

Г.М. Тугузбаева, В.Н. Павлов
**ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ МЕТОДЫ ИЗУЧЕНИЯ МИГРАЦИОННЫХ
И ИНВАЗИВНЫХ СВОЙСТВ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК**
*ФГБОУ ВО «Башкирский государственный медицинский университет»
Минздрава России, г. Уфа*

Фундаментальные исследования молекулярной онкологии и достижения клинической науки подтверждают, что метастазирование является ключевым процессом в ходе развития злокачественных новообразований. Определение миграционных и инвазивных способностей раковых клеток, а также выявление механизмов, лежащих в основе опухолевой прогрессии, являются актуальными направлениями в области прогнозирования, диагностики и разработки новейших методов лечения рака.

Ключевые слова: метастазирование, опухолевая миграция, инвазия, скрэтч-эксперимент, трансвелл-миграция.

G.M. Tuguzbaeva, V.N. Pavlov
**EXPERIMENTAL METHODS OF STUDYING MIGRATIVE
AND INVASIVE FEATURES OF CANCER CELLS**

Basic researches in molecular oncology and advances of clinical science emphasize the importance of metastatic spread as the key process in the oncogenesis. Studying migrative and invasive capacities of cancer cells, as well as determination of mechanisms of cancer development are important for prevention, diagnostics and design of novel methods of cancer treatment.

Key words: metastatic spread, cancer cell migration, invasion, Scratch assay, Transwell migration.

В последнее десятилетие заболеваемость злокачественными новообразованиями в Российской Федерации имеет отчетливую тенденцию к прогрессированию (прирост за 2005-2015 гг. составил 20,35%) [1]. Согласно прогнозам Международного агентства по изучению рака при Всемирной организации здравоохранения, к 2020 году в мире общее число летальных случаев в год от злокачественных опухолей составит 10046745, что превысит текущий уровень мировой смертности по данной нозологии [2]. Основной причиной летального исхода при опухолевых процессах является метастазирование [3,4]. В связи с этим необходимо тщательное изучение и понимание механизмов прогрессии злокачественных новообразований, в частности метастазирования раковых клеток.

Метастатический каскад – это комплексный патологический процесс, который включает в себя последовательность явлений, обеспечивающих формирование регионарного или отдаленного вторичного опухолевого очага [5, 6]. Важно отметить, что ключевыми моментами в данной цепочке взаимосвязанных событий являются отделение злокачественных клеток от первичного очага, инвазия и миграция клеток в окружающие ткани, неоангиогенез, проникновение, выживание клеток в кровеносном и лимфатическом руслах и распространение с током крови или лимфы в другие органы, экстравазация с образованием метастаза [7]. Согласно результатам многочисленных научных исследований в области онкологии, непременным условием метастазирования считается инвазивный рост. Инва-

зия – это распространение клеток во внеклеточный матрикс путем его ремоделирования [8]. Успешное расщепление данного субстрата осуществляется благодаря клеточной адгезии, протеолизу его компонентов за счет секретируемых ферментов с последующей миграцией опухолевых клеток в образованную нишу [9]. Таким образом, миграцию можно рассматривать как необходимое условие процесса инвазии. По этой причине крайне важным аспектом исследования метастатического каскада как патофизиологического процесса считается всестороннее изучение миграционных и инвазивных свойств раковых клеток, которое может быть проведено путем использования различных экспериментальных *in vitro* моделей. Главными достоинствами исследований *in vitro* являются их относительная легкость исполнения и высокая воспроизводимость, позволяющие проводить масштабные скрининг-тесты в рамках разработки и внедрения новейших фармакологических препаратов [10]. В данной статье проведен обзор известных лабораторных методов, с помощью которых возможно оценить миграционный и инвазивный потенциал опухолевых клеток.

Традиционные методы изучения миграции и инвазии опухолевых клеток

Наиболее технически доступным лабораторным методом исследования миграционных свойств раковых клеток на двухмерном субстрате является скрэтч (Scratch)-эксперимент. Принцип данного анализа заключается в создании искусственного промежутка-раны, так называемого скрэтч, на не-

прерывном клеточном монослое. Данная манипуляция инициирует движение опухолевых клеток, находящихся на краю созданного разрыва, в свободную сторону [11,12]. Для осуществления скрэтч-эксперимента раковые клетки инкубируют в 6-луночковой тарелке до достижения ими непрерывного монослоя. Далее в каждой лунке с помощью наконечника пипетки проводят в вертикальном направлении линейную царапину – скрэтч с последующим трехкратным промыванием клеточного слоя питательной средой для удаления мусора и сглаживания краев царапины. После этого возможно проведение сравнительного анализа миграционного потенциала групп опухолевых клеток в различных условиях. Для этих целей экспериментальные клеточные культуры инкубируют с исследуемыми реагентами в течение определенных временных промежутков (24, 36, 48 часов). По истечении отведенного времени под 40- и 100-кратным увеличением инвертированного микроскопа с помощью фотокамеры делают фото царапин. Степень закрытия промежутков в результате миграции клеток анализируют путем сравнения с первоначальной шириной экспериментальной раны с помощью программного обеспечения Image-Pro Plus 6.0 [13]. При кажущейся легкости данного метода довольно проблематичным является создание относительно равномерных по толщине царапин, что требует оттачивания манипуляционных навыков. Скрэтч-эксперимент подходит в качестве первичного анализа миграционного потенциала раковых клеток.

Для более детального изучения клеточной миграции методом выбора считается Transwell-миграция, которая способна в некоторой степени приблизить экспериментальные условия к естественной среде организма. Этот лабораторный опыт основан на использовании модифицированных камер Бойдена (Transwell®) с полупроницаемой мембраной, через поры которой опухолевые клетки мигрируют из одной камеры в другую [14]. Данный барьер является аналогом базальной мембраны, которая в условиях опухолевого роста ограничивает распространение бесконтрольно делящихся и растущих клеток, отделяя новообразование от окружающей соединительной ткани и эндотелия сосудов. Для анализа миграционного потенциала раковые клетки высеивают в верхнюю камеру Transwell® в питательную среду, свободную от бычьего сывороточного альбумина. В качестве хемоаттрактанта в нижней камере, отделенной мембраной от верхней, используют

культуральную среду, содержащую 10% альбумина. По окончании отведенного на эксперимент времени раковые клетки на верхней поверхности мембраны удаляют с помощью ватного тампона, а фиксацию мигрировавших через мембрану клеток проводят 4% формалином. Далее выполняют окрашивание клеток 0,1% раствором кристаллического фиолетового. Съемку препаратов осуществляют с использованием инвертированного микроскопа под увеличением объектива $\times 20$ и фотокамеры в пяти полях зрения. Подсчет мигрировавших через мембрану клеток проводят с помощью программного обеспечения Image J. Сравнительно со скрэтч-анализом данный метод способен в большей степени воспроизвести естественные условия опухолевого процесса, однако для воссоздания более полной картины инвазивного роста необходимо использование в экспериментальных опытах аналогов внеклеточного матрикса, к числу которых относится Matrigel®.

С целью изучения инвазивных свойств клеточных культур под влиянием противоопухолевых соединений используют метод Transwell-инвазии. Его кардинальным отличием от эксперимента Transwell-миграции считается использование камер, в которых проницаемая мембрана дополнительно покрыта матригелем. В состав Matrigel® входят ламинин, коллаген IV типа, энтактин и протеоглики, являющиеся компонентами внеклеточного вещества [15]. Только в случае эффективной деградации данного матрикса опухолевые клетки способны к инвазивному росту и метастазированию [16]. В остальном процедура изучения инвазивных свойств раковых клеток идентична описанному выше протоколу проведения трансвелл-миграции.

Методы 3D-инвазии

Несмотря на широкое использование описанных выше традиционных способов изучения миграции и инвазии опухолевых клеток, данные методы не способны в полной мере воспроизвести всю картину происходящего канцерогенеза в естественной среде организма. В связи с этим в настоящее время наблюдается большой интерес всех ученых к трехмерным клеточным культурам.

Развитие современных биотехнологий ведет к постоянному совершенствованию экспериментальных методов. В последние годы широкое внедрение в повседневную лабораторную практику получили 3D-культуры. В отличие от двухмерного субстрата, в котором клетки лишены микроокружения и культивируются изолированно как монослой, в трех-

мерных условиях опухолевые клетки интегрированы во внеклеточный матрикс. Данный субстрат представлен такими белками, как коллаген, эластин, ламинин, которые не только служат механической опорой, но и обеспечивают передачу сигналов к рецепторам клеток [17, 18]. Под влиянием этих сигналов запускается цепь внутриклеточных реакций, имеющих важное значение как для поддержания роста и жизнедеятельности самой клетки, так и для стимуляции опухолевой прогрессии в целом [19, 20]. Таким образом, каждая опухолевая клетка, являясь частью злокачественного новообразования, не может существовать изолированно от своего микроокружения, и только использование 3D-технологий для культивирования онкоклеток способно отвечать данным требованиям.

В условиях трехмерных культур опухолевые клетки формируют своеобразные агрегаты, так называемые мультиклеточные сфероиды. Данный процесс подобен росту опухоли в естественных условиях организма [21]. При встраивании данных сфероидов в такие внеклеточные матрицы, как коллаген I типа, возможен комплексный мониторинг опухолевого роста *in vitro* [22]. Изучение инвазивного потенциала и кинетики передвижения раковых

клеток проводят с помощью нативной видеомикроскопии в определенные временные промежутки в режиме *time-lapse* [23]. Кроме того, возможно проведение имунофлуоресцентного анализа онкопротеинов, являющихся маркерами активного канцерогенного процесса в мультиклеточных агрегатах.

Таким образом, использование трехмерных клеточных культур представляет собой перспективное направление, открывающее для исследователей новые возможности изучения метастатического процесса.

Заключение

Совершенствование методов изучения злокачественных новообразований, несомненно, является актуальной задачей как для клинической, так и для научно-исследовательской медицины. Грамотное использование *in vitro* методов анализа опухолевой миграции и инвазии, в частности 3D-культур, позволит исследователям уменьшить число опытов с лабораторными животными и сделает предсказуемыми результаты последующих *in vivo* исследований. Таким образом, четкое понимание механизмов опухолевой прогрессии даст возможность ученым и докторам эффективно бороться с данным патологическим процессом.

Сведения об авторах статьи:

Тугузбаева Гульнара Маратовна – аспирант кафедры патологической физиологии, ассистент кафедры стоматологии общей практики и челюстно-лицевой хирургии ИДПО ФГБОУ ВО БГМУ Минздрава России. Адрес: 450008, г. Уфа, ул. Ленина, 3. E-mail: gulnaritta@gmail.com.

Павлов Валентин Николаевич – член-корр. РАН, д.м.н., профессор, зав. кафедрой урологии с курсом ИДПО, ректор ФГБОУ ВО БГМУ Минздрава России. Адрес: 450008, г. Уфа, ул. Ленина, 3.

ЛИТЕРАТУРА

1. Злокачественные новообразования в России в 2015 году (заболеваемость и смертность). – М.: МНИОИ им. П.А. Герцена – филиал ФГБУ «НМИРЦ» Минздрава России, 2017. – 250 с.
2. Сайт Международного агентства по изучению рака при Всемирной организации здравоохранения [электронный ресурс]. URL: http://globocan.iarc.fr/Pages/burden_sel.aspx (дата обращения 09.08.2017).
3. Chambers, A.F. Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites / A.F. Chambers, A.C. Groom, I.C. MacDonald // *Nat Rev Cancer*. – 2002. – Vol. 2. – P. 563-572.
4. Eccles, S.A. Metastasis: recent discoveries and novel treatment strategies / S.A. Eccles, D.R. Welch // *Lancet*. – 2007. – Vol. 369, N 9674. – P. 1742-1757.
5. Hanahan, D. The hallmarks of cancer / D. Hanahan, R.A. Weinberg // *Cell*. – 2000. – Vol. 100. – P. 57-70.
6. Gupta, G.P. Cancer metastasis: building a framework / G.P. Gupta, J. Massague // *Cell*. – 2006. – Vol. 127. – P. 679-695.
7. Steeg P.S. Tumor metastasis: mechanistic insights and clinical challenges // *Nat Med*. – 2006. – Vol. 12. – P. 895-904.
8. Schedin, P. Multistep tumorigenesis and the microenvironment / P. Schedin, A. Elias // *Breast Cancer Res*. – 2004. – Vol. 6. – P. 93-101.
9. Friedl, P. Plasticity of cell migration: a multiscale tuning model / P. Friedl, K. Wolf // *J. Cell Biol*. – 2010. – Vol. 188. – P. 11-19.
10. In vitro models of the metastatic cascade: from local invasion to extravasation / S. Bersini [et al.] // *Drug Discovery Today*. – 2014. – Vol. 19, N 6. – P. 735-742.
11. A high-throughput cell migration assay using scratch wound healing, a comparison of image-based readout methods / J.C. Yarrow [et al.] // *BMC biotechnology*. – 2004. – Vol. 4, N 1. – P. 21.
12. Optimization of cell motility evaluation in scratch assay / N.Y. Gotsulyak [et al.] // *Biopolymers and Cell*. – 2014. – Vol. 30, N 3. – P. 223-228.
13. Liang, C.C. In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro / C.C. Liang, A.Y. Park, J.L. Guan // *Nat Protoc*. – 2007. – Vol. 2. – P. 329-333.
14. Boyden S. The chemotactic effect of mixtures of antibody and antigen on polymorphonuclear leucocytes / S. Boyden // *J. Exp Med*. – 1962. – Vol. 115. – P. 453-466.
15. In vitro tumor models: advantages, disadvantages, variables, and selecting the right platform / M.E. Katt [et al.] // *Frontiers in bioengineering and biotechnology*. – 2016. – Vol. 4. – P. 12.
16. Fidler I.J. The organ microenvironment and cancer metastasis / I.J. Fidler // *Differentiation*. – 2002. – Vol. 70. – P. 498-505.
17. Hynes R.O. The extracellular matrix: not just pretty fibrils // *Science*. – 2009. – Vol. 326, N 5957. – P. 1216-1219.
18. Collagen-based cell migration models in vitro and in vivo / K. Wolf [et al.] // *Semin. Cell Dev. Biol*. – 2009. – Vol. 20. – P. 931-941.
19. Hu, M. Microenvironmental regulation of cancer development / M. Hu, K. Polyak // *Curr Opin Genet Dev*. – 2008. – Vol. 18. – P. 27-34.
20. Quail D.F. Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis / D.F. Quail, J.A. Joyce // *Nat Med*. – 2013. – Vol. 19, N 11. – P. 1423-1437.

21. An automated high-content assay for tumor cell migration through 3-dimensional matrices / V. Echeverria [et al.] // J. Biomol. Screen. – 2010. – Vol.15. – P. 1144-1151.
22. Friedl P. The biology of cell locomotion within three-dimensional extracellular matrix / P. Friedl, E.B. Bröcker // Cell Mol Life Sci. – 2000. – Vol. 57. – P. 41-64.
23. Robust single-particle tracking in live-cell time-lapse sequences / K. Jaqaman [et al.] // Nat. Methods. – 2008. – Vol. 5. – P. 695-702.

УДК 616.351-008.1+617-089
© Р.Р. Хасанов, 2017

Р.Р. Хасанов
**УДЛИНЯЮЩИЕ КИШЕЧНИК ОПЕРАЦИИ
ПРИ СИНДРОМЕ КОРОТКОЙ КИШКИ У ДЕТЕЙ**
*ФГБОУ ВО «Башкирский государственный медицинский университет»
Минздрава России, г. Уфа*

Синдром короткой кишки (СКК) – это тяжелое заболевание, развившееся в результате массивной резекции кишечника и проявляющееся хронической кишечной недостаточностью. Лечение детей с СКК является сложной проблемой. Хроническая кишечная недостаточность у таких пациентов корректируется длительным использованием парентерального питания, которое является жизненно необходимым элементом лечения при СКК. Однако длительное применение парентерального питания сопряжено с риском развития опасных для жизни осложнений. В настоящее время наиболее эффективными методами хирургического лечения СКК являются методы удлинения тонкой кишки – метод продольного кишечного удлинения (longitudinal intestinal lengthening and tailoring) и последовательная поперечная энтеропластика (serial transverse enteroplasty). Применение этих методов направлено на увеличение контакта питательных веществ со слизистой оболочкой кишечника и уменьшение патологического застоя кишечного содержимого. Это достигается увеличением длины кишечника и сужением его просвета. Обе удлиняющие кишечник операции эффективны и безопасны. Каждая из методик имеет свои особенности.

Ключевые слова: синдром короткой кишки, метод продольного кишечного удлинения и последовательная поперечная энтеропластика, дети.

R.R. Khasanov
**BOWEL LENGTHENING SURGERY
FOR SHORT BOWEL SYNDROME IN CHILDREN**

Short bowel syndrome is a severe condition, which developed as a result of a massive small bowel resection and manifests itself as a chronic intestinal failure. Treatment of children with SBS is a complex problem. Chronic intestinal failure is managed with long-lasting parenteral nutrition, which is a vital element of treatment of such patients. However, long-lasting parenteral nutrition increases risks of life-threatening complications. Nowadays the most effective treatment of short bowel syndrome is considered to be longitudinal intestinal lengthening and tailoring, and serial transverse enteroplasty. These methods increase contact between nutrients and mucosa and reduce intestinal stasis. This is achieved by increasing the length of the intestine, narrowing its lumen. Both methods are safe and effective procedures and each of the methods has its own peculiarities.

Key words: short bowel syndrome, longitudinal intestinal lengthening and tailoring, serial transverse enteroplasty, children.

Синдром короткой кишки (СКК) – это заболевание, возникающее в результате массивной резекции кишечника и выражающееся хронической кишечной недостаточностью [1, 2]. Описаны также случаи врожденного СКК [3]. Основными клиническими проявлениями СКК являются мальабсорбция, мальдигестия и мальнутриция [1,4,5]. Причиной СКК у детей являются заболевания, требующие обширных резекций тонкой кишки: гастрошизис, некротический энтероколит, атрезия кишечника, заворот кишок [6,7], болезнь Гиршпрунга с длинным аганглионарным сегментом – синдром Цюльцера–Уилсона и др. [8-11]. Лечение детей с СКК является сложной проблемой.

Хроническая кишечная недостаточность у таких пациентов корректируется длительным использованием парентерального питания, которое является жизненно необходимым элементом лечения при СКК. Однако дли-

тельное применение парентерального питания сопряжено с риском развития опасных для жизни осложнений, таких как печеночная недостаточность, катетерассоциированный сепсис, катетериндуцированный венозный тромбоз и др.

Из методов хирургического лечения СКК в настоящее время наиболее широко применяются операции по удлинению кишечника – продольное кишечное удлинение и сшивание (LILT) и серийная поперечная энтеропластика (STEP).

Основной целью хирургического лечения СКК являются увеличение площади контакта между слизистой оболочкой тонкой кишки и кишечным содержимым, а также увеличение времени прохождения пищи по тонкой кишке [1,2].

В настоящее время наиболее эффективными методами хирургического лечения СКК являются операции по удлинению тонкой