

Н.П. БГАТОВА<sup>1</sup>, Ю.С. ГАВРИЛОВА<sup>1</sup>, Р.И. ЮЙ<sup>2</sup>, М.Ж. ЕРГАЗИНА<sup>2</sup><sup>1</sup>ФГБНУ «НИИ клинической и экспериментальной лимфологии», г. Новосибирск, Россия,<sup>2</sup>кафедра гистологии Казахского Национального медицинского университета им. С.Д. Асфендиярова, Алматы, Казахстан**СРАВНИТЕЛЬНЫЙ УЛЬТРАСТРУКТУРНЫЙ АНАЛИЗ ГЕПАТОЦИТОВ И КЛЕТОК ГЕПАТОКАРЦИНОМЫ**

Выявлена гетерогенность опухолевых клеток из асцитической жидкости по величинам ядерно-цитоплазматического соотношения и концентрации цитоплазматических органелл, что позволило выделить 5 стадий их дифференцировки. Показано, что при трансплантации клеток ГК-29 в область бедра мышей линии СВА происходит развитие опухолевой ткани, преимущественно состоящей из более дифференцированных клеток, формирующих подобие печеночных балок, окруженных «синусоидами». Отмечено, что цитоплазма имплантированных опухолевых клеток отличается от цитоплазмы гепатоцитов меньшим содержанием митохондрий, мембран гранулярной эндоплазматической сети, рибосом, отсутствием накоплений гликогена, что, по-видимому, является отражением их существования за счет микроокружения.

**Ключевые слова:** гепатоциты мышей линии СВА, клетки гегепатокарциномы-29, ультраструктура.

Гепатокарцинома является одной из наиболее агрессивных опухолей человека и, несмотря на достигнутые успехи в диагностике и лечении, остается пятой по распространенности и третьей по уровню смертности патологией в мире, обусловленной наличием резистентности к проводимой полихимиотерапии [5]. Подобно другим солидным опухолям гепатокарцинома характеризуется высокой степенью гетерогенности популяции опухолевых клеток [4]. Актуальным является поиск конкретных морфологических признаков опухоли, использование которых стало бы рутинным методом для оценки прогноза и эффективности лечения [1]. Для выбора тактики воздействия на опухолевый рост, в том числе таргетной терапии, понимания вклада отдельных клеток в процессы метастазирования, необходимы морфологические критерии, характеризующие состав опухоли и дифференцировку опухолевых клеток. Кроме сказанного, актуальной является проблема ранней диагностики злокачественной трансформации клеток.

Поэтому **целью** данной работы было сравнительное исследование ультраструктурной организации гепатоцитов и клеток экспериментальной гепатокарциномы.

**Материал и методы исследования.**

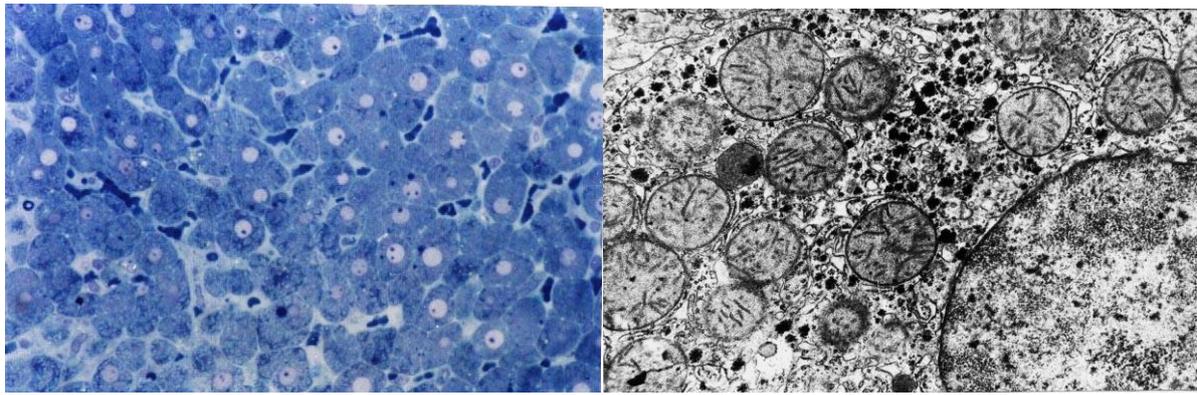
В эксперименте использовали мышей-самцов (n=10) линии СВА массой 18-20 г в возрасте 3-х месяцев. Животных содержали на стандартной диете со свободным доступом к воде и пище. Работу с животными проводили в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных». Для исследования в электронном микроскопе образцы печени фиксировали в 1% растворе OsO<sub>4</sub> на фосфатном буфере (pH=7,4), дегидратировали в этиловом спирте возрастающей концентрации и заключали в эпон. Полутонкие срезы толщиной 1 мкм окрашивали толудиновым синим и изучали под световым микроскопом "LEICA DME". Ультратонкие срезы толщиной 35-45 нм контрастировали насыщенным водным раствором уранилацетата и цитратом свинца и изучали в электронном микроскопе JEM 1010. Полученные микрофотографии морфометрировали с помощью компьютерной программы Image J. При использовании закрытой тестовой системы из 154 точек и шагом 100 нм при увеличении 30000 определяли объемные плотности органелл и включений.

Экспериментальная опухоль гепатокарцинома-29 (ГК-29), перевиваемый штамм которой поддерживается в асцитной форме на мышах линии СВА/LacY1cgn, является удобной моделью исследования злокачественного роста [2]. ГК-29 была получена и верифицирована сотрудниками Института цитологии и генетики СО РАН [2]. Для ультраструктурного анализа клеток ГК-29 из асцитической жидкости, взвесь клеток фиксировали в 1% растворе OsO<sub>4</sub> и подвергали обработке для получения ультратонких срезов по описанной выше методике. Ультратонкие срезы толщиной 35-45 нм контрастировали насыщенным водным раствором уранилацетата и цитратом свинца и изучали в электронном микроскопе JEM 1010. Полученные микрофотографии морфометрировали с помощью компьютерной программы Image J. Определяли объемные плотности ядер и цитоплазмы опухолевых клеток при использовании открытой тестовой системы с шагом 0,7 мкм при увеличении электронограмм 12000 и вычисляли величину ядерно-цитоплазматического соотношения. При использовании закрытой тестовой системы из 154 точек и шагом 100 нм при увеличении 30000 определяли объемные плотности органелл и включений.

Кроме сказанного проводили ультраструктурный анализ клеток ГК-29 из опухолевой ткани, развивающейся в организме экспериментального животного. Для этого клетки ГК-29 из асцитической жидкости, суспендированной в 10-кратном объеме физиологического раствора вводили в мышцу правого бедра по 0,1 мл мышам самцам линии СВА (n=10). Работу с животными проводили в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных». Образцы опухолевой ткани фиксировали в 1% растворе OsO<sub>4</sub> и обрабатывали по описанной выше методике получения срезов для электронной микроскопии. Ультратонкие срезы толщиной 35-45 нм контрастировали насыщенным водным раствором уранилацетата и цитратом свинца и изучали в электронном микроскопе JEM 1010. Полученные микрофотографии морфометрировали с помощью компьютерной программы Image J. Определяли объемные плотности ядер и цитоплазмы опухолевых клеток при использовании открытой тестовой системы с шагом 0,7 мкм при увеличении электронограмм 12000 и вычисляли величину ядерно-цитоплазматического соотношения. При использовании закрытой тестовой системы из 154 точек и шагом 100 нм при увеличении 30000 определяли объемные плотности органелл и включений. Цифровые данные обрабатывали с использованием общепринятых методов статистики, вычисляя среднюю арифметическую величину (M), ошибку репрезентативности средней величины (m) и уровень значимости различий средних величин (p) на основании t-критерия Стьюдента для уровня достоверности 95% (p < 0,05).

**Результаты исследований и обсуждение.**

При изучении структуры печени интактных мышей линии СВА наблюдали балочное расположение гепатоцитов (Рисунок 1А). В цитоплазме гепатоцитов были хорошо представлены все цитоплазматические органеллы и включения гликогена (Рисунок 1Б).



А  
Б  
Рисунок 1 - Структура печени intactной мыши линии СВА

А - Балочное расположение гепатоцитов. Окраска толуидиновым синим. Увеличение 10x40.

Б - Фрагмент цитоплазмы гепатоцита intactной мыши линии СВА. Увеличение x8000.

При светооптическом исследовании клеток ГК-29 из асцитической жидкости было обнаружено, что клетки различаются по своим размерам, величине ядра и содержанию цитоплазмы (Рисунок 2). Анализ ядерно-цитоплазматического соотношения и ультраструктурной организации опухолевых клеток выявил гетерогенность популяции ГК-29 по данным параметрам. По величине ядерно-цитоплазматического соотношения и по содержанию внутриклеточных органелл опухолевые клетки были разделены на 5 типов (рис 2,3). Изменение ультраструктурной организации опухолевых клеток с возрастанием объемной доли цитоплазмы позволяет характеризовать данные клетки, как имеющие разные стадии дифференцировки и одним из критериев стадии клеточной дифференцировки может быть содержание внутриклеточных органелл [4].

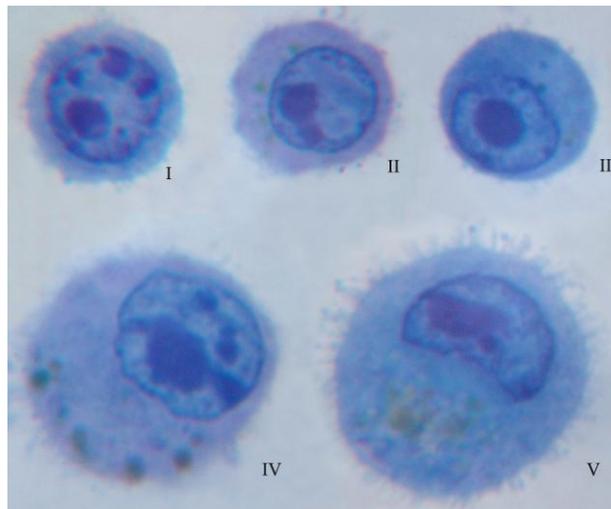


Рисунок 2 - Морфологические типы клеток гепатокарциномы-29 в зависимости от стадии дифференцировки. I,II,III,IV,V – стадии дифференцировки. Окраска толуидиновым синим. Увеличение 10x90

В цитоплазме клеток, выделенной нами первой стадии дифференцировки, у которых ядерно-цитоплазматическое соотношение составляло  $0,797 \pm 0,008$ , отмечали одиночные митохондрии, слабо выраженными были мембраны гранулярного эндоплазматического ретикулума, преобладали свободные полисомальные рибосомы (Рисунок 3-I). В цитоплазме клеток второй стадии дифференцировки (ядерно-цитоплазматическое соотношение составляло  $0,681 \pm 0,005$ ), наряду с описанными выше органеллами, выявляли отдельные липидные включения, а значение объемной плотности цистерн гранулярной эндоплазматической сети было увеличено в 2,5 раза (Рисунок 3-II). В выделенных нами клетках 3-й и 4-ой стадии дифференцировки (ядерно-цитоплазматическое соотношение составляло, соответственно  $0,596 \pm 0,005$  и  $0,492 \pm 0,004$ ), отмечали возрастание доли цитоплазмы, накопление митохондрий, мембран гранулярной эндоплазматической сети, прикрепленных и свободных полисомальных комплексов, лизосом и липидных включений (Рисунок 3-III,IV). Величина объемной плотности цистерн гранулярной эндоплазматической сети в клетках 3-й и 4-ой стадии дифференцировки была больше, чем в клетках первой стадии в 3 и 4 раза, соответственно. Клетки, отнесенные к 5-й стадии дифференцировки, у которых ядерно-цитоплазматическое соотношение имело значение  $0,384 \pm 0,006$ , отличались значительным объемом цитоплазмы, с небольшим содержанием мембран гранулярного эндоплазматического ретикулума и митохондрий, наличием липидных включений и повышенным количеством свободных полисомальных комплексов (Рисунок 3-V).

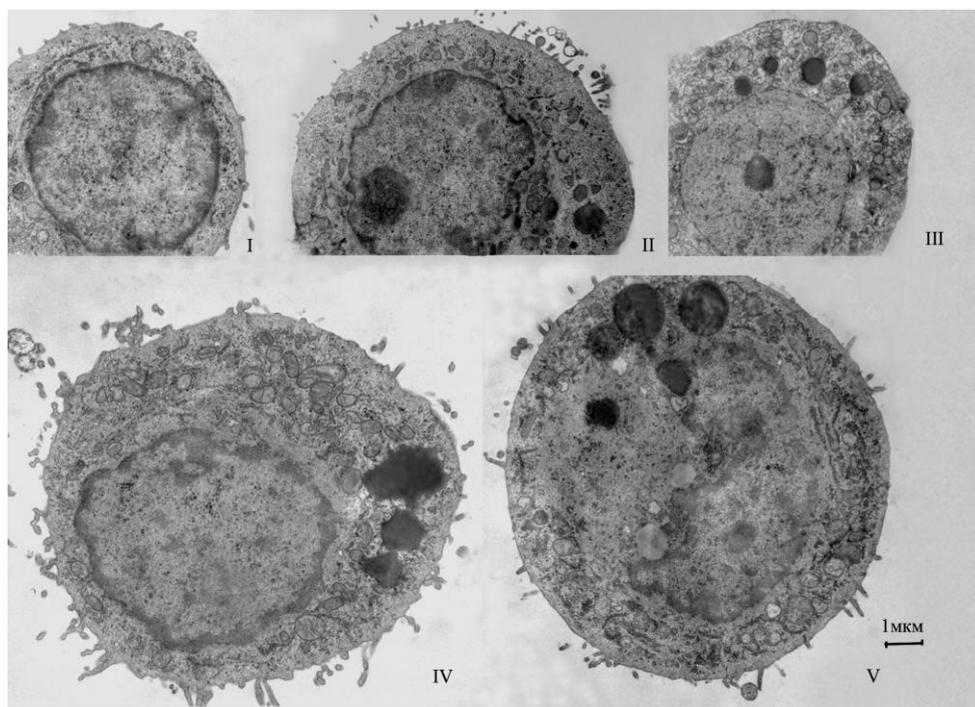


Рисунок 3 - Ультраструктурная организация клеток ГК-29 в зависимости от стадии дифференцировки. I,II,III,IV,V – стадии дифференцировки. Увеличение x4000.

Нами была исследована структура опухолевой ткани через 20 суток после инокуляции клеток ГК-29 в мышечную ткань бедра экспериментальным животным. Было отмечено, что опухоль состоит из крупных клеток, образующих подобие печеночных «балок», которые окружены сосудами, сходными с синусоидами печени (Рисунок 4А). Клетки в пределах «балок» располагались плотно и образовывали в зонах контакта многочисленные микроворсинки (Рисунок 4Б). По-видимому, дифференцировка популяции клеток ГК-29, так же, как и гепатоцитов в печени, идет по пути возрастания плоидности и снижения способности к пролиферации. В результате в перевиваемой в область бедра опухоли накапливаются крупные клетки 4 и 5-й стадии дифференцировки. Причем клетки 5-й стадии дифференцировки можно рассматривать, как высокоспециализированные с ограниченной потенцией к пролиферации. В их цитоплазме в большом количестве присутствуют свободные полисомальные комплексы и липидные включения, обеспечивающие структурно-функциональное постоянство опухолевых клеток. Следовательно, экспериментальная гепатокарцинома-29 является гетерогенной по клеточному составу по опухоли. Гетерогенность ее клеток определяется размерами, объемной долей цитоплазмы и насыщенностью органеллами.

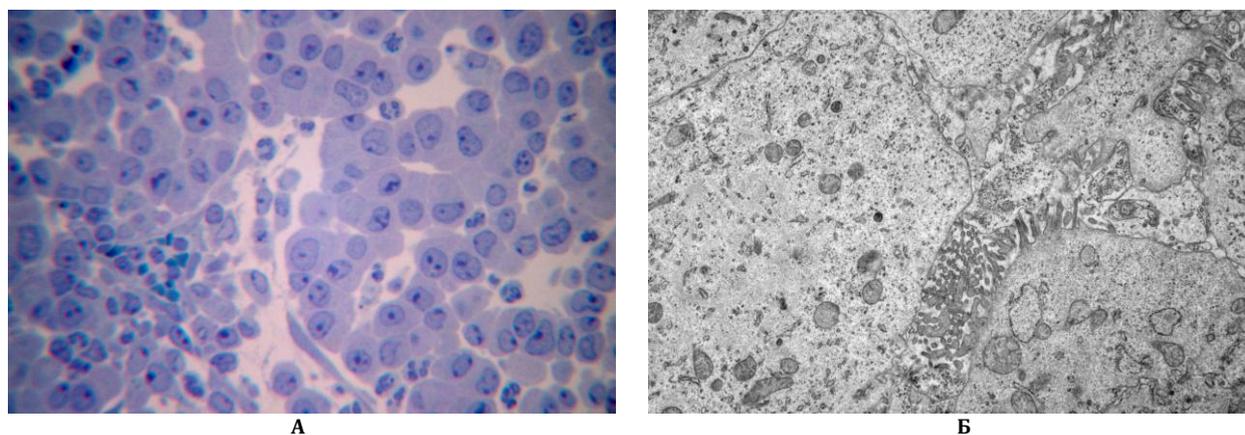


Рисунок 4 - Структура ГК-29 через 20 суток после инокуляции опухолевых клеток в мышечную ткань бедра экспериментальным животным

А - образование опухолевыми клетками «печеночных балок» и «синусоидов». Окраска толуидиновым синим. Увеличение 10x40;  
 Б - Плотное расположение опухолевых клеток и образование микроворсинок в зонах контакта. Увеличение x4000.

Трансплантация клеток ГК-20 экспериментальному животному со временем приводит к развитию опухолевой ткани из более дифференцированных клеток, которые формируют подобие печеночных балок, окруженных «синусоидами». Сравнительный ультраструктурный анализ гепатоцитов печени интактных мышей линии СВА и дифференцированных клеток ГК-29 из опухолевой ткани, развивающейся в мышечной ткани бедра экспериментальных животных, показал, что клетки различаются по насыщенности цитоплазмы органеллами (Таблица 1). Отмеченное достоверно меньшее содержание митохондрий, мембран гранулярной эндоплазматической сети, рибосом, отсутствие накоплений гликогена, по-видимому, является отражением паразитического существования опухолевых клеток, за счет разрушенных тканей в области их имплантации.

Таблица 1 - Результаты морфометрического исследования структуры гепатоцитов интактных мышей линии СВА и клеток гепатокарциномы из опухолевой ткани, после их имплантации в мышечную ткань бедра мышей линии СВА

<i>Исследованные параметры</i>	<i>Гепатоциты</i>	<i>Опухолевые клетки in vivo</i>
<i>Митохондрии (Vv)</i>	29,2±0,16	9,27±3,23*
<i>ГЭР (Vv)</i>	9,5±0,24	5,9±1,27*
<i>Рибосомы свободные полисомальные (NA)</i>	93,0±8,26	15,36±5,12*
<i>Липиды (Vv)</i>	0,03±0,01	2,63±6,04*
<i>Лизосомы (Vv)</i>	1,2±0,32	0,45±0,82+
<i>Гликоген (Vv)</i>	12,5±2,48	-

**Примечание:** Vv – объемная плотность структур (% от объема цитоплазмы); \* - отмечены отличия, достоверные относительно соответствующих величин в цитоплазме гепатоцитов ( $p \leq 0,05$ ); ГЭР – гранулярный эндоплазматический ретикулум.

**Заключение.** Таким образом, по величинам ядерно-цитоплазматического соотношения и концентрации цитоплазматических органелл клетки ГК-29 из асцитической были разделены на 5 типов, соответствующих различным стадиям дифференцировки. Через 20 суток после трансплантации клеток ГК-20 экспериментально животному происходит развитие опухолевой ткани, преимущественно состоящей из более дифференцированных клеток, формирующих подобие печеночных балок, окруженных «синусоидами». В то же время цитоплазма этих клеток отличается от гепатоцитов меньшим содержанием митохондрий, мембран гранулярной эндоплазматической сети, рибосом, отсутствием накоплений гликогена, что, по-видимому, является отражением существования опухолевых клеток, за счет разрушенных тканей в области их имплантации.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1 Герашенко Т.С., Денисов Е.В., Литвяков Н.В., Завьялова М.В., Вторушин С.В., Цыганов М.М., Перельмутер В.М., Чердынцева Н.В. Внутриопухолевая гетерогенность : природа и биологическое значение. Биохимия. - 2013. - Т. 78, № 11. - С. 1531 – 1549.
- 2 Каледин В.И., Жукова Н.А., Николин В.П., Попова Н.А., Беляев М.Д., Багинская Н.В., Литвинова Е.А., Толстикова Т.Г., Лушникова Е.Л., Семенов Д.Е. Гепатокарцинома-29 – метастазирующая перевиваемая опухоль мышей, вызывающая кахексию. Бюл. экспер биол. - 2009. - Т. 148, № 12. - С. 664-669.
- 3 Овсянко Е.В., Ефремов А.В., Мичурина С.В., Бгатова Н.П., Лушникова Е.Л., Овсянко Е.У., Вакулин Г.М. Ультраструктурный и стереологический анализ клеток карциносаркомы Walker 256 на разных стадиях их дифференцировки // Бюлл. эксперим. биол. мед. – 2009. - Т. 148, № 9. – С. 337-342.
- 4 Colombo F., Baldan F., Mazzucchelli S., Martin-Padura I., Marighetti P., Cattaneo A., Foglieni B., Spreafico M., Gueneri S, Baccarin M., Bertolini F., Rossi G., Mazzaferro V., Cadamuro M., Maggioni M., Agnelli L., Rebulla P., Prati D., Porretti L. Evidence of distinct tumour-propagating cell populations with different properties in primary human hepatocellular carcinoma. PLoS One. - 2011. - V. 6, № 67 - P. 213-269.
- 5 Shen Y., Cao D. Hepatocellular carcinoma stem cells: origins and roles in hepatocarcinogenesis and disease progression. Front Biosci (Elite Ed). - 2012. - v. 1, № 4. - P. 1157-1169.

#### Н.П. БГАТОВА, Ю.С. ГАВРИЛОВА, Р.И. ЮЙ, М.Ж. ЕРГАЗИНА

#### ГЕПАТОЦИТТЕР МЕН ГЕПАТОКАРЦИНОМА ЖАСУШАЛАРЫН САЛЫСТЫРМАЛЫ УЛЬТРАҚҰРЫЛЫМДЫҚ ТАЛДАУ

**Түйін:** Асцит сұйықтығының құрамындағы ісік жасушаларының ядро-цитоплазмалық қатынасының және цитоплазмалық органеллаларының концентрациясының әр түрлілігімен сипатталатын гетерогендігі анықталды. Сол себепті жасушалардың дифференциалануының 5 түрлі сатысын анықтау мүмкін болды. ГК-29 жасушаларын СВА тышқандарының сан аймағына енгізгенде ісік тіндері дамып, оның құрамында «синусоидтармен» қоршалған бауыр бауларына ұқсас құрылымдарды қалыптастыратын дифференцияланған жасушалар анықталды. Сондай-ақ енгізілген ісік жасушаларының цитоплазмасының гепатоциттер цитоплазмасынан митохондрияларының, түйіршікті эндоплазмалық торлардың мембраналары мен рибосомаларының аз болуымен, гликогеннің жинақталмауымен ерекшеленетіні байқалды. Мұндай өзгерістер микроқоршауының әсерінен болатыны анықталды.

**Түйінді сөздер:** СВА тышқандарының гепатоциттері, гепатокарцинома–29 жасушалары, ультрақұрылым.

#### N.P. BGATOVA, Y.S. GAVRILOVA, R.I. YUY, M.Zh. ERGAZINA

#### COMPARATIVE ULTRASTRUCTURAL ANALYSIS OF HEPATOCYTES AND HEPATOCELLULAR CARCINOMA

**Resume:** Heterogeneity of tumor cell from ascetic liquid is revealed by values of nuclear-cytoplasmic correlation and cytoplasmic organelles concentration which allowed to emphasize 5 stages of their differentiation. It was shown that when transplanting GK-29 cells in the hip of the line CVA mice, the tumor tissue develops and mainly consists of more differentiated cells, that form similarity of hepatic tubules surrounded by “sinusoids.” It is noted that cytoplasm of implanted tumor cells differs from hepatocytes cytoplasm by fewer content of mitochondria, membranes of granular endoplasmic reticulum net, ribosomes, absence of glycogen accumulation, that is, probably, connected with their microenvironment.

**Keywords:** hepatocytes of the line CVA mice, hepatocarcinoma -29 cells, ultrastructure.