

УДК 611.018.1:616.36-006

**УЛЬТРАСТРУКТУРНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ ПРИ ОПУХОЛЕВОМ РОСТЕ
И РАЗВИТИЕ АУТОФАГИИ В ПОЧКАХ И ПЕЧЕНИ МЫШЕЙ ЛИНИИ СВА**

*А.М. Рахметова, Н.П. Бгатова, Ш.М. Жумадина,
С.А. Бахбаева, Р.С. Досымбекова*

Одной из актуальных проблем современной биологии и медицины является злокачественное новообразование. В эксперименте на мышах линии СВА изучали структурные изменения в почках и печени при развитии прививаемой в область бедра экспериментальной гепатокарциномы-29. Показано, что к 30-м суткам развития опухоли в почках и печени развиваются структурные признаки, свидетельствующие о нарушении белок-синтетической и энергетической функций клеток. Здоровый организм обладает саморегулирующей системой гомеостаза. В последнее время структура и функция органов рассматриваются с точки зрения развития аутофагии как способа удаления нарушенных цитоплазматических структур и выживания клеток. Полученные результаты свидетельствуют о развивающейся недостаточности секреторной функции в условиях периферического опухолевого роста. У животных при опухолевом росте формируется аутофагия для поддержания внутриклеточного гомеостаза.

Ключевые слова: почки; печень; отдаленный опухолевый рост; митохондрии; лизосомы; аутофагия.

**СВА ЛИНИЯСЫНДАГЫ ЧЫЧКАНДАРДЫН БӨЙРӨКТӨРҮНДӨ
ЖАНА БООРУНДА ШИШИКТИН ӨСҮШҮНДӨ
ЖАНА АУТОФАГИЯНЫН ӨРЧҮШҮНДӨ УЛЬТРА ТҮЗҮМДҮК ӨЗГӨРҮҮЛӨР**

*А.М. Рахметова, Н.П. Бгатова, Ш.М. Жумадина,
С.А. Бахбаева, Р.С. Досымбекова*

Заманбап биологиянын жана медицинанын актуалдуу көйгөйлөрүнүн бири – бул залалдуу шишиктер. Жамбашка кыйыштырылган эксперименталдык гепатокарцинома-29дун өнүгүшүндө СВА чычкандарына жасалган экспериментте бөйрөктөрдөгү жана боордогу структуралык өзгөрүүлөрдү изилдеп чыктык. Бөйрөктө жана боордо шишиктин пайда болушунун 30-күнүндө клеткалардын протеин-синтетикалык жана энергетикалык функцияларынын бузулушун көрсөтөткөн түзүмдүк белгилер өрчүгөндүгү көрсөтүлдү. Дени сак организмде өзүн-өзү жөнгө салуучу гомеостаз системасы бар. Акыркы учурда органдардын түзүлүшү жана функциясы бузулган цитоплазмалык түзүмдөрдү жана клеткалардын тирүү калуусун жок кылуу ыкмасы катары аутофагиянын өнүгүшү көз карашынан каралууда. Алынган натыйжалар перифериялык шишиктин өсүшүнүн шартында секреция функциясынын жетишсиздигинин өрчүшүн көрсөтүп турат. Шишик өскөн жаныбарларда аутофагия клетка ичиндеги гомеостазды сактоо үчүн түзүлөт.

Түйүндүү сөздөр: бөйрөктөр; боор; алыс турган шишиктин өсүшү; митохондриялар; лизосомдор; аутофагия.

**ULTRASTRUCTURAL CHANGE IN TUMOR GROWTH AND DEVELOPMENT
OF AUTOPHAGY IN THE KIDNEYS AND LIVER OF MICE LINES CBA**

*A.M. Rakhmetova, N.P. Bgatova, Sh.M. Zhumadina,
S.A. Bakhbaeva, R.S. Dosymbekova*

One of the urgent problems of modern biology and medicine is a malignant neoplasm. In an experiment on mice's CBA, structural changes in the kidneys and liver were studied during the development of experimental hepatocarcinoma-29

inoculated in the hip area. It is shown that by the 30th day of tumor development, structural signs that indicate a violation of the protein-synthetic and energy function of cells develop in the kidneys and liver. A healthy body has a self-regulating system of homeostasis. Recently, the structure and function of organs are considered from the point of view of the development of autophagy, as a way to remove disturbed cytoplasmic structures and cell survival. The obtained results indicate a developing insufficiency of secretory function in the conditions of peripheral tumor growth, in animals with tumor growth, autophagy is formed to maintain intracellular homeostasis.

Keywords: kidney; liver; distant tumor growth; mitochondria; lysosome; autophagy.

Введение. Постоянные изменения окружающей среды требуют исследования её влияния на органы человека и животных для определения оптимального качества жизни. Так, почки являются одним из органов, участвующих в процессе адаптации организма, а печень обладает множеством функций, включая детоксикацию, продукцию различных гормонов и белков, хранение витаминов, является центральным органом химического гомеостаза, которые выполняют более 500 метаболических функций [1, 2]. Поэтому их исследование продолжает оставаться актуальным до настоящего времени [3]. Нарушение аутофагии может привести к ухудшению баланса энергии и питательных веществ, что может оказать значительное влияние на физиологию печени и гомеостаз организма в целом [4].

Цель исследования – выявить изменения ультраструктурной организации почек и печени при экспериментальном прививании гепатокарциномы-29 в мышечные ткани бедра мышей линии СВА и формирование аутофагии для поддержания внутриклеточного гомеостаза клеток органов.

Методика исследования. Экспериментальное исследование проводилось на мышцах-самцах линии СВА массой 18–20 г в возрасте 3-х месяцев. Животных содержали на стандартной диете со свободным доступом к воде и пище. Работу с животными проводили в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных». В эксперименте были сформированы 2 группы животных ($n = 20$). В 1-ю группу вошли интактные мыши; во 2-ю группу – животные с развитием опухолевого процесса. Для индукции опухолевого роста использовали клетки гепатокарциномы-29 (Г-29). Г-29 получена и верифицирована сотрудниками Института цитологии и генетики СО РАН [5]. Клетки Г-29 перевивали мышам линии СВА в брюшную полость, через 10 суток производили забор асцитической жидкости, суспендировали в физиологическом растворе и вводили по 2×10^6 клеток в 100 мкл интактным животным в мышцу правого бедра.

Забор материала для исследований проводили через 30 суток эксперимента. Животных выводили из эксперимента под эфирным наркозом методом кранио-цервикальной дислокации. Для исследования в электронном микроскопе образцы почек и печени фиксировали в 4%-м растворе параформальдегида, приготовленном на среде Хенкса, дофиксировали в 1%-м растворе OsO_4 на фосфатном буфере ($pH = 7,4$), дегидратировали в этиловом спирте возрастающей концентрации и заключали в эпон. Полутонкие срезы толщиной 1 мкм окрашивали толуидиновым синим и изучали под световым микроскопом “LEICA DME”. Ультратонкие срезы толщиной 70–100 нм контрастировали насыщенным водным раствором уранилацетата и цитратом свинца и изучали в электронном микроскопе JEM 1010. При увеличении получали электронограммы фрагментов эпителиоцитов проксимального отдела. Полученные микрофотографии морфометрировали с помощью компьютерной программы Image J. Определяли объемные плотности митохондрий, первичных и вторичных лизосом, аутофаголизосом, диаметры эпителиоцитов проксимального отдела нефрона. 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 изучении ультраструктуры почек в динамике опухолевого роста ГК-29 в мышечной ткани бедра экспериментальных животных наблюдали тенденцию снижения объемной плотности в эпителиоцитах проксимального отдела. Исследование ультраструктурной организации эпителиоцитов проксимального отдела канальцев нефронов показало, что особенностями их строения является наличие на апикальной поверхности большого количества микроворсинок. Наблюдаются митохондрии округло-овальной или вытянутой формы, располагающиеся главным образом параллельно между складками мембран, форма ядра – округлая [6] (рисунок 1, а).

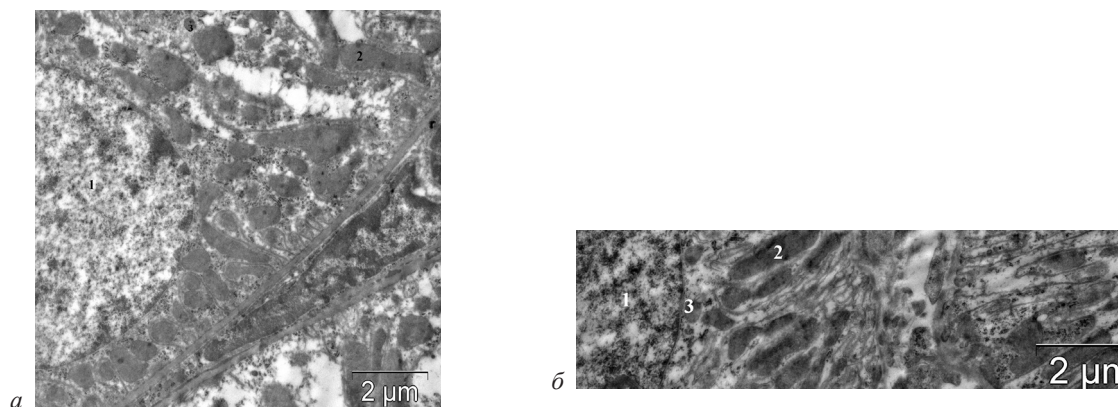


Рисунок 1 – Ультраструктурная организация эпителиоцита извитого проксимального отдела нефрона почки: *а* – интактного животного: ядро (1); митохондрии (2); лизосомы (3). Увеличение $\times 12000$; *б* – животные с опухолевым ростом без лечения: ядро (1); митохондрии (2); лизосомы (3). Увеличение $\times 12000$

К 30-м суткам эксперимента у животных с опухолевым ростом без лечения в ультраструктуре эпителиоцитов проксимального отдела почки наблюдалось уменьшение митохондрий на 2 % по сравнению с интактными животными. Возрастала объемная плотность лизосомальных структур, а именно: первичные и вторичные лизосомы были плотнее на 27 и 32 %, чем у животных контрольной группы (таблица 1).

Таблица 1 – Объемные плотности митохондрий, первичных лизосом, вторичных лизосом и аутофаголизосом в эпителиоцитах проксимального отдела почек у животных в динамике опухолевого роста экспериментальной гепатокарциномы-29 в мышечной ткани бедра. Vv – объемная плотность (%)

Параметры	30 сут, контроль	30 сут, опухоль
Митохондрии, Vv	$83,66 \pm 4,68$	$81,54 \pm 9,23$
Первичная лизосома, Vv	$5,8 \pm 2,54$	$7,39 \pm 5,4$
Вторичная лизосома, Vv	$11,73 \pm 3,41$	$15,53 \pm 8,32$
Аутофаголизосомы, Vv	-	$1,66 \pm 1,47$

Выявлено набухание эпителиоцитов проксимального отдела почки. К тому же почка требует большого кровотока относительно своего веса [7]. Эти каналы содержат большое количество митохондрий, которые обеспечивают энергию для этой реабсорбции [8]. С метаболической точки зрения, митохондрии являются основным внутриклеточным источником энергии. Ухудшающаяся митохондриальная функция в почке с дефицитом аутофагии затрагивает внутриклеточный метаболизм [9, 10]. Снижение активности митохондриальной, дыхательной цепи вследствие деполяризации почек с дефицитом аутофагии влияет на адаптацию почки [11], что является распространенным патологическим состоянием. В ультраструктурной организации эпителиоцита извитого проксимального отдела нефрона почки у животных с опухолевым ростом без лечения наблюдались средние по размеру и отдельные гипертрофированные митохондрии. Выявляются первичные и вторичные лизосомы в виде аутофагосом, утилизирующие поврежденные органеллы (рисунок 1, б).

Почечные каналы также содержат многочисленные лизосомы [12]. По литературным данным, проксимальные каналы богаты внутриклеточными органеллами, такими как митохондрии и лизосомы. Функционально аутофагия в значительной степени играет защитную роль: она защищает почку от повреждения канальцев и последующего фиброза. Таким образом, аутофагия в значительной степени подавляет воспаление путем удаления поврежденных и неправильно функционирующих митохондрий. При этом отмечали некоторые стадии внутриклеточной аутофагии (рисунок 2).

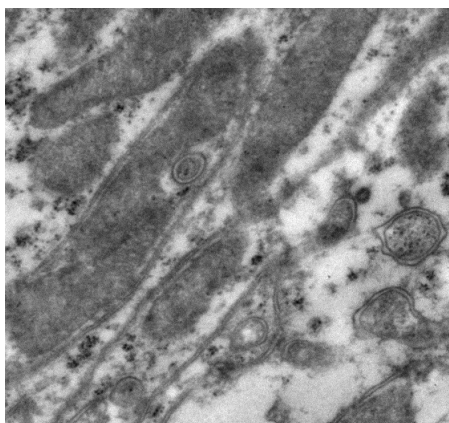


Рисунок 2 – Аутофагия в эпителиоцитах проксимального отдела почки в области бедра мышей линии СВА через 30 суток опухоли без лечения

Установлено изменение ультраструктурной организации гепатоцитов. Изменялась величина объемной плотности митохондрий. На 30-е сутки опухолевого роста она снизилась на 32 % ($p < 0,05$) от соответствующего значения в контроле (таблица 2). Митохондрии представляют собой клеточные органеллы, которые играют важную роль в биоэнергетических процессах. Их дисфункция приводит к нарушению многих внутриклеточных процессов, в том числе и к нарушению белкового синтеза, так как этот процесс является энергозависимым.

Возрастала объемная плотность лизосомальных структур в клетках, в частности аутофаголизосом (рисунок 3, а). Величина данного показателя к 30-м суткам эксперимента увеличилась в 2,5 раза (см. таблицу 2).

Таблица 2 – Результаты морфометрического анализа ультраструктурной организации печени в условиях отдаленного опухолевого роста на 30-е сутки эксперимента ($M \pm SD$)

Параметры	Контроль	30-е сутки ОП
Митохондрии, Vv	$37,52 \pm 1,17$	$25,17 \pm 0,87^*$
Аутофагосомы, Vv	$0,02 \pm 0,01$	$2,68 \pm 0,15^*$
Первичные лизосомы, Vv	$2,00 \pm 0,11$	$2,73 \pm 0,15^*$
Вторичные лизосомы, Vv	$1,06 \pm 0,11$	$2,37 \pm 0,14^*$
Липидные включения, Vv	$8,00 \pm 0,71$	$2,37 \pm 0,40^*$

Примечание. * – величины, достоверно отличающиеся от соответствующих показателей у интактных животных контрольной группы.

При этом выявлены все стадии внутриклеточной аутофагической деградации: наличие в цитоплазме гепатоцитов аутофагосом с органеллами аутофаголизосом и вторичных лизосом, в аутофагосомах наблюдали фрагменты цитоплазмы, розетки гликогена, митохондрии, фрагменты эндоплазматической сети с рибосомами. Увеличилось количество первичных (на 36,5 %) и вторичных (в 2,24 раза) лизосом (рисунок 3, б).

Структурные изменения в печени определялись развитием опухолевого процесса. К 30-м суткам эксперимента в мышечной ткани бедра образовывался опухолевый узел [1]. При этом в динамике опухолевого роста наблюдались существенные изменения свободно-радикального окисления липидов. Установлено повышение уровня вторичных продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ), что было связано с инвазией опухолевых клеток и повреждением мембранных структур [4, 6] которые оказывают токсическое влияние на печень.

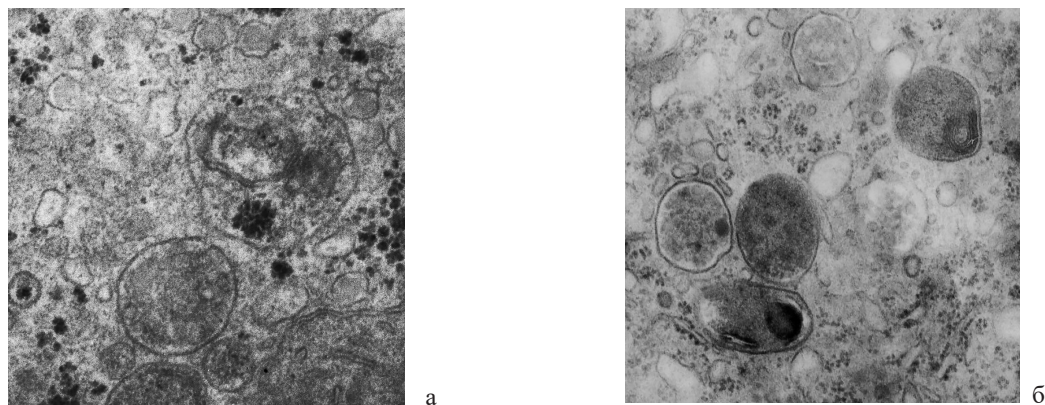


Рисунок 3 – Структурная организация печени в условиях отдаленного опухолевого роста:
Vv – объемная плотность (%), 30-е сутки – время развития гепатокарциномы-29 в области бедра экспериментальных животных: а – объемная плотность аутофаголизосом в цитоплазме гепатоцитов (Vv), 30-е сутки – время развития гепатокарциномы-29 в области бедра экспериментальных животных; б – объемные плотности вторичных лизосом в цитоплазме гепатоцитов животных в динамике опухолевого роста экспериментальной гепатокарциномы-29 в мышечной ткани бедра

Таким образом, полученные нами данные свидетельствуют, что в условиях моделирования периферического опухолевого роста в мышечной ткани бедра экспериментальных животных, в цитоплазме гепатоцитов к 30-м суткам отмечаются ультраструктурные признаки развития недостаточности функции клеток – снижаются объемные плотности митохондрий и лизосомальных структур.

Выводы

Методами световой и электронной микроскопии в экспериментах на мышцах линии СВА выявлено, что к 30-м суткам развития опухоли в почках и печени развиваются структурные признаки, свидетельствующие о нарушении белок-синтетической и энергетической функции клеток. Полученные результаты свидетельствуют о развивающейся недостаточности секреторной функции в условиях периферического опухолевого роста. У животных при опухолевом росте установлены стадии внутриклеточной аутофагии для поддержания внутриклеточного гомеостаза.

Литература

1. Flores-Toro J.A. Autophagy in the liver: Cell'scannibalism and beyond / A. Flores-Toro J., L. Go K., C. Leeuwenburgh, J.-S. Kim // ArchPharmRes. 2016. Vol. 39. № 8. P. 1050–1061.
2. Usha B.V. Biohimicheskie pokazateli krovi sobak pri gastrite [Biochemical parameters of the blood of dogs with gastritis] / B.V Usha, G.M. Krjukovskaja, T.B. Gorovaja, Je. Zhavnis // Veterinarija. 2006. № 12. S. 54–56. [In Russian].
3. Centyurova L.G. Morfometricheskaya kharakteristika epiteleotsitov nefronov krysa v postnatalnom ontogeneze [Morphometric characteristics of rat nephron epithelial cells in postnatal ontogenesis] / L.G. Centyurova, O.G. Ganina // Estestvennyye nauki. FGBOUVPO «Astrakhanskiy gosudarstvennyy universitet». № 1 (38). 2012. S. 203–206. [in Russian].
4. Five Parhit'ko A.A. Autofagija: mehanizmy, reguljacija i rol' v razvitii opuholej obzor. [Autophagy: mechanisms, regulation, and role in tumor development review] / A.A. Five Parhit'ko, O.O. Favorova, Je. P. Henske // Biohimija / Rossijskaja akademija nauk. M., 2013. T. 78. № 4. S. 466–480. [In Russian].
5. Kaledin V.I. Gepatokartsinoma-29 – metastaziruyushchaya perevivayemaya opukhol myshey vyzyvayushchaya kakheksiyu [Hepatocarcinoma-29-metastasizing transferable tumor in mice that causes cachexia] / V.I. Kaledin, N.A. Zhukova, V.P. Nikolin i dr. // Byul. eksper. biol. 2009. T. 148. № 12. S. 664–669. [In Russian].
6. Romashkina E.A. Submikroskopicheskaya organizatsiya kanal'tsev nefrona pochek krysa pri eksperimentalnom ateroskleroze i v usloviyakh ego gennoy korrektsii. [Submicroscopic organization of rat kidney nephron

- tubules in experimental atherosclerosis and in conditions of its gene correction]. *Mezhdunarodnyye obzory: Klinicheskaya praktika i zdorovye*. YupokomInfoMed (Minsk). 2015. № 4 (16). S. 126–131 [In Russian].
7. *Torelli G.* Energy requirement for sodium reabsorption in the in vivo rabbit kidney / G. Torelli, E. Milla, A. Faelli et al. // *Am J Physiol*, 1966. Vol. 211 (pg. 576–580).
 8. *Mackensen-Haen S.* Correlations between renal cortical interstitial fibrosis, atrophy of the proximal tubules and impairment of the glomerular filtration rate / S. Mackensen-Haen, R. Bader, K.E. Grund, A. Bohle // *Clin Nephrol*. 1981; 15: 167–71; PMID: 7237863.
 9. *Rabinowitz J.D.* Autophagy and metabolism / J.D. Rabinowitz, E. White // *Science*. 2010; 330:1344–8; PMID: 21127245; <https://DOI.org/330/6009/1344>.
 10. *Kimura T.* Autophagy protects kidney proximal tubule epithelial cells from mitochondrial metabolic stress / T. Kimura, A. Takahashi, Y. Takabatake, T. Namba, T. Yamamoto, J.Y. Kaimori, I. Matsui, H. Kitamura, F. Niimura, T. Matsusaka et al. // *Autophagy*. 2013; 9:1876–86; PMID: 24128672; <https://DOI.org/10.4161/auto.25418>.
 11. *Namba T.* Autophagic clearance of Mitochondria in the kidney copes with Metabolic acidosis / T. Namba, Y. Takabatake, T. Kimura, A. Takahashi, T. Yamamoto, J. Matsuda, H. Kitamura, F. Niimura, T. Matsusaka, H. Iwatani et al. // *J Am Soc Nephrol*. 2014; 25:2254; PMID: 24700866; [https:// DOI. Org/10.1681/ASN.2013090986](https://DOI.Org/10.1681/ASN.2013090986)
 12. *Bomse M.* Endocytosis in filter-grown Madin-Darby canine kidney cells / M. Bomse, K. Prydz, R.G. Parton, J. Gruenberg, K. Simons // *J Cell Biol*. 1989; 109:3243–58; PMID: 2689455.