

УДК 577.2+577.29+57.021

## Анализ динамики электрической емкости монослоя клеток Сасо-2 на поздних этапах дифференцировки клеток

© 2019 Т. Н. ГЕРАСИМЕНКО<sup>1</sup>, С. В. НИКУЛИН<sup>1, 2, \*</sup>, В. А. ПЕТРОВ<sup>1</sup>, Д. А. САХАРОВ<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Научно-технический центр «БиоКлиникум», Москва, 115088

<sup>2</sup>Дальневосточный федеральный университет, Владивосток, 690091

\*e-mail: s.nikulin@bioclinicum.com

Поступила в редакцию 23.10.2019 г.

После доработки 10.11.2019 г.

Принята к публикации 15.11.2019 г.

В результате мониторинга в режиме реального времени электрической емкости (импедансная спектроскопия) получены свидетельства в пользу того, что структуры, напоминающие ворсинки кишечника, формируются при культивировании в статических условиях так же, как и при культивировании в микрофлюидных чипах. С помощью транскриптомного анализа было показано, что сигнальный путь Nn, участвующий в образовании ворсинок *in vivo*, принимает участие и в образовании похожих структур *in vitro*.

**Ключевые слова:** импедансная спектроскопия, кишечник, ворсинки, электрическая емкость, Nn

**doi:** 10.21519/0234-2758-2019-35-6-87-90

*In vitro* модели кишечного барьера широко применяются как для фундаментальных биологических исследований, так и для прикладных исследований, включая моделирование заболеваний и разработку лекарственных средств [1]. Традиционно для создания таких моделей используются клеточные линии, наиболее популярной из которых является линия клеток Сасо-2 [2]. Однако растущая потребность в *in vitro* моделях, воспроизводящих микроархитектурные особенности ткани в живом организме, привела в последние годы к созданию эффективных методов получения функциональных барьеров из первичных клеток [3, 4].

Важным параметром, который необходимо учитывать при проведении экспериментов с *in vitro*-моделями кишечника, является степень дифференцированности энтероцитов. Известно, что в процессе дифференцировки эпителия кишечника на поверхности клеток образуется большое количество микроворсинок, существенно увеличивающих площадь апикальной мембраны [5]. С другой стороны, площадь поверхности кишечника в живом организме также существенно увеличива-

ется за счет образования выростов (ворсинок) соединительной ткани, покрытых эпителиальными клетками [6]. Ранее в литературе было показано, что при помощи импедансной спектроскопии возможно оценить не только трансэпителиальное сопротивление, которое отражает состояние плотных контактов, но и другие электрические параметры монослоя клеток кишечника, включая электрическую емкость и фоновое сопротивление [7–9]. При этом известно, что электрическая емкость растет в процессе дифференцировки по мере роста площади поверхности монослоя клеток [8]. Ранее нами было показано, что рост электрической емкости может быть объяснен увеличением числа микроворсинок на поверхности энтероцитов [10]. Однако в недавней работе было обнаружено, что клетки линии Сасо-2 при культивировании в микрофлюидных чипах способны образовывать структуры, напоминающие ворсинки в кишечнике [11]. Причем на основании математического моделирования было предсказано падение электрической емкости клеток при сильном увеличении площади поверхности ворсинок [11].

Сокращения: R – коэффициент корреляции Пирсона.

На сегодняшний день считается, что в организме ворсинки образуются в ходе эмбриогенеза за счет комплексного взаимодействия эпителиальных и стромальных клеток [12, 13]. Молекулярный механизм образования ворсинок на данный момент изучен недостаточно, однако, известно, что одним из основных сигнальных путей, принимающих участие в этом процессе, является сигнальный путь Hh.

Перед настоящим исследованием была поставлена цель, убедиться в возможности формирования структур, напоминающих ворсинки, клетками линии Caco-2 в статических условиях. Поставленная задача требовала провести непрерывный мониторинг электрической емкости монослоя клеток на поздних этапах дифференцировки, а также транскриптомный анализ для оценки роли сигнального пути Hh в формировании структур, напоминающих ворсинки, *in vitro*.

## УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

### Реактивы и материалы

В работе были использованы следующие материалы и реактивы: культуральные флаконы с площадью поверхности 25 см<sup>2</sup> (TPP, Швейцария); питательная среда MEM (Gibco, США), фетальная бычья сыворотка (Gibco); раствор пенициллина 10000 МЕ/мл и стрептомицина 10000 мкг/мл (Gibco); раствор трипсина-ЭДТА 0,25% с солями Хенкса («ПанЭко», Россия); раствор DPBS («ПанЭко»); 96-луночные планшеты с мембранными вставками (средний размер поры – 1 мкм) Transwell (Corning, США).

### Культивирование эпителиальных клеток кишечника Caco-2

После разморозки клетки Caco-2 культивировали в клеточном инкубаторе (5% CO<sub>2</sub>, 37 °C) в культуральных флаконах. В эксперименте была использована питательная среда MEM с добавлением 20% (об.) фетальной бычьей сыворотки и 1% (об.) раствора пенициллина и стрептомицина. Пересев производили каждые два-три дня.

Перед посевом клеток Caco-2 в мембранные вставки все луки заполняли питательной средой (50 мкл в апикальную часть, 235 мкл в базолатеральную часть) и помещали планшет в клеточный инкубатор (5% CO<sub>2</sub>, 37 °C) на 1 ч. Затем в каждую мембранную вставку добавляли по 50 мкл клеточной суспензии с концентрацией клеток 112000 кл/мл. Далее, в течение всего эксперимента инкубировали мембранные вставки в клеточном инкубаторе (5% CO<sub>2</sub>, 37 °C). Смену среды производили каждые два-три дня.

## Мониторинг импеданса клеток Caco-2 в режиме реального времени

Импеданс-спектры получали в диапазоне частот от 20 Гц до 20 кГц (200 точек), при помощи системы импедансной спектроскопии (НТЦ «БиоКлиникум»). Так как стандартные хлорсеребряные электроды оказывают выраженное токсическое воздействие на клетки [14], в данной работе были использованы позолоченные электроды (НТЦ «БиоКлиникум»). Измерения проводили в режиме реального времени с интервалом 1 ч. Эксперимент проводили в трех повторностях. Для расчета электрической емкости клеточного монослоя была использована упрощенная эквивалентная схема, состоящая из элемента постоянной фазы, трансэпителиального сопротивления и фонового сопротивления  $R_m$  [15]. Первичную обработку полученных данных проводили при помощи ПО CEISA Impedance fitting (НТЦ «БиоКлиникум»), статистическую обработку проводили при помощи языка программирования R 3.5 с интегрированной средой разработки RStudio 1.1. Для выявления наличия (либо отсутствия) зависимости измеряемых электрических параметров от времени с момента начала эксперимента вычисляли коэффициент корреляции Пирсона ( $R$ ) и уровень значимости  $p$ , используя библиотеку Psych.

### Транскриптомный анализ

Для анализа уровней экспрессии основных генов сигнального пути Hh в дифференцированных и недифференцированных клетках Caco-2 использовали микрочипы GeneChip Human Genome 1.0 ST (Affymetrix) [9, 10, 16, 17].

Обработку полученных результатов проводили при помощи программного обеспечения TAC 4.0 (Thermo Fisher Scientific). Оценку статистической достоверности различий уровней экспрессии генов проводили на основании результатов однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с поправкой Бенджамини–Хохберга. Пороговый уровень значимости был равен 0,05. Гены, с уровнем экспрессии ниже 6,0 по логарифмической шкале Affymetrix считались неэкспрессирующимися.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

### Динамика изменений электрической емкости

Результаты мониторинга электрической емкости клеток Caco-2 в режиме реального времени приведены на рис. 1.

Из полученных данных видно, что электрическая емкость монотонно возрастает на промежутке времени от 16 до 16,5 сут ( $R = 0,98$ ;  $p < 0,001$ ).

При этом, ранее неоднократно было показано, что электрическая емкость клеток Caco-2 растет в процессе их роста и дифференцировки [8, 10, 11]. Однако мониторинг в режиме реального времени позволил выявить остановку роста в период между 16,5 и 19-ми сутками (скачок в районе 18-х суток является артефактом, наблюдавшимся после смены среды) и последующее монотонное падение вплоть до 21-х суток ( $R = -0,98$ ;  $p < 0,001$ ). Падение емкости после 19-х суток согласуется с проведенным ранее математическим моделированием [11] и свидетельствует об образовании больших структур, напоминающих ворсинки кишечника, которые увеличивают площадь поверхности по крайней мере в 4,5 раза. При меньшем соотношении площади ворсинок с площадью поверхности мембраны, на которой растут клетки, по мере роста ворсинок, наоборот, должен наблюдаться рост электрической емкости [11].

### Роль экспрессии генов сигнального пути Hh в формировании структур

На сегодняшний день известно, что лиганды Hh секретируются пролиферирующими эпителиальными клетками кишечника и стимулируют образование кластеров мезенхимальных клеток, ле-

жащих в основе формирующихся ворсинок [12]. При этом блокирование сигнального пути Hh полностью останавливает образование ворсинок, а стимулирование, наоборот, приводит к росту их числа и увеличению размеров [12, 13]. В результате проведенного транскриптомного анализа было обнаружено, что уровни экспрессии Hh лигандов *SHH* (Sonic Hedgehog) и *DHH* (Desert Hedgehog) не изменились в ходе роста и дифференцировки клеток Caco-2 ( $p = 0,519$  и  $p = 0,518$  соответственно). При этом уровень экспрессии лиганда *IHH* (Indian Hedgehog) вырос в дифференцированных клетках Caco-2, по сравнению с недифференцированными, в 1,36 раза ( $p = 0,038$ ). В полностью дифференцированных клетках также возросла в 1,25 раза экспрессия *PTCH1* гена рецептора к лигандам Hh ( $p = 0,006$ ). Полученные данные свидетельствуют об участии сигнального пути Hh в образовании структур, напоминающих ворсинки кишечника, несмотря на отсутствие в рассматриваемой *in vitro*-модели мезенхимальных клеток.

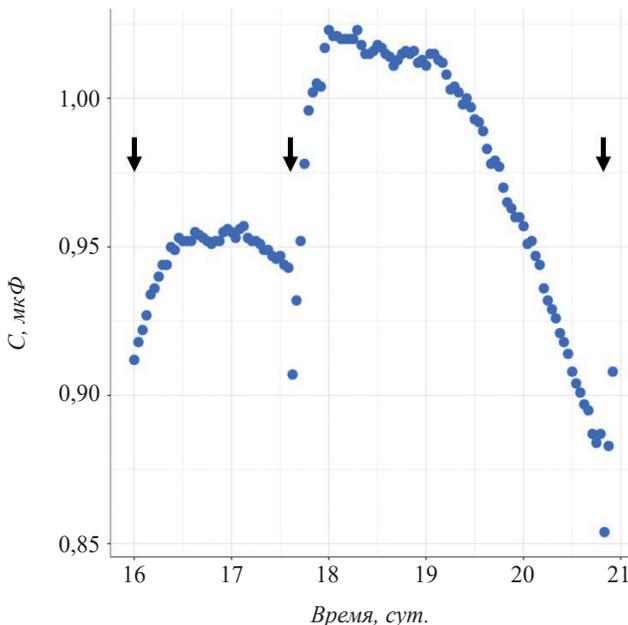
Таким образом, в данной работе при помощи мониторинга электрической емкости в режиме реального времени были получены данные, свидетельствующие об образовании в статичной *in vitro*-модели кишечника на основе клеток Caco-2 структур, напоминающих ворсинки кишечника *in vivo*. Начало снижения электрической емкости вслед за ее увеличением может стать хорошим индикатором дифференцировки клеток при применении импедансной спектроскопии для мониторинга более продвинутых *in vitro* моделей кишечника на основе первичных клеток. При этом из анализа транскриптомов следует, что сигнальный путь Hh, участвующий в образовании ворсинок *in vivo*, активен в эпителиальных клетках в процессе образования ворсинкоподобных структур *in vitro*.

### ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского Научного Фонда (проект № 16-19-10597).

### ЛИТЕРАТУРА

1. Torras N., García-Díaz M., Fernández-Majada V., Martínez E. Mimicking epithelial tissues in three-dimensional cell culture models. *Front. Bioeng. Biotechnol.*, 2018, 6, 1–7.
2. Shah P., Jogani V., Bagchi T., Misra A. Role of Caco-2 cell monolayers in prediction of intestinal drug absorption. *Biotechnol. Prog.*, 2006, 22, 186–198.
3. Kasendra M., Tovaglieri A., Sontheimer-Phelps A., et al. Development of a primary human small intestine-on-a-chip using biopsy-derived organoids. *Sci. Rep.*, 2018, 8, 2871.



**Рис. 1.** Зависимость электрической емкости ( $C$ ) от времени с момента начала эксперимента при мониторинге дифференцировки клеток Caco-2. Стрелки указаны моменты времени, когда происходила смена культуральной среды

**Fig. 1.** Representative plot of electrical capacitance versus time for monitoring the differentiation of Caco-2 cells (moments of change of culture medium are marked by arrows).

4. Moon C., VanDussen K.L., Miyoshi H., Stappenbeck T.S. Development of a primary mouse intestinal epithelial cell monolayer culture system to evaluate factors that modulate IgA transcytosis. *Mucosal Immunol.*, 2014, 7, 818–828.
5. Crawley S.W., Shifrin D.A., Grega-Larson N.E., et al. Intestinal brush border assembly driven by protocadherin-based intermicrovillar adhesion. *Cell.*, 2014, 157, 433–446.
6. Shyer A.E., Tallinen T., Nerurkar N.L., et al. Villification: How the gut gets its villi. *Science*, 2013, 342, 212–218.
7. Poloznikov A., Gazaryan I., Shkurnikov M., et al. *In vitro* and *in silico* liver models: Current trends, challenges and opportunities. *ALTEX*. 2018, 35, 397–412.
8. Henry O.Y.F., Villenave R., Cronce M.J., et al. Organs-on-chips with integrated electrodes for trans-epithelial electrical resistance (TEER) measurements of human epithelial barrier function. *Lab. Chip.*, 2017, 17, 2264–2271.
9. Nikulin S.V., Knyazev E.N., Gerasimenko T.N., et al. Non-invasive evaluation of extracellular matrix formation in the intestinal epithelium. *Bull. Exp. Biol. Med.*, 2018, 166, 35–38.
10. Nikulin S.V., Knyazev E.N., Poloznikov A.A., et al. Expression of SLC30A10 and SLC23A3 transporter mRNAs in Caco-2 cells correlates with an increase in the area of the apical membrane. *Mol. Biol.*, 2018, 52, 577–582.
11. van der Helm M.W., Henry O.Y.F., Bein A., et al. Non-invasive sensing of transepithelial barrier function and tissue differentiation in organs-on-chips using impedance spectroscopy. *Lab Chip.*, 2019, 19, 452–463.
12. Walton K.D., Freddo A.M., Wang S., Gumucio D.L. Generation of intestinal surface: an absorbing tale. *Development.*, 2016, 143, 2261–2272.
13. Chin A.M., Hill D.R., Aurora M., Spence J.R. Morphogenesis and maturation of the embryonic and postnatal intestine. *Semin. Cell Dev. Biol.*, 2017, 66, 81–93.
14. Dymond A.M., Kaechele L.E., Jurist J.M., Crandall P.H. Brain tissue reaction to some chronically implanted metals. *J. Neurosurg.*, 1970, 33, 574–580.
15. Nikulin S.V., Knyazev E.N., Gerasimenko T.N., et al. Impedance spectroscopy and transcriptome analysis of choriocarcinoma BeWo b30 as a model of human placenta. *Mol. Biol.*, 2019, 53, 411–418.
16. Samatov T.R., Senyavina N.V., Galatenko V.V., et al. Tumour-like druggable gene expression pattern of Caco2 cells in microfluidic chip. *BioChip J.*, 2016, 10, 215–220.
17. Semenova O.V., Petrov V.A., Gerasimenko T.N., et al. Effect of circulation parameters on functional status of heparg spheroids cultured in microbio reactor. *Bull. Exp. Biol. Med.*, 2016, 161, 425–429.

## Analysis of the Dynamics of the Electric Capacitance of a Cell Monolayer at the Late Stages of Caco-2 cell Differentiation

T.N. GERASIMENKO<sup>1</sup>, S.V. NIKULIN<sup>1,2,\*</sup>, V.A. PETROV<sup>1</sup>, and D.A. SAKHAROV<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Bioclinicum Scientific Research Center, Moscow, 115088 Russia*

<sup>2</sup>*Far Eastern Federal University, Vladivostok, 690091 Russia*

\**e-mail*: s.nikulin@bioclinicum.com

Received October 23, 2019

Revised November 10, 2019

Accepted November 15, 2019

**Abstract**—The real-time monitoring of electric capacitance (impedance spectroscopy) allowed obtaining evidence that structures which look like intestinal villi can be formed during the cultivation under static conditions as well as during the cultivation in microfluidic chips. It was shown in this work via transcriptome analysis that the Hh signaling pathway is involved in the formation of villus-like structures *in vitro*, which was previously shown for their formation *in vivo*.

**Key words**: impedance spectroscopy, intestine, villi, electric capacitance, Hh

**Funding**—The study was funded by the Russian Science Foundation (Project 16-19-10597).

**doi**: 10.21519/0234-2758-2019-35-6-87-90