

МРНТИ 34.19.27.

С.А. Бахбаева¹, Н.П. Бгатова², Ш.М.Жумадина³

¹ Павлодарский государственный университет им. С.Торайгырова, Павлодар, Казахстан

² Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной лимфологии – филиал Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», Новосибирск, Россия

³ АО Казахский агротехнический университет им. С. Сейфулина, Нур-Султан, Казахстан
(E-mail: ¹ saule0577@mail.ru, ² n_bgatova@ngs.ru, ³ ms.zhumadina@mail.ru)

Ультроструктурные особенности белок-синтетического и энергетического компарментов гепатоцитов в динамике отдаленного опухолевого роста

Аннотация: В статье приведены результаты ультроструктурной организации гепатоцитов животных в условиях моделирования периферического опухолевого роста. В качестве модели опухолевого роста была взята гепатокарцинома-29, клетки которой прививали в мышечную ткань бедра мышам линии СВА. Методами световой и электронной микроскопии оценивали ультроструктуру гепатоцитов в условиях нормы и отдаленного опухолевого роста через 3, 7, 13 и 30 суток эксперимента. Показано, что к 30-м суткам развития опухоли в гепатоцитах развиваются структурные признаки, свидетельствующие о нарушении белок-синтетической и энергетической функции клеток. Происходит снижение объемной плотности цистерн гранулярной эндоплазматической сети, митохондрий и численной плотности прикрепленных и свободных полисомальных рибосом. Полученные результаты косвенно свидетельствуют о развивающейся недостаточности функции печени в условиях периферического опухолевого роста.

Ключевые слова: гепатоциты, ультроструктура, эндоплазматический ретикулум, рибосомы, митохондрии, белок-синтетическая функция, опухолевый рост

DOI: <https://doi.org/10.32523/2616-7034-2019-129-4-15-21>

Работа выполнена при поддержке гранта АО "Центр международных программ" (договор от № 4141 от 26 декабря 2016 года) и бюджетного финансирования НИИКЭЛ-филиал ИЦиГ СО РАН № 0324-2019-045-С-02.

Актуальность. Печень обладает множеством функций, включая детоксикацию, продукцию различных гормонов и белков, хранение витаминов. Она играет ключевую роль в регулировании сахара в крови, продукции и секреции желчи, кетоновых тел, регуляции липидного обмена [1]. Она является центральным органом химического гомеостаза, выполняет более 500 метаболических функций. Установлена и доказана ключевая роль печени в реакциях обмена углеводов, липидов, белков, макро- и микроэлементов, витаминов, поддержании иммунного баланса в организме. Нарушение ее функций влечет за собой каскад патологических изменений в организме, которые ухудшают качество жизни [2]. Известно, что наибольшее количество белка синтезируется в мышечной ткани, однако в пересчете на 1 г массы, в печени их производится больше. В печени образуются не только собственные белки гепатоцитов, но и большое количество секретируемых белков, необходимых для нужд организма в целом. К наиболее важным из них относится альбумин, синтез которого составляет 25% от общего образования белков в печени и 50% - от количества секретируемых белков.

Печень, как центральный орган детоксикации и метаболизма, в наибольшей степени подвержена токсическому воздействию продуктов злокачественного роста. В связи с неуклонным ростом онкологической заболеваемости, актуальным является изучение возможных изменений ультроструктуры гепатоцитов, влекущих нарушение функции печени в условиях опухолевого роста в отдаленных органах, с целью коррекции ее состояния для поддержания гомеостаза организма.

Цель исследования. Оценить ультроструктурную организацию белок-синтетического и энергетического компарментов гепатоцитов в динамике отдаленного опухолевого роста

Методика исследования. Экспериментальное исследование проведено на мышах-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 использовано 2 группы животных. В 1 группу вошли интактные мыши ($n=5$); во 2 группу – животные с развитием опухолевого процесса ($n=20$). Для индукции опухолевого роста использовали клетки гепатокарцинома-29. Гепатокарцинома-29 получена и верифицирована сотрудниками Института цитологии и генетики СО РАН [3] и любезно предоставлена для нашего исследования. Модель опухолевого роста гепатокарцинома-29 является хорошо апробированной на мышах линии СВА и надежной моделью для изучения опухолевой прогрессии и метастазирования [3].

Клетки ГК-29 перевивали мышам линии СВА в брюшную полость, через 10 суток производили забор асцитической жидкости, суспендировали в 10-кратном объеме физиологического раствора и вводили по 0,1 мл интактным животным в мышцу правого бедра. Забор материала для исследований проводили через 3, 7, 13 и 30 суток эксперимента. Животных выводили из эксперимента под эфирным наркозом методом кранио-цервикальной дислокации.

Для электронно-микроскопического исследования образцы печени фиксировали в 4 % растворе параформальдегида, приготовленном на среде Хенкса, дофиксировали в течение 1 часа в 1 % растворе OsO_4 (осмий тетроксид) (Sigma, США) на фосфатном буфере ($pH=7,4$), дегидратировали в этиловом спирте возрастающей концентрации и заключали в эпон (Serva, Германия). Полутонкие срезы толщиной 1 мкм получали на ультрамикротоме Leica EM UC7 (Германия/Швейцария), окрашивали толуидиновым синим, изучали под световым микроскопом «LEICA DME» (Германия), фотографировали с помощью компьютерной программы «Avision».

Ультратонкие срезы толщиной 70-100 нм контрастировали насыщенным водным раствором уранилацетата и цитратом свинца и изучали в электронном микроскопе JEM 1010 (Япон). Гепатоциты морфометрировали с помощью компьютерной программы ImageJ. Оценивали объемную плотность митохондрий, цистерн гранулярной эндоплазматической сети, липидных включений, гликогена, первичных, вторичных лизосом и численные плотности прикрепленных и свободных полисомальных рибосом. Статистическую обработку данных проводили с использованием программы Statistica 6.0. Вычисляли средние значения и стандартное отклонение, достоверность различий рассчитывали по U-критерию Манна-Уитни и принимали при значениях $p < 0,05$.

Результаты и обсуждения. В условиях отдаленного опухолевого роста наблюдали изменение ультраструктурной организации гепатоцитов. Было отмечено возрастание объемной плотности лизосом на фоне общей тенденции к снижению содержания остальных органелл клетки (таблица 1, рисунок 1). Изменялась величина объемной плотности митохондрий. На 3-и сутки эксперимента величина данного показателя снизилась на 22% ($p < 0,05$), а на 30-е сутки опухолевого роста она составила 68% ($p < 0,05$) от соответствующего значения в контроле (рисунок 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 этот процесс является энергозависимым.

Источником энергии в гепатоцитах может быть гликоген. Объемная плотность гликогена уменьшалась на 67% ($p < 0,05$) на 3-и сутки развития опухоли, в последующем величина данного показателя достоверно возрастала на 30-е сутки эксперимента (рисунок 3). На 30-е сутки эксперимента отмечали достоверное снижение объемной плотности цистерн эндоплазматического ретикулума (рисунок 4). Эндоплазматический ретикулум представляет собой динамическую мембранно-связанную органеллу, которая примыкает к ядерной оболочке и распространяется по всей цитоплазме в виде сетчатого массива из соединенных мешочков и ветвящихся канальцев. Эндоплазматический ретикулум участвует в метаболических путях

синтеза белков и различных липидов, включая холестерин, фосфолипиды и нейтральные липиды [4].

Таблица 1 - Результаты морфометрического исследования печени в условиях отдаленного опухолевого роста ($M \pm m$)

Исследованные Параметры	Контроль	3 сут	7 сут	13 сут	30 сут
Митохондрии (Vv)	37,52±1,17	29,22±1,01*	34,22±1,24	34,78±0,58	25,17±0,87*
Гранулярная ЭПС (Vv)	33,63±2,45	38,74±1,30	31,2±1,32	30,15±1,80	20,18±0,77*
Рибосомы прикрепленные (NA)	85,75±3,63	73,23±2,46	78,16±3,56	77,40±3,62	29,36±1,34*
Рибосомы свободные полисомальные (NA)	40,12±0,99	22,24±0,64*	13,22±1,51*	10,46±0,83*	11,54±0,36*
Лизосомы первичные (Vv)	2,00±0,11	2,67±0,47	1,72±0,05*	3,15±0,20	2,73±0,15
Лизосомы вторичные (Vv)	1,06±0,11	3,88±0,64	1,61±0,10*	1,78±0,11	2,37±0,14*
Липидные включения (Vv)	8±0,71	6,21±0,65	6,11±0,31	1,78±0,11**	2,37±0,40*
Гликоген (Vv)	14,21±0,59	4,71±1,02*	16,72±1,19	13,5±0,51	17,75±0,91*

Примечание: Vv - объемная плотность структур (% от объема цитоплазмы); NA - численная плотность структур (число в тестовой площади);

* - обозначены величины, достоверно отличающиеся от соответствующих показателей у интактных животных контрольной группы; 3 сут, 7 сут, 13 сут, 30 сут – сутки после имплантации клеток гепатокарциномы-29 в мышечную ткань бедра экспериментальных животных.

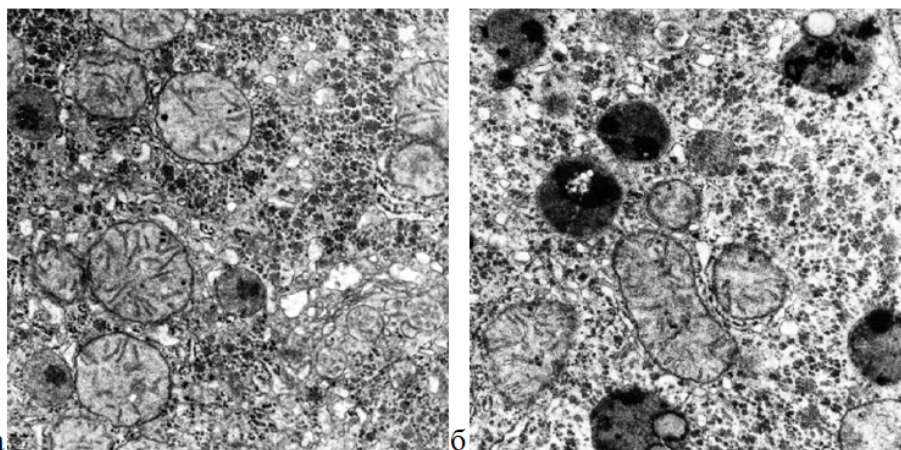


Рисунок 1 – Ультраструктурная организация гепатоцитов в контроле (а) и условиях отдаленного опухолевого роста (б). Снижение содержания цистерн гранулярного эндоплазматического ретикулума, рибосом, митохондрий и возрастание лизосом в гепатоците мыши через 30 суток развития опухолевого процесса. Увеличение $\times 8000$.

Было выявлено уменьшение численной плотности прикрепленных и свободных полисомальных рибосом. Численная плотность полисомальных рибосом на 30 сут снизилось в 3,5 раза, а прикрепленных рибосом в 3 раза (рис. 5). Известно, что содержание

рибосом в клетке определяет потенциальный уровень белкового синтеза. Считается, что на прикрепленных рибосомах гранулярного эндоплазматического ретикулума преимущественно синтезируются белки на экспорт, а на свободных полисомальных комплексах образуются белки на построение собственных мембран клетки.

Полученные нами данные о снижении объемной плотности цистерн гранулярной эндоплазматической сети и численной плотности прикрепленных и свободных полисомальных рибосом свидетельствуют о снижении белок-синтетической функции гепатоцитов в условиях отдаленного опухолевого роста.

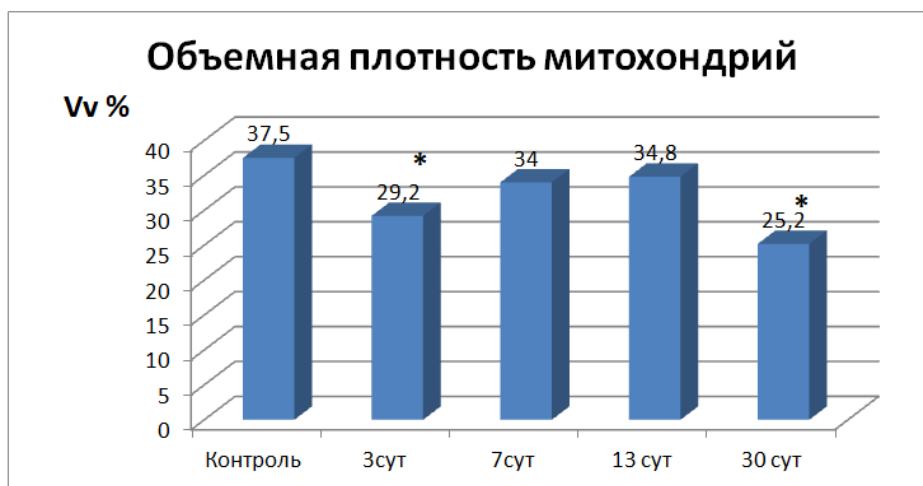


Рисунок 2 – Объемная плотность митохондрий в цитоплазме гепатоцитов в условиях отдаленного опухолевого роста.

Vv – объемная плотность органелл (%); 3 сут, 7 сут, 13 сут, 30 сут – время развития гепатокарциномы в области бедра экспериментальных животных;

* - обозначены величины, достоверно отличающиеся от соответствующих показателей у интактных животных контрольной группы $p < 0,05$.

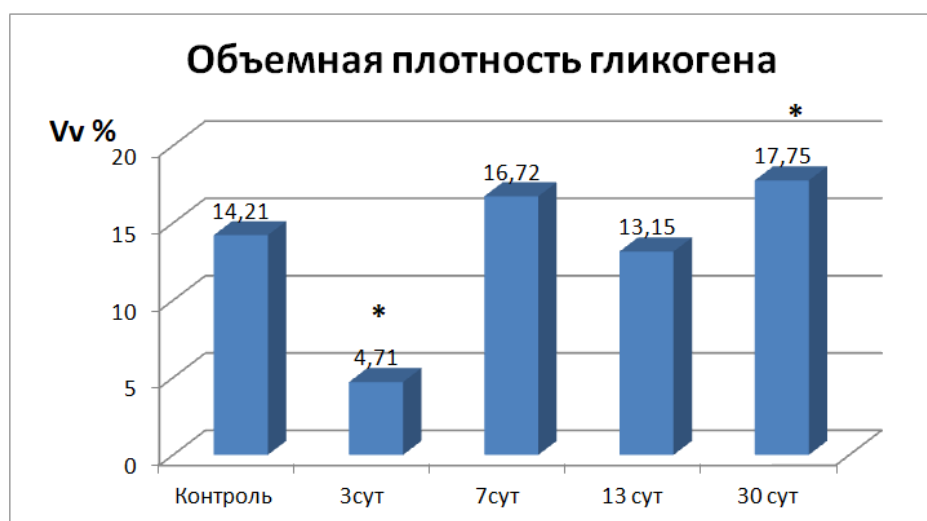


Рисунок 3 – Объемная плотность гликогена в цитоплазме гепатоцитов в условиях отдаленного опухолевого роста.

Vv – объемная плотность органелл (%); 3сут, 7 сут, 13 сут, 30 сут – время развития гепатокарциномы в области бедра экспериментальных животных;

* - обозначены величины, достоверно отличающиеся от соответствующих показателей у интактных животных контрольной группы $p < 0,05$.

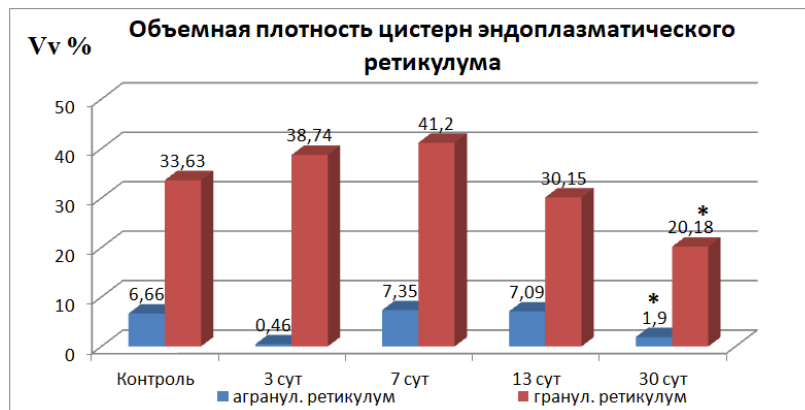


Рисунок 4 – Объемная плотность цистерн эндоплазматического ретикулума в цитоплазме гепатоцитов в условиях отдаленного опухолевого роста.

Vv – объемная плотность органелл (%); 3 сут, 7 сут, 13 сут, 30 сут – время развития гепатокарциномы в области бедра экспериментальных животных;

* - обозначены величины, достоверно отличающиеся от соответствующих показателей у интактных животных контрольной группы $p < 0,05$.

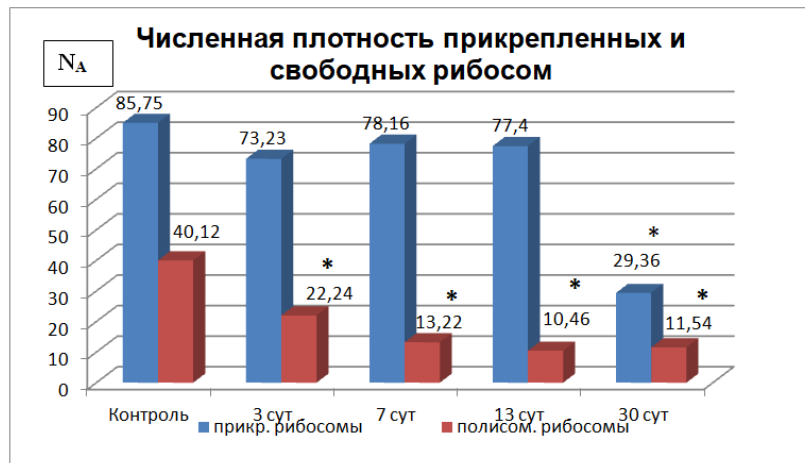


Рисунок 5 – Численная плотность прикрепленных и свободных полисомальных рибосом в цитоплазме гепатоцитов животных в динамике опухолевого роста экспериментальной гепатокарциномы-29 в мышечной ткани бедра. NA – численная плотность структур; 3, сут, 7 сут, 13 сут, 30 сут – время развития гепатокарциномы в области бедра экспериментальных животных;

* - обозначены величины, достоверно отличающиеся от соответствующих показателей у интактных животных контрольной группы $p < 0,05$.

Структурные изменения в печени определялись развитием опухолевого процесса. К 30-м суткам эксперимента в мышечной ткани бедра образовывался опухолевый узел [5]. При этом в динамике опухолевого роста наблюдали существенные изменения свободно-радикального окисления липидов. Отмечали повышение уровня вторичных продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ), что было связано с инвазией опухолевых клеток и повреждением мембранных структур [3] и не могло не оказывать токсического влияния на печень.

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 развития опухоли отмечаются ультраструктурные признаки, косвенно свидетельствующие о развитии недостаточности функции клеток - снижаются объемные плотности митохондрий, цистерн гранулярной эндоплазматической сети, уменьшаются численные плотности прикрепленных и свободных полисомальных рибосом..

Заключение. Методами световой и электронной микроскопии выявлено, что при моделировании опухолевого роста - гепатокарциномы-29 - в мышечной ткани бедра

экспериментальных животных к 30-м суткам развития опухоли в гепатоцитах развиваются структурные признаки, свидетельствующие о нарушении белок-синтетической и энергетической функции клеток. Происходит снижение объемной плотности цистерн гранулярной эндоплазматической сети и митохондрий и численной плотности прикрепленных и свободных полисомальных рибосом. Полученные результаты косвенно свидетельствуют о развивающейся недостаточности функции печени в условиях периферического опухолевого роста.

Список литературы

- 1 Flores-Toro J. A., Go K. L., Leeuwenburgh C., Kim J. – S. Autophagy in the liver: Cell cannibalism and beyond. Arch Pharm Res, -2016. – Vol. 39. №8. – P. 1050-1061.
- 2 Уша Б.В. Биохимические показатели крови собак при гастрите /Б.В. Уша, Г.М. Крюковская, Т.Б. Горовая, Э. Жавнис // Ветеринария. -2006.-№12.-С.54-56.
- 3 Каледин В.И., Жукова Н.А., Николин В.П. и др. Гепатокарцинома-29 – метастазирующая перевиваемая опухоль мышей, вызывающая кахексию // Бюл. экспер. биол. -2009. – Т. 148. №12. – С. 664-669.
- 4 Lev S. Nonvesicular lipid transfer from the endoplasmic reticulum. Cold Spring Harb. Perspect. Biol // - 2012 – Т. 4 № 10. – P. 1-16.
- 5 Bakhbaeva S., Bgatova N., Taskaeva Yu., Makarova V., Borodin Yu. Ultrastructural Organization of Hepatocytes in Distant Tumor Growth. Symposium Systems Biology and Biomedicine (SBioMed-2018). Abstracts. 2018. С. 18.

С.А. Бахбаева¹, Н.П. Бгатова², Ш.М. Жумадина³

¹ С. Торайғыров атындағы Павлодар мемлекеттік университеті, Павлодар, Қазақстан

² Клиникалық және эксперименттік лимфологияның ғылыми-зерттеу институты - Федералды мемлекеттік бюджеттік ғылыми мекеменің филиалы «Ресей ғылым академиясының Сібір бөлімінің цитология және генетика институтының федералдық зерттеу орталығы», Новосібір, Ресей

³ «С. Сейфуллин атындағы Қазақ агротехникалық университеті» АҚ, Нұр-Сұлтан, Қазақстан

Қашықтағы ісіктің өсу динамикасында ақуыз-синтетикалық және энергетикалық бөлімдеріндегі гепатоциттердің ультрақұрылымдық ерекшеліктері

Аңдатпа. Мақалада қашықтағы ісіктің өсуін модельдеу жағдайында жануарлардың гепатоциттерінің ультрақұрылымдық ұйымдасуының нәтижелері келтірілген. Гепатокарцинома-29 ісік өсуінің моделі ретінде алынды, оның жасушалары СВА желілі тышқандардың бұлшықеттеріне егілді. Тәжірибенің 3, 7, 13 және 30 тәуліктерінде қалыпты жағдайдағы және қашықтағы ісіктің өсуіндегі гепатоциттердің ультрақұрылымын жарық және электрондық микроскопия әдісі арқылы бағаладық. 30-шы тәулікте гепатоциттердегі ісіктің дамуында құрылымдық белгілердің өзгерісі байқалды, яғни бұл жасушаның ақуыз-синтетикалық және энергетикалық қызметтерінің бұзылуына әкелетіндігін көрсетті. Мұнда митохондриялар тіркелген, сонымен қатар еркін полисомдық рибосомалардың сандық тығыздығының, гранулярлық эндоплазмалық тор цистерналарының көлем тығыздығының төмендеуі байқалады. Қашықтағы ісіктің өсу кезінде бауырда секреторлық қызметтің жеткіліксіз дамуын дәлелдейтін нәтижелер алынды.

Түйін сөздер: гепатоциттер, ультрақұрылым, эндоплазмалық тор, рибосомалар, митохондриялар, ақуыз-синтетикалық функциялар, ісіктердің өсуі.

S.A. Bakhbayeva¹, N.P. Bgatova², Sh.M. Zhumadina³

¹ S. Toraiygyrov Pavlodar State University, Pavlodar, Kazakhstan

² Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology - branch of the Federal State Budgetary Scientific Institution "Federal Research Center Institute of Cytology and Genetics of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences", Novosibirsk, Russia

³ JSC S. Seifullin Kazakh Agrotechnical University, Nur-Sultan, Kazakhstan

Ultrastructural features of protein-synthetic and energy compartments of hepatocytes in the dynamics of distant tumor growth

Abstract: The article presents the results of the ultrastructural organization of animal hepatocytes under the conditions of peripheral tumor growth modeling. Hepatocarcinoma-29 was taken as a model of tumor growth, the cells of which were grafted into the thigh muscle tissue in CBA mice. The ultrastructure of hepatocytes was evaluated by light and electron microscopy under normal and distant tumor growth conditions after 3, 7, 13, and 30 days of the experiment. It has shown that by the 30th day of tumor development in the hepatocytes, structural signs develop, indicating a violation of the protein-synthetic and energy function of cells. There is a decrease in bulk density of the cisterns of the granular endoplasmic reticulum, mitochondria and the numerical density of attached and free polysomal ribosomes. The obtained results indicate the developing insufficiency of the secretory function of the liver under conditions of peripheral tumor growth.

Keywords: hepatocytes, ultrastructure, endoplasmic reticulum, ribosomes, mitochondria, protein-synthetic functions, tumor growth

References

- 1 Flores-Toro J. A., Go K. L., Leeuwenburgh C., Kim J. – S. Autophagy in the liver: Cell’s cannibalism and beyond. ArchPharmRes, 39. (8), 1050-1061.(2016).
- 2 Usha B.V., Kryukovskaya G.M., Gorovaya T.B., Zhavnis E., Usha B. V. Biohimicheskie pokazateli krovi sobak pri gastrite [Biochemical blood parameters of dogs with gastritis], Veterinariya. (12) 54-56 (2006), [in Russian].
- 3 Kaledin V. I., Zhukova N. A., Nikolin V. P. i dr. Gepatokartsinoma-29 – metastaziruyuschaya perevivaemaya opuhol myishey, vyzivayuschaya kaheksiya [Hepatocarcinoma-29 – Metastatic transplantable tumor of mice causing cachexia], Byul. eksper. biol. (12) 664-669 (2009)[in Russian].
- 4 Lev S. Nonvesicular lipid transfer from the endoplasmic reticulum. ColdSpringHarb. Perspect. Biol, 4 (10), 1-16(2012).
- 5 Bakhbaeva S., Bgatova N., Taskaeva Yu., Makarova V., Borodin Yu. Ultrastructural Organization of Hepatocytes in Distant Tumor Growth. Symposium Systems Biology and Biomedicine (SBioMed-2018). Abstracts. 2018. 18.

Сведения об авторах:

Бахбаева С.А. - докторант кафедры биологии и экологии по специальности 6D060700-Биология, Павлодарский государственный университет им.С.Торайгырова, 140013, ул. Ломова 62, Павлодар, Казахстан.

Бгатова Н.П. - д.б.н., профессор, заведующая лабораторией ультраструктурных исследований НИИ клинической и экспериментальной лимфологии – филиала ФГБНУ ФИЦ Институт цитологии и генетики СО РАН, ул. Акад. Тимакова 2, Новосибирск, Россия.

Жумадина Ш.М. - д.б.н., профессор кафедры «Биологических наук», АО Казахский агротехнический университет им. С. Сейфулина, проспект Женис 62, Нур-Султан, Казахстан.

Bakhbaeva S.A. - PhD student of Biology and Ecology Department in 6D060700- Biology, S. Toraihyrov Pavlodar State University, 140013, 64 Lomov street, Pavlodar, Kazakhstan.

Bgatova N.P. - Doctor of Biological Sciences, professor, head of Ultrastructural Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology Laboratory – branch of FSBSI Federal Research Center Institute of Cytology and Genetics SB RAS, 2 Academician Timakov street, Novosibirsk, Russia.

Zhumadina Sh.M. - Doctor of Biological Sciences, professor of Biological Sciences Department, JSC S. Seifullin Kazakh Agrotechnical university, 62 Zhenis Avenue, Nur-Sultan, Kazakhstan.

Поступила в редакцию 11.10.2019