem cell biology with possible implementation into medical practice for treatment of some pathological conditions.