

Методики

УДК 612.33

В.А.Томчук, П.В.Усатюк, М.І.Цвіліховський, Д.О.Мельничук

Отримання ізольованих клітин епітелію тонкого кишечника великої рогатої худоби

Изучено получение клеток эпителия пустой кишки взрослых животных большого рогатого скота химическим (цитрат/ЕУДТО) и ферментативным (коллагеназа, гиалуронидаза, акризим-3) методами. Случивание клеток с кишечной ворсинки контролировали по времени инкубации (5, 15 и 30 мин) гистологически и по возрастанию белка в среде. Жизнеспособность полученных клеток оценивали по окрашиванию 0,1 %-ным трипановым синим и по нарастанию активности лактатдегидрогеназы. Морфологические показатели изучали электронно-микроскопически. По своей эффективности методы получения эпителиальных клеток можно разместить в следующий ряд: коллагеназный, гиалуронидазный, цитратный, акризимный.

Вступ

Використання ізольованих клітин є найбільш адекватним методом при вивченні функціональних властивостей тонкого кишечника. Відділення епітеліального пласта від підслизової основи можливе при дії на кишкову стінку різноманітних чинників [4, 6, 8—10]. Нині описано відповідні процедури для різних тварин [4, 9, 10]. У той же час, залежно від методу та об'єкту дослідження [10] умови отримання клітин можуть відрізнятися.

Метою нашого дослідження було розробити оптимальні умови для отримання ізольованих життєздатних клітин епітелію тонкого кишечника великої рогатої худоби з використанням відомих дезагрегуючих чинників.

Методика

Передню частину порожньої кишки великої рогатої худоби чорно-рябої породи (віком 2—6 років) промивали розчином Рінгера (рН 7,4; 6—8 °С), розрізали на ділянки по 10 см, вивертали і розміщували в попередньо оксигеноване сумішшю кисню (95 %) і вуглекислого газу (5 %) інкубаційне середовище об'ємом 20 мл, струшували у термобані 45—60 разів за хвилину. Інкубаційні середовища для отримання епітеліальних клітин ферментативним методом містили (ммоль/л): 120 NaCl; 4,7 KCl; 10 HEPES-трис; 1,2 MgSO₄; 1,2 KH₂PO₄; 0,5 CaCl₂; 15 NaHCO₃; 100 манніту та різні ферменти в кількості: 0,05 % колагенази фірми «Merck» (США) з питомою

активністю 5000 од/мл у безкальцієвому середовищі, 0,1 % гіалуронідази фірми «Реахім» (Латвія), 0,1 % акризиму-3 фірми «Діагностикум» (Україна). Концентрацію ферментів було встановлено в попередніх дослідах [5]. У кінці інкубації (15 хв) суспензію клітин осаджували на кутовому роторі 4—5 хв при 500 g з дворазовою промивкою. Кінцевий осад клітин (1—4 мг/мл) використовували відразу, або зберігали в рідкому азоті. У випадку хімічного методу [9], промиту та вивернуту ділянку кишечника спочатку інкубували при 37 °C у середовищі «А» складом (ммоль/л): 96 NaCl; 1,5 KCl; 27 цитрат натрію; 5,6 $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$; (pH 7,3), через 10 хв інкубацію продовжували в розчині «Б» (ммоль/л): 140 NaCl; 16 Na_2HPO_4 ; 1,5 ЕДТО; 0,5 дитіотрейтолу (pH 7,3).

Ефективність отримання клітин оцінювали за двома показниками — гістологічно, за сходженням клітин із кишкової стінки протягом 5, 15 і 30 хв інкубації та за зростанням числа клітин (мг білка) в інкубаційному середовищі в розрахунку на 1 cm^2 серозної сторони кишечника.

Цілісність плазматичної мембрани отриманих клітин визначали за здатності 0,1 %-вого трипанового синього не забарвлювати життєздатні клітини [10], а також за зростанням в інкубаційному середовищі активності цитозольного ферменту лактатдегідрогенази, який визначали відповідно Мельничук із спіавт. [2]. Кількість білка в пробах визначали за методом Lowry і спіавт. [11]. Експериментальні результати ($n=5$) оброблено статистично.

Результати та їх обговорення

Основними критеріями ефективності методу отримання епітеліальних клітин є такі: здатність діючого фактора до максимального злушчування клітин із кишкової стінки в інкубаційне середовище, гомогенність суспензії, відсутність масивних агрегатів клітин та епітеліальних пластів, нативність отриманих клітин. Як дезагрегуючі фактори ми вибрали колагеназу (КФ 3.4.24.3), яка гідролізує спіралізовані ділянки колагему [3] міжклітинних зв'язків, гіалуронідазу (КФ 3.2.1.35), що також діє в області міжклітинних контактів, гідролізуючи гіалуронат [3], суміш протеолітичних ферментів «акризим-3», яка виявилася досить ефективною в аналогічних дослідженнях на нервовій тканині [1], та простий і економний хімічний «цитрат-ЕДТО» — за методом Negazu і спіавт. [9].

Контролем були проби кишечника, які інкубували в середовищі без указаних агентів і, як видно (мал. 1, I), епітеліальні клітини (забарвлені тільки ядра) зберігаються на всій поверхні ворсинки протягом 30 хв інкубації. Загальний вихід клітин у середовище при цьому мінімальний (мал. 2).

Для дії колагенази характерним є значне злушчування клітин із ворсинок вже за 15 хв інкубації (див. мал. 1, II, б), що підтверджується також інтенсивним наростанням білка клітин у середовищі (див. мал. 2). При цьому відмічається руйнування підслизового шару, який на 30 хв дезінтегрується до основи ворсинки (вказано стрілками, див. мал. 1, II, в).

Істотний прояв гіалуронідази (див. мал. 1, III) та акризиму-3 (див. мал. 1, IV) спостерігається тільки за 30 хв інкубації (вказано стрілками). Дія цих ферментів також супроводжується деструкцією підслизового шару, на відміну від цитрат-ЕДТО (див. мал. 1, V).

Аналіз отриманого матеріалу за кількістю білка клітин (супутний матеріал і слиз відмивалися дворазово) вказує, що застосування колагенази є найбільш ефективним (див. мал. 2). Дія гіалуронідази становить 81 % від

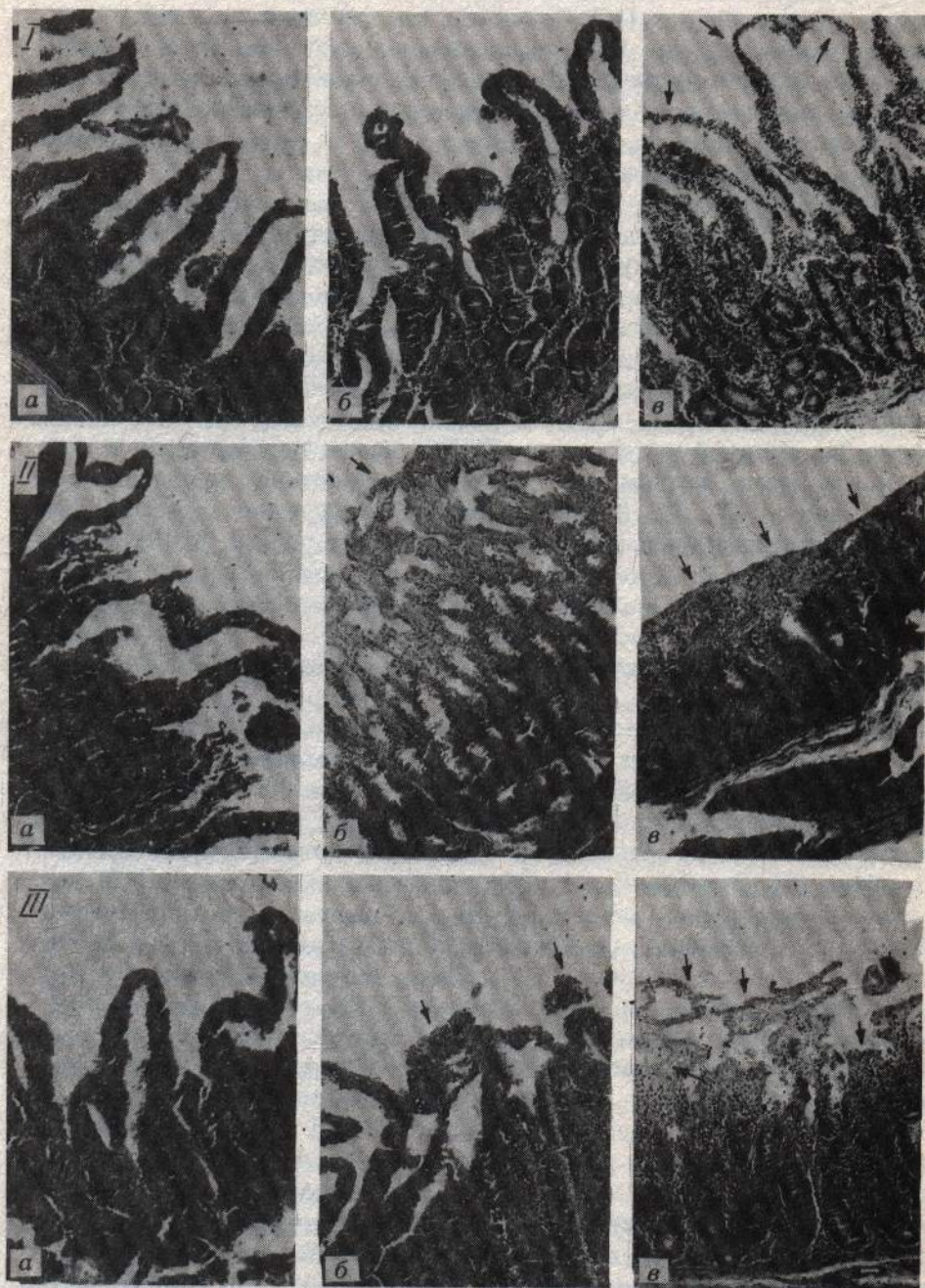
дії колагенази за 5 хв, 77 % — за 15 хв, і 69 % — за 30 хв інкубації. У той же час, наявність агрегатів та епітеліальних пластів (світлова мікроскопія) були найчисельніші при застосуванні гіалуронідази, як це зазначалось у інших працях [10]. У випадку використання колагенази і акризіму-3 суспензія клітин була гомогенна, вільна від агрегатів, і після осаджування шляхом центрифугування переходила до гомогенної суспензії при легкому струшуванні. Клітини зберігали полярність плазматичної мембрани, апікальну і базальну частини (див. мал. 1,VL), не мали явних ознак руйнування плазмалеми та клітинних органодів.

Прижиттєве забарвлення клітин за допомогою трипанового синього показало високу їх життєздатність при використанні всіх методичних підходів. Додаткову оцінку життєздатності провадили також шляхом інкубації отриманих клітин протягом двох годин (мал. 3) із метою визначення активності лактатдегідрогенази, яка вивільнюється в інкубаційне середовище з клітин, що загинули [7, 10]. З результатів видно, що клітини, отримані із застосуванням колагенази, мають найбільш високі показники життєздатності.

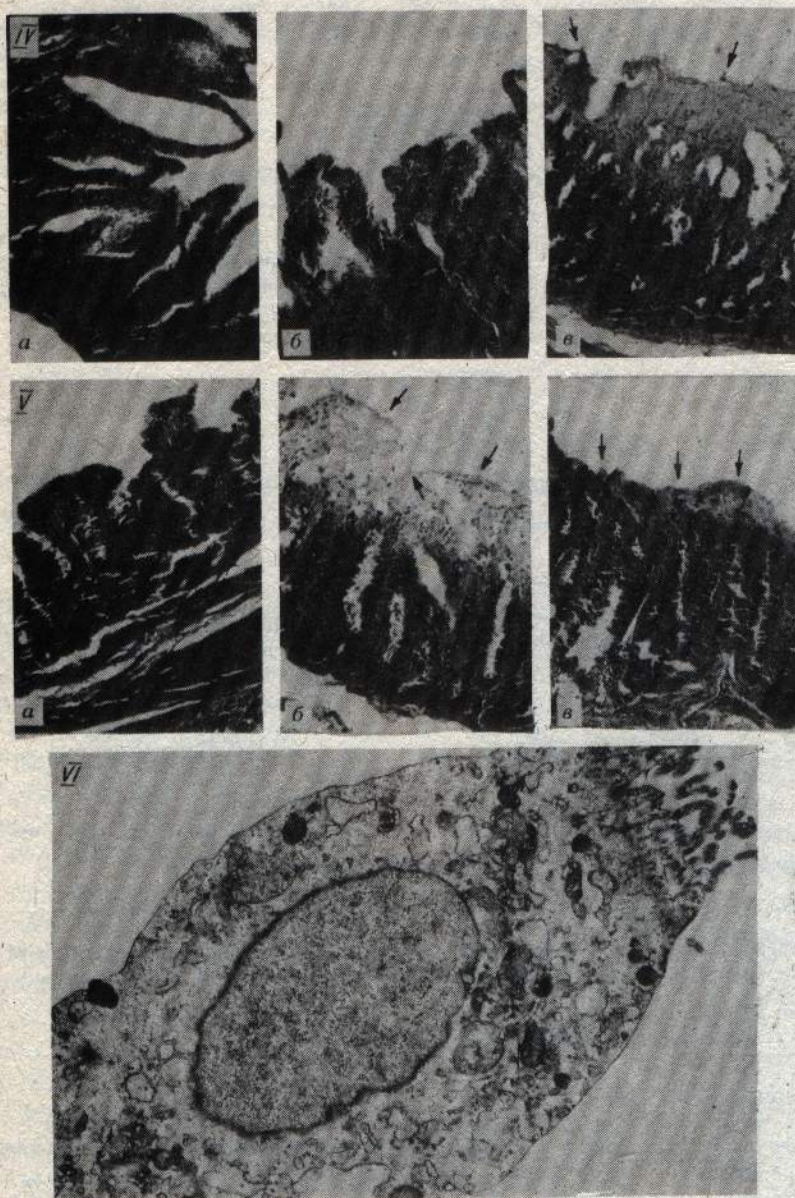
Відомо, що хімічний метод «цитрат-ЕДТО» можна застосовувати на тваринах із невисоким вмістом слизу в тонкому кишечнику, наприклад на морських свинках [7, 10]. В іншому випадку застосування цього способу призведе до отримання нероздільного згустку клітин і слизу [9, 10]. Використаний нами вперше метод «цитрат-ЕДТО» для великої рогатої худоби, очевидно, відповідає цим вимогам. Перевагою хімічного методу є його простота і економічність. До недоліків можна віднести все ж невисокий вихід матеріалу (див. мал. 2) внаслідок можливої зміни зовнішньоклітинної концентрації Ca^{2+} .

Ферментативний метод має безумовні переваги за селективністю дії, ефективною та швидкістю отримання клітин. Але використання трипсину [4], наприклад, має обмеження за рахунок можливості порушення мембранних білкових систем [10]. Так, як відомо, що інкубація клітин в присутності трипсину більше 15 хв призводить до загибелі 50 % популяції клітин [8]. Отримання клітин за допомогою гіалуронідази [10] попереджує гелеутворення, характеризується м'якою дією на плазматичну мембрану, що і виражається високою їх життєздатністю. При цих самих позитивних ознаках колагеназа, без домішок протеолітичних ферментів, дозволяє значно підвищити вихід матеріалу. Так, за нашими результатами, при практично однакових показниках життєздатності (трипановий синій, вивільнення лактатдегідрогенази) кількість клітин із 1 см^2 кишкової стінки, отриманих за допомогою колагенази на 23 % вище. Високий вихід матеріалу та короткий час інкубації (15 хв) робить метод із застосуванням колагенази найбільш ефективним. У цілому, за своєю ефективністю використані методи можна розташувати у такий ряд: колагеназний, гіалуронідазний, цитратний, акризімний. Отримання епітеліальних клітин із тонкого кишечника великої рогатої худоби ферментативним методом за умов описаної нами модифікації осмолярності інкубаційного середовища маннітом (осмолярно-ферментативний метод) може включати в механізм дії осмотичні ефекти, описані в праці Del Castillo [7].

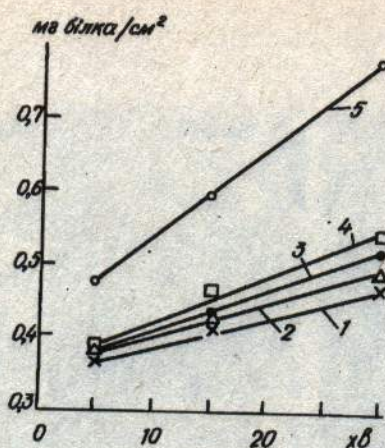
Таким чином, у результаті проведених досліджень розроблено оптимальні умови для отримання ізольованих клітин епітелію тонкого кишечника великої рогатої худоби хімічним та осмолярно-ферментативним методами.



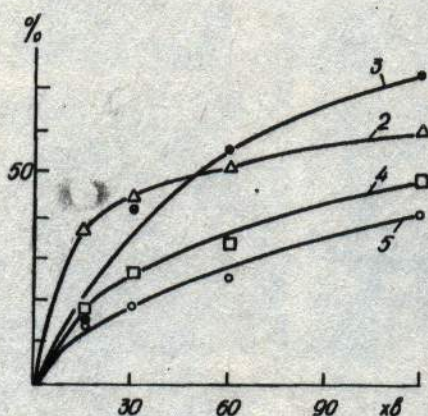
Мал. 1. Гістологічний та морфологічний контроль отримання клітин епітелію за результатами луронідаза, IV — акризим-3, V — цитрат-ЕДТО за 5 хв інкубації (а), 15 хв (б) і 30 хв (в).



світлової (I—V) та електронної (VI) мікроскопії: I — контроль, II — колагеноза, III — фіброз
36. 400. VI — одиночна клітина епітелію. 36. 10000. Пояснення в тексті.



Мал. 2. Ефективність одержання клітин епітелію тонкого кишечника (мг білка/см²) залежно від діючого фактора: 1 — контроль, 2 — акризим-3, 3 — цитрат-ЕДТО, 4 — гіалуронідаза, 5 — колагеназа.



Мал. 3. Відносне (%) зростання активності лактатдегідрогенази в інкубаційному середовищі, що містить епітеліальні клітини, отримані різними методами. За 100 % активності прийнято контрольну пробу з 0,05 %-вим тритоном. 36. 100. Позначення такі ж самі як на мал. 2.

V.A.Tomchuk, P.V.Usatyuk, M.I.Tsvilikhovsky, D.A.Melnichuk

PREPARATION OF ISOLATED INTESTINE EPITHELIAL CELLS OF CATTLE

Experimental conditions are developed for obtaining isolated intestine epithelial cells of cattle by enzymatic (collagenase, gyaluronidase, akryzim-3) and chemical (cytric/EDTA) methods.

Ukrainian Agrarian University,
Ministry of Agriculture and Foodstuffs of Ukraine, Kiev

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Ключко Е.М., Цыдренко А.Я. Ферментативная изоляция пирамидных нейронов гиппокампа крысы // Физиол. журн. — 1987. — 33, № 2. — С. 115—119.
2. Мельничук Д.А., Усатюк П.В., Томчук В.А. Вуглеводний і енергетичний обмін в ізольованому епітелію тонкого кишечника великої рогатої худоби різного віку та при патології // Доп. АН України. — 1991. — № 11. — С. 133—135.
3. Номенклатура ферментов. — М.: Наука, 1979. — 321 с.
4. Сухомлинов Б.Ф., Федорович А.М., Чайка Я.П. К методике получения интактных энтероцитов из слизистой двенадцатиперстной кишки крыс // Укр. биохим. журн. — 1983. — 55, № 2. — С. 199—201.
5. Томчук В.А., Усатюк П.В., Мельничук Д.А. Изолированные клетки эпителия тонкого кишечника и их характеристика // XV Всес. симп. «Физиол. пищеварения и всасывания». — Краснодар, 1990. — 281 с.
6. Уголев А.М., Митюшова Н.М., Гозите И.К. Методика изоляции эпителиальных клеток слизистой тонкой кишки // Физиол. журн. СССР. — 1969. — 55, № 12. — С. 1513—1517.
7. Del Castillo J.R. The use of hyperosmolar, intracellular-like solutions for the isolation of epithelial cells from guinea-pig small intestine // Biochim. Biophys. acta. — 1987. — 901, № 2. — Р. 201—208.