

СТАТЬЯ

УДК [576.524+57.085.25]:616-006

**ВЛИЯНИЕ КУЛЬТУРАЛЬНОГО ПРЕКОНДИЦИОНИРОВАНИЯ
ПОВЕРХНОСТИ И КУЛЬТУРАЛЬНОЙ СРЕДЫ
НА ПОКАЗАТЕЛИ АДГЕЗИИ И ПРОЛИФЕРАЦИИ НОРМАЛЬНЫХ
И ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОЧНЫХ КУЛЬТУР*****Халимов Р.И., Омелько Н.А., Русин Е.Е.***Алтайский государственный университет, Барнаул,
e-mail: asu.nii@mail.ru, omelkokola@mail.ru, asu.nii@mail.ru*

Обработка культуральной посуды путем предварительного культивирования на ней различных активных клеточных линий имеет крайне богатую историю. Одной из линий клеток, которая способна выделять широкий спектр метаболитов, является линия клеток эмбриональной рабдомиосаркомы человека RD. Метаболиты клеток данной линии включают различные факторы роста и адгезии, которые потенциально способны повышать адгезию клеток к культуральному пластику, миграцию клеток из эксплантов и пролиферацию. В настоящей работе описаны результаты исследования воздействия среды, прекондиционированной с клетками RD, на миграцию и пролиферацию клеток в культуре первичных эксплантов кожи, мышц и печени. Помимо этого, данная статья представляет результаты исследования влияния обработки пластиковой посуды клетками RD на показатели адгезии клеток меланомы SK-MEL-2, а также на миграцию и пролиферацию клеток в культуре первичных эксплантов кожи, мышц и печени. Установлено, что прекондиционирование среды, но не культурального пластика, статистически достоверно повышает пролиферацию клеток мышц в культуре первичных эксплантов. Также установлено, что прекондиционирование культуральной посуды повышает адгезию клеток SK-MEL-2. Полученные данные свидетельствуют, что метаболиты клеток RD обладают биологической активностью, которая предоставляет возможность их применения в качестве компонента культуральных матриц, однако эта активность является избирательной и требует дополнительного изучения, чтобы установить ее пределы.

Ключевые слова: культура клеток, рабдомиосаркома, RD, меланома, SK-MEL-2, первичные экспланты

**Работа выполнена в рамках гранта Губернатора Алтайского края в форме субсидий для разработки качественно новых технологий, создания инновационных продуктов и услуг в сферах переработки и производства пищевых продуктов, фармацевтического производства и биотехнологий в соответствии с пунктом 4 статьи 78.1 Бюджетного кодекса Российской Федерации по теме «Разработка технологии получения биологически активного культурального клеточного матрикса» (соглашение № 5 от 12 апреля 2022 г.). Партнер проекта – ООО «Диам».*

**EFFECT OF CULTURAL PRECONDITIONING OF SURFACE
AND CULTURE MEDIUM ON THE INDICATORS OF ADHESION
AND PROLIFERATION OF NORMAL AND CANCER CELL CULTURES****Khalimov R.I., Omelko N.A., Rusin E.E.***Altai State University, Barnaul, e-mail: asu.nii@mail.ru, omelkokola@mail.ru, asu.nii@mail.ru*

Treatment of cultureware by preliminary culturing of different robust cell lines on it has rich history. One of the cell lines which are capable of secreting a wide spectrum of metabolites is the embryonic human rhabdomyosarcoma cell line RD. Metabolites of this line include different adhesion and growth factors which are potentially capable of increasing adhesion of cells to a cultureware, cell migration out of explants and their proliferation. In the present work results of investigation of effect of RD cell-reconditioned medium on the cell migration and proliferation in the culture of primary explants of skin, muscle and liver are described. Besides that, this article presents results of studying of the effect of cultureware treatment with RD cells on the indicator of adhesion in melanoma SK-MEL-2 cell line, as well as on the migration and proliferation of cells in culture of primary explants of skin, muscle and liver. It is found that medium, but not cultureware preconditioning increases muscle cells proliferation in the primary explants culture in the statistically significant manner. It is also found that cultureware preconditioning increases adhesion of SK-MEL-2 cells. Obtained results suggests that RD cells metabolites have biological activity which presents the opportunity of using them as an ingredient of culture matrixes, however this activity is selective and demands additional studies in order to establish its extends.

Keywords: cell culture, rhabdomyosarcoma, RD, melanoma, SK-MEL-2, primary explants

По мере развития злокачественных новообразований раковые клетки приобретают ряд характерных изменений, включающих способность к неограниченной пролиферации, не зависящей от паракринных и гуморальных факторов, способность к метастазированию и к инвазии в близле-

жащие ткани и способность стимулировать ангиогенез. Эти свойства злокачественных клеточных линий отражают изменения сигнальных молекулярных путей, контролирующих пролиферацию, миграцию, адгезию и сенесцентность клеток. Многие из данных сигнальных путей в настоящее время

являются объектами пристального внимания научного сообщества как потенциальные мишени противоопухолевых средств.

Адгезия клеток к субстрату и межклеточные контакты, таким образом, представляют собой важный фактор развития онкозаболеваний.

В связи с тем, что основные злокачественные линии несут мутации, снижающие или полностью подавляющие сигнальные пути, отвечающие за экспрессию белков клеточной адгезии, первоначально некоторые исследователи предполагали, что раковые клетки после малигнизации становятся независимыми от сигналов, передаваемых в клетку белками адгезии. Однако генетические и биохимические исследования подтвердили, что факторы адгезии, такие как дизинтегрины, не просто участвуют в малигнизации, но и контролируют широкий спектр аспектов развития новообразования – от изначальной малигнизации до реактивации спящих метастазов [1].

Существуют данные, демонстрирующие, что нарушения адгезии снижают онкогенность. Так, дизинтегрины, выделенные из яда гадюковых змей, способны подавлять адгезию и метастазирование клеток линии SK-MEL-2 (меланома человека) *in vitro*, а также препятствовать развитию меланомы *in vivo*, блокируя интегрин-зависимые сигнальные пути [2–4].

В настоящее время существует потребность в доступных методах изучения клеточной адгезии, а также ее роли как одного из механизмов развития онкологических заболеваний. В лабораторных условиях культуры клеток часто находятся в нефизиологических условиях, что может сказываться на их морфологии, метаболизме и, в результате, на воспроизводимости результатов испытания противоопухолевых средств. Так, Vande Voorde и соавторы изучали влияние условий культивирования клеток линий BT549, MDAMB-468 и CAL-120 на обмен веществ в них. В результате было установлено, что такие особенности условий *in vitro*, как нефизиологически высокие концентрации питательных веществ, гипероксия и отсутствие возможности удаления продуктов метаболизма, компрометируют результаты, уменьшая число жизнеспособных колоний и общую площадь клеток в полях зрения. Было также установлено, что даже временное прекондиционирование клеток в специализированной среде с физиологической концентрацией аминокислот способно увеличить пролиферативную активность клеток и снизить экспрессию белков-маркеров, указывающих на развитие гипоксического фенотипа [5].

Одним из способов создания физиологических условий является обработка лабораторной посуды различными способами с целью придания ее поверхности свойств, способствующих прикреплению и нормальному росту клеток. Другим способом является прекондиционирование клеток, т.е. временное помещение их до начала эксперимента в условия, обеспечивающие желаемое состояние. В качестве средства для обработки культурального пластика могут эффективно использоваться культуры других клеток, выделяющие различные межклеточные белки и факторы роста. Примерами таких клеточных линий являются первичные культуры фибробластов и перевиваемая культура эмбриональной рабдомиосаркомы человека RD [6].

Цель исследования – изучить воздействие лабораторной посуды, обработанной продуктами метаболизма клеток линии RD, на пролиферацию и миграцию клеток в культуре первичных эксплантов кожи, мышц и печени, а также адгезию культур меланомы человека SK-MEL-2. Также в ходе подготовки к исследованию были проведены исследования по влиянию культуральной среды, прекондиционированной выращиванием в ней клеток линии RD, на экспланты вышеобозначенных тканей.

Материалы и методы исследования

В работе использовались клеточные линии рабдомиосаркомы человека RD и меланомы человека SK-MEL-2, а также культуры первичных эксплантов тканей кожи, мышц и печени. Клеточные линии были предоставлены ООО «БиоЛот» (РФ). Культуры первичных эксплантов были получены от самцов беспородных мышей-альбиносов. Выбор указанных трех видов тканей обусловлен их различным эмбриональным происхождением – из эктодермы, мезодермы и энтодермы соответственно.

Отбор фрагментов ткани для культуры первичных эксплантов проводился следующим образом. Самцов беспородных мышей-альбиносов наркотизировали парами диэтилового эфира, после чего умерщвляли путем цервикальной дислокации. С участка площадью 1 кв. см сбрасывали волосяной покров и обрабатывали его 70%-ным этанолом, после чего отделяли фрагмент кожи, удаляли фасции и переносили полученный фрагмент в среду DMEM с добавлением гентамицина (4 мг/мл). Затем обрабатывали спиртом задние лапы, удаляли кожу и отбирали *m. gastrocnemius* и *m. soleus*, которые также переносили в DMEM с гентамицином. После этого проводили вскрытие брюшной полости, отбирали доли печени и переноси-

ли в среду DMEM с гентамицином. Емкость с фрагментами тканей осторожно взбалтывали, чтобы обеспечить полное покрытие фрагментов антибиотиком. Оба эксперимента на первичных эксплантах проводили в трех повторениях, для каждого из которых использовалось одно животное.

Собранные таким способом фрагменты тканей асептически переносили в ламинарный бокс и осторожно разделяли с помощью пинцета, скальпеля и ножниц на мелкие части величиной около 1 куб. мм, которые помещали в чашки Петри с обработанной поверхностью (JetBiofil, КНР). Питательная среда состояла из 90% среды DMEM и 10% фетальной телячьей сыворотки. В среду добавляли гентамицин (0,4 мг/мл).

Культивирование клеток проводили в среде DMEM («БиоЛот», РФ) с добавлением 10% FBS («Диаэм», РФ) и 1%-ного раствора пенициллина-стрептомицина (ThermoFisher, США). Клетки наращивали в CO₂-инкубаторе при температуре 37°C и 5%-ном содержании углекислого газа. Для наращивания клеток использовали пластиковые чашки Петри с обработанной поверхностью (JetBiofil, КНР).

Оценку активности метаболитов клеток RD в прекондиционированных средах на первичных эксплантах проводили путем измерения индекса площади (ИП) эксплантов [7]. Экспланты тканей помещали в чашки Петри диаметром 3,5 см с обработанной поверхностью в количестве не более 9 эксплантов на чашку. Экспланты каждого вида ткани разделяли на две группы (n=40) – экспланты контрольной группы культивировали в обычной среде, как описано выше, а экспланты экспериментальной группы – в прекондиционированной среде. Прекондиционирование среды проводили путем засева в чашку Петри клеток линии RD в количестве 500 тыс. клеток на чашку в среде DMEM, содержащей 10% FBS и гентамицин, как описано выше. Спустя сутки культуральную среду собирали и центрифугировали в течение 15 минут при 1 500 оборотах в минуту на центрифуге LMC-3000 (bioSan, Латвия). Освобожденную таким путем от клеток и клеточного дебриса среду, содержащую метаболиты клеток линии RD, использовали в дальнейшем исследовании. На третьи сутки экспланты фотографировали на микроскопе Zeiss Imager.Z1 (Zeiss, Германия). Индекс площади (ИП) рассчитывали как отношение площади всего эксплантата (вместе с зоной выселяющихся клеток) к площади центральной зоны эксплантата. Для расчета ИП эксплантатов использовали програм-

му «AxioVision». Значения ИП выражали в процентах. Величину ИП в контрольных культурах (без добавления прекондиционированной среды) принимали за 100%.

Оценку влияния обработки культурального пластика клетками линии RD на миграцию и пролиферацию клеток в культуре первичных эксплантов проводили путем прямого посева. Экспланты тканей помещали в чашки Петри диаметром 3,5 см с обработанной поверхностью в количестве не более 9 эксплантов на чашку. При этом экспланты каждого вида ткани разделяли на две группы (n=40) – экспланты контрольной группы культивировали на обычных чашках Петри, как описано выше, а экспланты экспериментальной группы – на прекондиционированных чашках. При этом обе группы эксплантов выращивали в обычной среде DMEM, содержащей 10% FBS и гентамицин (0,4 мг/мл). Прекондиционирование чашек проводили путем засева в каждую чашку 300 тыс. клеток и их культивирования в ней в течение трех суток. На четвертые сутки клетки RD удаляли из лунок посредством обработки раствором Версена в течение 15 минут и трехкратного отмывания PBS. Освобожденные таким образом от клеток и клеточного дебриса чашки использовали для культивирования эксплантов экспериментальной группы. Степень миграции и пролиферации клеток оценивали по индексу площади.

Оценку адгезии опухолевых клеток проводили методом, описанным Anguiano и соавторами, и с изменениями, описанными далее [8]. Тест проводили в 24-луночных плоскодонных планшетах с необработанной поверхностью (JetBiofil, КНР). Лунки были разделены на три экспериментальные группы, а также группы негативного и позитивного контроля (n=16). Лунки в экспериментальных группах были предварительно обсеяны клетками RD в количестве 50 тыс. клеток на лунку, после чего клетки RD были оставлены для роста на трое суток. На четвертые сутки клетки RD удаляли из лунок посредством обработки раствором Версена в течение 15 минут и трехкратного отмывания PBS. После этого в лунки экспериментальной группы I не заседалось никаких клеток (0% адгезии), а в лунки групп II и III были засеяны клетки SK-MEL-2 в количестве 100 тыс. клеток на лунку, при этом в группе II клетки были смыты PBS через 20 минут, в группе III клетки смывались через 2 часа. Краткое время адгезии – 20 минут – было выбрано в ходе предварительных пробных экспериментов, выбор

связан с тем, что клетки SK-MEL-2 обладают высокой скоростью адгезии по сравнению с линиями, использованными Anguiano и соавторами. Негативная контрольная группа включала лунки, не подвергавшиеся никакой обработке клетками, однако подвергавшиеся всем остальным процедурам. Группа позитивного контроля включала лунки, не подвергавшиеся предварительной обработке клетками RD, но засеянные клетками SC-MEL-2 так же, как экспериментальная группа III (без смывания).

После обработки клетками в соответствии с вышеописанным протоколом все лунки осторожно освобождали от остатков ростовых сред, клетки фиксировали раствором формальдегида и окрашивали 0,5%-ным водным раствором кристаллического фиолетового в течение 20 минут при комнатной температуре. После фиксации и окрашивания планшеты тщательно промывали дистиллированной водой так, чтобы не повредить зафиксированные клетки. Затем в лунки на 60 минут добавляли 500 мкл 5%-ного водного раствора ТВИН-20, чтобы растворить краситель, содержащийся в клетках, и измеряли оптическую плотность раствора при длине волны 490 нм. Оптическая плотность полученных растворов пропорциональна количеству красителя, количество которого, в свою очередь, зависит от числа клеток в лунках.

Статистическая обработка результатов проводилась в программном обеспечении MS Excel путем расчета двухпарного t-критерия с неравным отклонением.

Результаты исследования и их обсуждение

В ходе изучения активности кондиционированной среды, содержащей продукты метаболизма клеток линии RD, в отношении клеток в культуре первичных эксплантов тканей кожи, мышц и печени были получены следующие значения среднего ИП в экспериментальных группах: для кожи – $98,90 \pm 2,1\%$, для мышц – $117,81 \pm 6,6\%$, для печени – $101,55 \pm 4,3\%$.

Статистическая обработка результатов подтвердила отсутствие статистически достоверных отличий между контрольной и экспериментальной группами эксплантов кожи и печени. При этом было установлено, что повышение пролиферации ткани мышц носит достоверный характер ($p=0,0487$). Такое положительное воздействие среды, содержащей метаболиты клеток RD, на клетки мышц может быть связано с тем, что линия RD представлена клетками рабдомиосаркомы и выделяемые ею в кондиционирован-

ную среду факторы роста могут быть специфичны в отношении клеток мышц.

Изучение влияние обработки культуральной посуды клетками RD не выявило статистически достоверных отличий ни в одной из групп, включая мышцы, в отношении культур ткани которых можно предполагать лишь наличие тенденции к увеличению. Индексы площади составляли $100,29 \pm 1,6\%$, $106,90 \pm 3,7\%$ и $103,33 \pm 6,5\%$ для культур эксплантов кожи, мышц и печени соответственно. Одним из возможных объяснений может являться использование в данной серии экспериментов обработанной культуральной посуды в противовес необработанной посуде, использованной для оценки адгезии опухолевых клеток. Таким образом, изменения, вызванные на поверхности посуды клетками RD, оказались незначительными на фоне существующего покрытия пластика. Дальнейшие исследования с использованием различных протоколов обработки посуды могут способствовать установлению причины подобных результатов.

При проведении оценки адгезии опухолевых клеток были получены следующие значения спектрофотометрии (в условных единицах, у.е.): Негативный контроль – $58,93 \pm 0,19$; Позитивный контроль – $66,56 \pm 0,41$; Группа I – $57,69 \pm 0,45$; Группа II – $66,69 \pm 0,34$; Группа III – $69,5 \pm 0,31$.

Статистическая обработка результатов не выявила статистически достоверных различий между группой I и негативным контролем, а также между группой II и позитивным контролем. Однако различия между группой III и позитивным контролем были статистически достоверны ($p=0,032$). Подобное повышение оптической плотности позволяет предполагать, что за равный временной промежуток в группе III, которая включала обработанные лунки, произошла адгезия большего числа клеток. Вместе с тем отсутствие достоверных различий между группой II и позитивным контролем также свидетельствует о повышении адгезии, которая привела к равной оптической плотности при меньшем времени.

Заключение

Полученные данные свидетельствуют о том, что клетки RD способны экспрессировать внеклеточные факторы роста и/или адгезии, которые могут ускорить пролиферацию клеток мышц и адгезию опухолевых клеток других линий (в данном случае линии SK-MEL-2). Данные литературы позволяют предположить, что данные факторы имеют белковую природу и могут быть эффективны также в отношении дру-

гих клеточных линий. Изучение точного состава продуктов жизнедеятельности данных клеток и возможностей их применения для культивирования других клеточных линий в различных условиях представляет собой потенциальное направление дальнейших исследований.

Список литературы

1. Cooper J., Giancotti F.G. Integrin Signaling in Cancer: Mechanotransduction, Stemness, Epithelial Plasticity, and Therapeutic Resistance. *Cancer Cell*. 2019. Mar 18. № 35(3). P. 347-367. DOI: 10.1016/j.ccell.2019.01.007.
2. Chung K.H., Kim S.H., Han K.Y., Sohn Y.D., Chang S.I., Baek K.H., Jang Y., Kim D.S., Kang I.C. Inhibitory effect of salmosin, a Korean snake venom-derived disintegrin, on the integrin α v-mediated proliferation of SK-Mel-2 human melanoma cells. *J Pharm Pharmacol*. 2003. № 55(11). P. 1577-1582. DOI: 10.1211/0022357022160.
3. Teodoro A., Gonçalves F.J.M., Oliveira H., Marques S.. Venom of Viperidae: A Perspective of its Antibacterial and Antitumor Potential. *Curr Drug Targets*. 2022. № 23(2). P. 126-144. DOI: 10.2174/1389450122666210811164517.
4. Schönthal A.H., Swenson S.D., Chen T.C., Markland F.S. Preclinical studies of a novel snake venom-derived recombinant disintegrin with antitumor activity: A review. *Biochem Pharmacol*. 2020. № 181. P. 114149. DOI: 10.1016/j.bcp.2020.114149.
5. Vande Voorde J., Ackermann T., Pfetzer N., Sumpton D., Mackay G., Kalna G., Nixon C., Blyth K., Gottlieb E., Tardito S. Improving the metabolic fidelity of cancer models with a physiological cell culture medium. *Sci Adv*. 2019. Jan 2. № 5(1). P. eaau7314. DOI: 10.1126/sciadv.aau7314.
6. D'Agostino S., Tombolan L., Saggiaro M., Frasson C., Rampazzo E., Pellegrini S., Favaretto F., Biz C., Ruggieri P., Gamba P., Bonvini P., Aveic S., Giovannoni R., Pozzobon M. Rhabdomyosarcoma Cells Produce Their Own Extracellular Matrix With Minimal Involvement of Cancer-Associated Fibroblasts: A Preliminary Study. *Front Oncol*. 2021. Jan 29. № 10. P. 600980. DOI: 10.3389/fonc.2020.600980.
7. Хавинсон В.Х., Чалисова Н.И., Линькова Н.С., Халимов Р.И., Ничик Т.Е. Зависимость тканеспецифического действия пептидов от количества аминокислот, входящих в их состав // *Фундаментальные исследования*. 2015. № 2 (Ч. 3). С. 497-503.
8. Anguiano M., Morales X., Castilla C., Pena A.R., Ederera C., Martínez M., Ariz M., Esparza M., Amaveda H., Mora M., Movilla N., Aznar J.M.G., Cortés-Domínguez I., Ortiz-de-Solorzano C. The use of mixed collagen-Matrigel matrices of increasing complexity recapitulates the biphasic role of cell adhesion in cancer cell migration: ECM sensing, remodeling and forces at the leading edge of cancer invasion. *PLoS One*. 2020 Jan 16. № 15(1). P. e0220019. DOI: 10.1371/journal.pone.0220019.