

УДК 616-006.699

КЛЕТОЧНАЯ ГЕТЕРОГЕННОСТЬ И АУТОФАГИЯ В ПОПУЛЯЦИИ ГЕПАТОКАРЦИНОМЫ-29

*Н.П. Бгатова, Р.С. Досымбекова, А.М. Рахметова, С.А. Бахбаева, К.О. Шарипов,
З.Б. Тунгушбаева, Ш.М. Жумадина, Ю.С. Таскаева, В.В. Макарова, А.О. Соловьева, Ю.И. Бородин*

Проблема индукции гибели раковой клетки определяет сложность направленного воздействия на жизненный цикл опухолевой клетки. Целью исследования было изучение клеточной гетерогенности популяции гепатокарциномы-29 и развития аутофагии как способа выживания опухолевых клеток. Выявлена гетерогенность популяции клеток Г-29, которая определяется размерами клеток и объемной долей ядра и цитоплазмы. По объему клеток и ядерно-цитоплазматическому соотношению выделено пять типов клеток, соответствующих пяти стадиям дифференцировки. В клетках IV и V стадий дифференцировки выявлены аутофагические структуры: аутофагосомы, аутолизосомы и лизосомы.

Ключевые слова: гепатокарцинома-29; гетерогенность; стадии дифференцировки клеток; аутофагия.

**ГЕПАТОКАРЦИНОМА-29 ПОПУЛЯЦИЯСЫНДАГЫ АУТОФАГИЯ
ЖАНА КЛЕТКАЛУУ ГЕТЕРОГЕНДҮҮЛҮК**

Рак клеткасынын жок болуу индукциясы көйгөйү шишик клеткасынын жашоо циклине таасир тийгизүүгө багытталган татаалдыкты аныктайт. Изилдөөнүн максаты гепатокарцинома-29 популяциясынын клеткалык гетерогендүүлүгүн жана шишик клеткаларынын жашап кетүү ыкмасы катары аутофагиянын өнүгүүсүн изилдөө болуп эсептелет. Г-29 клеткаларынын популяциясынын гетерогендүүлүгү аныкталды, ал клеткалардын өлчөмү жана ядронун жана цитоплазманын көлөмдүү үлүшү менен аныкталат. Клеткалардын көлөмү жана ядролук-цитоплазмалык шайкештик боюнча дифференцирлөөнүн беш стадиясына туура келген клеткалардын беш тиби аныкталды. Дифференцирлөө стадияларынын IV жана V клеткаларында төмөнкү аутофагиялык түзүмдөр аныкталды: аутофагосомдор, аутолизосомдор жана лизосомдор.

Түйүндүү сөздөр: гепатокарцинома-29; гетерогендүүлүк; клеткалардын дифференцирлөө стадиялары; аутофагия.

**CELLULAR HETEROGENEITY AND AUTOPHAGY IN A POPULATION
OF HEPATOCARCINOMA-29**

*N.P. Bgatova, R.S. Dosymbekova, A.M. Rakhmetova, S.A. Bakhbaeva, K.O. Sharipov, Z.B. Tungushbaeva,
Sh.H. Zhumadina, Yu.S. Taskaeva, V.V. Makarova, A.O. Soloveyva, Yu.I. Borodin*

The problem of induction of cancer cell's death determines the complexity of the directional impact on the life cycle of the tumor cell. The aim of the research was to explore the cellular heterogeneity of the hepatocarcinoma-29 population and the development of autophagy as a way of survival of tumor cells. The heterogeneity of the population of cells G-29, which is determined by the size of cells and the volume fraction of the nucleus and cytoplasm, was revealed. By cell volume and nuclear-cytoplasmic ratio, five types of cells corresponding to five stages of differentiation were identified. Autophagic structures: autophagosomes, autolysosomes and lysosomes were revealed in cells of IV and V stages of differentiation.

Keywords: hepatocarcinoma-29; heterogeneity; stages of cell differentiation; autophagy.

Одной из актуальных проблем современной биологии и медицины является проблема индукции гибели раковой клетки. Гетерогенность популяции опухолевых клеток, наличие стволовых

раковых клеток и клеток, находящихся на разных стадиях клеточной дифференцировки и клеточного цикла обуславливают сложность направленного воздействия на жизненный цикл опухолевой

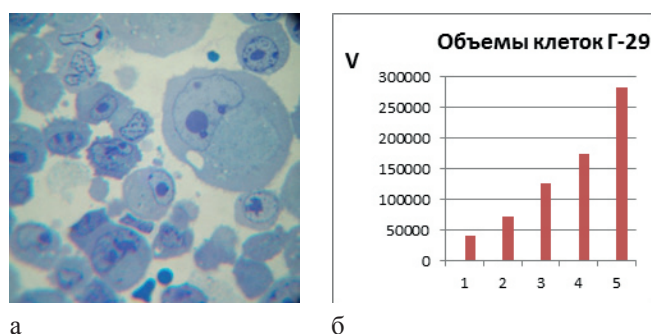


Рисунок 1 – Гетерогенность популяции Г-29:

а – различные размеры клеток Г-29. Окраска толуидиновым синим. Увеличение $\times 400$;

б – распределение клеток Г-29 по величине их объемов; 1–5 – типы клеток, исходя из величины их объема;

V – величина объема клеток в $\mu\text{м}^3$

клетки. Гепатокарцинома является одной из наиболее агрессивных опухолей человека. Подобно другим солидным опухолям [1] гепатокарцинома характеризуется высокой степенью гетерогенности популяции опухолевых клеток [2]. Актуальным является поиск конкретных морфологических признаков структурно-функциональной организации опухоли, использование которых стало бы рутинным методом для оценки прогноза и эффективности лечения.

Целью исследования было изучение клеточной гетерогенности популяции гепатокарциномы-29 и развития аутофагии как способа выживания опухолевых клеток.

Методика исследования. Гепатокарцинома-29 (Г-29) была получена и верифицирована сотрудниками Института цитологии и генетики СО РАН [2]. Клетки ГК-29 культивировали в ростовой питательной среде RPMI с содержанием 10%-ной сыворотки крови плодов коровы в CO_2 инкубаторе при 37°C . Посевная концентрация составляла $2,0 \times 10^6$ клеток в 1 мл. Для светооптического и электронно-микроскопического исследования взвесь клеток ГК-29 фиксировали в 4%-ном растворе параформальдегида, приготовленном на среде Хенкса, дофиксировали в течение 1 часа в 1%-ном растворе OsO_4 на фосфатном буфере ($\text{pH} = 7,4$), дегидратировали в этиловом спирте возрастающей концентрации и заключали в эпон (Serva, Германия). Полутонкие срезы толщиной 1 $\mu\text{м}$ получали на ультрамикротоме Leica EM UC7 (Германия/Швейцария), окрашивали толуидиновым синим и изучали под световым микроскопом «LEICA DME» (Германия). Ультратонкие срезы толщиной 70–100 нм контрастировали насыщенным водным раствором уранилацетата и цитратом свинца и изучали под электронным микроскопом JEM 1010 (Япония). Морфометрический анализ проводили с помощью

компьютерной программы Image J (Wayne Rasband, США). Определяли объемы ядер и цитоплазмы клеток Г-29, ядерно-цитоплазматические отношения. Вычисляли объемные плотности аутофагосом, аутолизосом и лизосом. Статистическую обработку полученных результатов производили с использованием пакета программ STATISTICA v. 6 (StatSoft Inc., США). Значимость различий оценивали, используя U-критерий Манна – Уитни, при уровне достоверности 95 % ($p < 0,05$).

Результаты исследования. При светооптическом исследовании клеток ГК-29 было обнаружено, что клетки различаются по своим размерам, величине ядра и содержанию цитоплазмы (рисунок 1,а). При измерении объемов клеток было выявлено, что по величине данного параметра клетки Г-29 делятся на 5 типов, достоверно отличающихся друг от друга ($p < 0,05$). Самыми многочисленными (44 %) были мелкие клетки I типа, объем которых был равен $41046,6 \pm 5182,60 \mu\text{м}^3$. Вторыми по количеству были клетки второго типа (35 %), объем которых составлял $71049,33 \pm 1435,08 \mu\text{м}^3$. Объем клеток третьего типа составил $126027,1 \pm 2638,67 \mu\text{м}^3$ и их количество равнялось 15 %. Клетки четвертого типа составляли 4 % и их объем был равен $173777,2 \pm 4997,76 \mu\text{м}^3$. Гигантские клетки пятого типа составляли 2 %, и их объем равнялся $283499,7 \pm 38274,66 \mu\text{м}^3$ (рисунок 1,б).

По величине ядерно-цитоплазматического соотношения клетки Г-29 также были разделены на пять достоверно отличающихся друг от друга типов ($p < 0,05$). Клетки первого типа с величиной ядерно-цитоплазматического соотношения $0,113 \pm 0,013$ составили 34 %. Клетки второго типа, величина ядерно-цитоплазматического соотношения которых равнялась $0,243 \pm 0,007$, составили 41 %. Клетки третьего типа составляли 15 %, и величина их ядерно-цитоплазматического соотношения

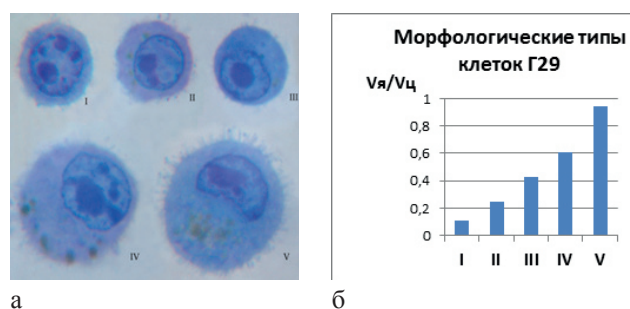


Рисунок 2 – Распределение клеток Г-29 по морфологическим типам:
а – I–V – морфологические типы клеток Г-29; б – распределение клеток Г-29 по типам;
Vя/Vц – ядерно-цитоплазматическое соотношение

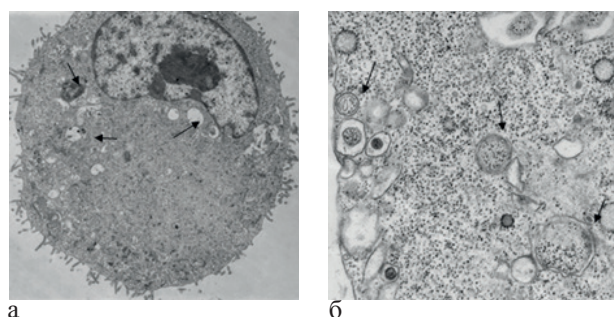


Рисунок 3 – Аутофагия в клетках Г-29:
а – клетка V стадии дифференцировки. Наличие в цитоплазме аутолизосом и лизосом (стрелки).
Увеличение $\times 6000$; б – аутофагосомы в цитоплазме клетки Г-29. Увеличение $\times 20000$

равнялась $0,43 \pm 0,01$. В клетках четвертого типа ядерно-цитоплазматическое соотношение составляло $0,609 \pm 0,122$ и их количество равнялось 6 %. Клеток пятого типа было 4 % и их ядерно-цитоплазматическое соотношение составляло $0,947 \pm 0,076$ (рисунок 2).

Согласно полученным ранее данным, распределение клеток Г-29 на 5 типов по величине ядерно-цитоплазматического соотношения соответствует 5 стадиям клеточной дифференцировки. Было показано, что преобладающим пулом клеток ГК-29 являются диплоидные пролиферирующие клетки I–III стадий, с наибольшими значениями ядерно-цитоплазматического индекса.

Клетки IV и V стадий были отнесены к дифференцированным, с ограниченной потенциальностью к делению, а клетки гигантских размеров рассматривались как многоядерные полиплоидные клетки [3, 4].

Аутофагия, представляющая собой процесс изоляции и деградации внутриклеточного материала для нужд клетки, является одним из способов выживания опухолевых клеток. В нашем исследовании наблюдали аутофагию, преимущественно,

в клетках IV и V стадий дифференцировки. Отмечали наличие в цитоплазме клеток аутофагосом, аутолизосом и лизосом (рисунок 3). Аутофагические структуры составляли в среднем не более 0,5 % от объема цитоплазмы клеток Г-29.

Выводы

Таким образом, по объему клеток и ядерно-цитоплазматическому соотношению выделено 5 типов клеток Г-29. В клетках IV и V стадий дифференцировки выявлены аутофагические структуры: аутофагосомы, аутолизосомы и лизосомы.

Литература

1. Овсянко Е.В. Ультраструктурный и стереологический анализ клеток карциносаркомы Walker 256 на разных стадиях их дифференцировки / Е.В. Овсянко, А.В. Ефремов, С.В. Мичурин и др. // Бюлл. эксперим. биол. мед. 2009. Т. 148. № 9. С. 337–342.
2. Colombo F., Baldan F., Mazzucchelli S. et al. Evidence of distinct tumour-propagating cell populations with different properties in primary human hepatocellular carcinoma. // PLoS One. 2011. Vol. 6. № 6. P. e21369.

3. *Бгатова Н.П.* Морфологические критерии стадий дифференцировки клеток экспериментальной гепатокарциномы для оценки противоопухолевых средств / Н.П. Бгатова, Л.В. Омелянчук, А.А. Пожидаева и др. // Бюл. эксперим. биол. мед. 2015. Т. 160. № 7. С. 126–132.
4. *Каледин В.И.* Гепатокарцинома-29 – метастазирующая перевиваемая опухоль мышей, вызывающая кахексию / В.И. Каледин, Н.А. Жукова, В.П. Николин и др. // Бюл. эксперим. биол. мед. 2009. Т. 148. № 12. С. 664–669.