

КЛЕТКИ АДЕНОКАРЦИНОМЫ ТОЛСТОГО ОТДЕЛА КИШЕЧНИКА ЧЕЛОВЕКА CaCo-2 В ПРОЦЕССЕ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ

© Е. М. Карапова,¹ Л. О. Аброян,¹ Л. А. Акопян,¹ М. Г. Гаспарян,¹ З. А. Карапян,¹
Н. Г. Джагацпаниян,² З. Р. Тер-Погосян,² Л. А. Камалян,¹ Ю. А. Магакян¹

¹ Институт молекулярной биологии НАН Республики Армения и

² Онкологический научный центр им. Фанарджяна МЗ Республики Армения, Ереван

Методами цитоморфометрии и цитофотометрии исследовали клетки аденокарциномы толстого отдела кишечника человека CaCo-2 в течение 10 сут культивирования. Установлена обратная зависимость между активностью пролиферации и плотностью монослоя, повышение которой ингибирует пролиферацию и способствует формированию островков полиплоидных клеток. 2с-клетки выявляются лишь в начале роста культуры, большая же часть клеток полиплоидизируется путем блокирования клеток в фазе G₂. Эти клетки не делятся, о чем говорит отсутствие 2с-клеток, но некоторая часть 4с-клеток вновь вступает в цикл, накапливает 8с ДНК, а затем делится, пополняя фракцию 4с-клеток. В процессе культивирования увеличиваются число ядрышек в ядрах, их суммарный объем и количество ДНК в окколоядрышковом хроматине. Формирование большого числа 4с-клеток с многоядрышковыми ядрами определяет повышение функциональной активности культуры CaCo-2 в целом, а образование в монослое обособленных групп таких клеток свидетельствует о возможной инициации дифференцировки.

Ключевые слова: культура клеток CaCo-2, ДНК, ядро, ядрышко.

Культуры трансформированных клеток, как известно, нередко используются в качестве модельных систем для изучения разных сторон функционирования клеток-предшественников в многоклеточных структурах *in vivo*. Не является исключением и недавно полученная и пока недостаточно изученная культура клеток аденокарциномы толстого отдела кишечника человека CaCo-2, в монослоях которой при длительном культивировании обнаружаются участки спонтанно дифференцированных энтероцитоподобных клеток с поляризованными ядрами, характерными для эпителия кишечника *in vivo* (Heppner et al., 2001). В сообщениях ряда авторов приводятся данные о способности этих клеток синтезировать в процессе роста культуры различные белки: пептидазу (Jumarie, Malo, 1991), муцин-подобный высокомолекулярный гликопротеин (Niv et al., 1992) и щелочную фосфатазу (Hara et al., 1993). В более ранних работах, однако, отмечалось, что некоторые ферменты из числа найденных в гомогенатах ткани толстой кишки человека не выявляются в клетках CaCo-2 (Yonakim et al., 1989; Brockhausen et al., 1991). Тем не менее, несмотря на эти различия, приведенные выше данные позволяют считать культуру клеток CaCo-2 удобной моделью для изучения механизмов регуляции процессов пролиферации и дифференцировки *in vitro*. Несомненно, перспективными в этом отношении могли стать цитоморфологические и цитохимические исследования морфофункционального состояния клеток CaCo-2 в процессе роста культуры, тем более что подобных работ в доступной нам литературе обнаружить не удалось. В исследованиях, проведенных на других клетках *in vitro* и *in vivo*, показано, что измене-

ния в содержании ДНК в ядрах и их размерах, в числе и размерах ядрышек тесно связаны с активностью пролиферации и степенью дифференцированности клеток и объективно отражают характер пролиферации дифференцировки (De Angelis et al., 1997; Ueki et al., 1997; Штейн и др., 1999; Derenzini et al., 2000). Подтверждается это и исследованиями функциональной морфологии ядрышкообразующих районов хромосом, проведенными *in vivo* на нормальных и злокачественно измененных клеточных популяциях (Morais et al., 1996; Карапова и др., 2004) и *in vitro* на перевиваемых культурах трансформированных клеток (Mamaev, Mamaeva, 1990; Турилова и др., 1998; Карапова и др., 2003; Karalyan et al., 2003, 2004).

Задача настоящего исследования заключалась в том, чтобы проанализировать цитоморфологические параметры клеток CaCo-2 в процессе их культивирования.

Материал и методика

Клетки культуры CaCo-2 выращивали на покровных стеклах в пеницилловых флаконах в течение 10 сут в среде Игл-МЕМ (Sigma) с добавлением глутамина и 20 % фетальной бычьей сыворотки. Всего было проведено 12 пассажей. Стекла извлекали ежесуточно начиная со 2-х сут. Определяли плотность монослоя (количество клеток, приходящихся на 0.01 мм² площади препарата), пролиферативную активность (число митозов на 1000 клеток), долю погибших клеток, число ядрышек в ядрах и распределение последних в популяции по этому показателю. Для выявления ДНК препараты окрашивали по Фольгену после

фиксации в 96%-ном этаноле и гидролиза в 5 н. НС1 при 22 °C в течение 60 мин (Магакян, Карапетова, 1989).

Цитофотометрическое и цитоморфометрическое исследование проводили с помощью прецизионного анализатора изображений микрообъектов, сконструированного в Отделе физико-химической биологии клетки Института молекулярной биологии НАН Республики Армения на базе сканирующего микроскопа-фотометра SMP-05 (Orton, ФРГ), цифровой ПЗС-видеокамеры высокого разрешения CCD-502 (Bischke, Япония), видеоплаты Flyvideo (Lifeview, Таиланд), 17" монитора (Scott, США), компьютера Pentium IV и разработанного нами (Ю. А. Магакян, Т. Ю. Магакян и А. Л. Капанцян) программного обеспечения UPIAM-2000 (Universal Program of the Image Analysis of Microobjects), включающего в себя подпрограмму автоматизированного управления цитофотометром в режимах «прямого» (x - y -столик, ФЭУ, АЦП) и использованного в настоящем исследовании телевизионного сканирования. Перед сканированием с помощью маркера обводили контуры изображений ядер и ядрышек, включая в последнем случае область околоядрышкового хроматина. Измеряли массу ДНК в ядрах и в каждом из ядрышек ($\lambda = 575$ нм; объектив 100/1.30), их площади и периметры. Диплоидным эквивалентом служила масса ДНК в ядрах лимфоцитов человека. Вычисляли объем ($V = 4/3\pi R^3$), полную поверхность ($P = 4\pi R^2$) ядер и ядрышек, а также суммарные значения этих показателей для всех ядрышек в каждом из ядер. Все данные измерений подвергали статистической обработке и представляли в условных сравнимых единицах.

Результаты и обсуждение

С 1-х сут роста культуры нарастает плотность монослоя. Уже на 3-и сут она удваивается и продолжает увеличиваться в течение всего исследованного срока культивирования (табл. 1). Плотность монослоя, как известно, является одним из аутогенных факторов регуляции

Таблица 1
Плотность монослоя, митотическая активность,
количество погибших клеток и среднее число ядрышек
в ядрах клеток культуры CaCo-2 ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$)

Сроки культивирования, сут	Количество клеток в 0.01 мм ²	Доля митозов, %	Доля погибших клеток, %	Среднее количество ядрышек в ядрах
2	12.4 ± 0.8	0.50 ± 0.01	1.2 ± 0.1	1.7 ± 0.1
3	20.6 ± 1.1	1.40 ± 0.20	1.0 ± 0.2	2.1 ± 0.2
4	22.2 ± 1.2	1.50 ± 0.08	2.5 ± 0.2	2.2 ± 0.2
5	22.3 ± 0.6	2.10 ± 0.30	3.7 ± 0.3	2.9 ± 0.2
6	22.6 ± 0.8	2.20 ± 0.06	5.8 ± 0.3	2.9 ± 0.3
7	23.7 ± 0.7	2.40 ± 0.02	5.8 ± 0.5	3.2 ± 0.3
8	24.8 ± 0.9	2.60 ± 0.06	7.8 ± 0.3	3.5 ± 0.2
9	30.6 ± 1.0	2.10 ± 0.04	8.7 ± 0.2	3.4 ± 0.2
10	38.5 ± 1.6	1.00 ± 0.03	66.5 ± 5.1	2.3 ± 0.2

роста культуры: при низкой плотности клетки активно размножаются и плотность популяции при этом растет, но по мере ее возрастания проявляются ингибирующие пролиферацию свойства. Так, согласно нашим данным (табл. 1), активность пролиферации клеток CaCo-2, вначале достаточно низкая, затем повышается и, достигнув на 8-е сут максимума, при котором значения митотического коэффициента более чем в 5 раз превышают его значения на 2-е сут, снова понижается. Можно полагать, что это снижение активности размножения клеток обусловлено нарастанием плотности монослоя, число клеток в котором на 9—10-е сут в 3 раза больше, чем на 2-е сут (табл. 1). Вероятно, что наблюдаемое в это же время увеличение доли погибших клеток, составляющих на 10-е сут подавляющую часть монослоя (табл. 1), также связано с высокой плотностью последне-

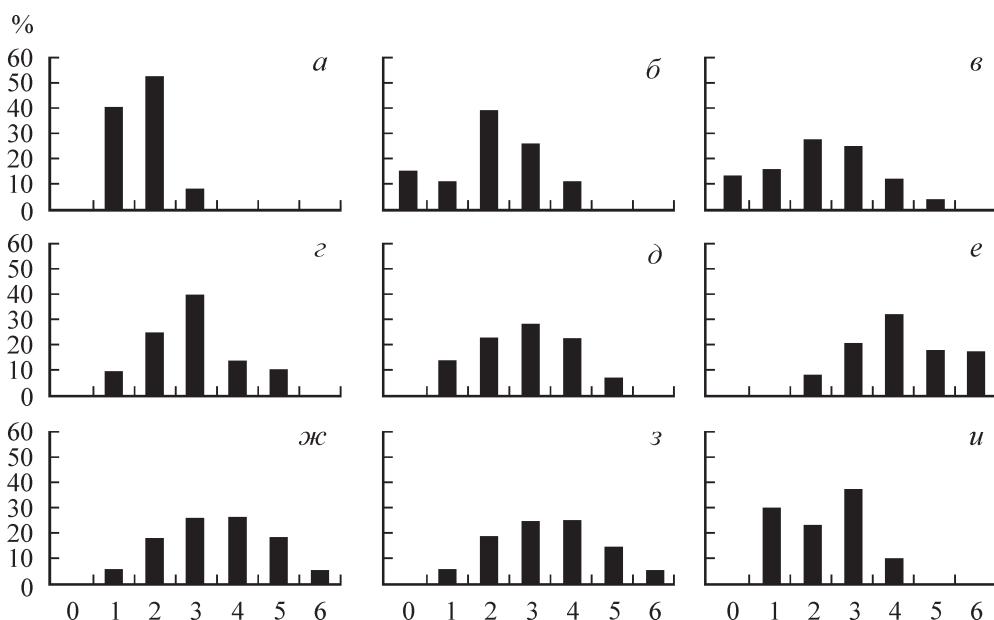


Рис. 1. Распределение ядер клеток CaCo-2 по количеству ядрышек в них на разных сроках роста культуры.

По горизонтали — количество ядрышек; по вертикали — доля клеток, %. а—и — 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 и 10-сут роста культуры соответственно.

Таблица 2

Содержание ДНК в ядрах и околяядрышковом хроматине (ОЯХ), объем и полная поверхность ядер и ядрышек клеток CaCo-2 в процессе культивирования ($\bar{x} \pm s_x$)

Сроки культивирования, сут	Ядро			Ядрышки		
	ДНК, усл. ед.	объем, усл. ед.	полная поверхность, усл. ед.	ДНК (ОЯХ), усл. ед.	объем, усл. ед.	полная поверхность, усл. ед.
2	199.7 ± 8.9	359.8 ± 17.8	119.9 ± 3.6	14.1 ± 0.8	6.1 ± 0.5	7.2 ± 0.5
3	193.9 ± 7.0	304.1 ± 10.2	106.7 ± 2.1	15.7 ± 1.1	6.3 ± 0.5	9.0 ± 0.6
4	166.1 ± 4.9	226.6 ± 9.0	87.8 ± 1.9	18.2 ± 1.2	7.5 ± 0.6	11.0 ± 0.8
5	222.4 ± 4.6	381.5 ± 9.0	110.2 ± 1.8	26.2 ± 1.1	12.4 ± 0.8	17.4 ± 0.7
6	244.5 ± 9.6	448.2 ± 21.4	162.7 ± 7.2	26.6 ± 2.3	18.9 ± 0.9	18.4 ± 0.9
7	228.7 ± 13.3	445.0 ± 21.0	143.5 ± 5.2	26.1 ± 1.0	20.8 ± 1.3	31.8 ± 1.9
8	205.5 ± 11.8	421.5 ± 15.8	135.1 ± 3.6	25.4 ± 1.7	18.4 ± 1.2	28.7 ± 1.8
9	193.6 ± 4.5	397.9 ± 18.5	126.1 ± 3.2	24.3 ± 1.7	13.6 ± 0.6	28.1 ± 1.5
10	179.2 ± 5.4	264.2 ± 8.3	91.0 ± 2.4	17.7 ± 1.4	11.1 ± 0.7	13.9 ± 0.8

го и наползанием клеток друг на друга. К заключению о взаимозависимости между активностью пролиферации и плотностью монослоя приходят и другие авторы (Niv et al., 1992), полагая при этом, что переход клеток CaCo-2 от активной пролиферации к дифференцированному фенотипу (формирование эндоцитоподобных клеток) происходит по достижении высокой плотности монослоя и возрастании по мере увеличения плотности экспрессии щелочной фосфатазы.

Одним из цитоморфологических показателей степени активности клеток является число ядрышек в ядрах, которое увеличивается до 8-х сут, а затем уменьшается. Эта динамика, как мы полагаем, также связана с изменениями в пролиферативной активности клеток, нарастающей до 8-х сут и понижающейся на 9—10-е сут (табл. 1). Наблюдаются изменения и в распределении ядер по числу ядрышек. Так, если на 2-е сут свыше 90 % популяции

составляют одно- или двуядрышковые клетки, то уже с 2-х сут доля многоядрышковых клеток увеличивается, и начиная с 7-х сут более 50 % популяции приходится на клетки, в ядрах которых насчитывается от 3 до 6 ядрышек (рис. 1). Размеры клеточных ядер также нестабильны: в течение первых 4-х сут роста объем ядер уменьшается, затем начиная с 5-х сут возрастает и достигает максимума на 6—7-е сут, после чего, вплоть до 10-х сут, вновь снижается, причем настолько, что объем ядер в это время оказывается даже меньшим, чем в начале роста культуры. Аналогичные изменения, как и следовало ожидать, наблюдаются и в динамике значений полной поверхности ядер (табл. 2). Отличается от этого динамика значений суммарного объема ядрышек. Этот показатель увеличивается с 1-х сут культивирования, на 6—8-е сут в 3 раза превосходит свои значения на 2-е сут и хотя после этого снижается, однако не в такой степени, как объ-

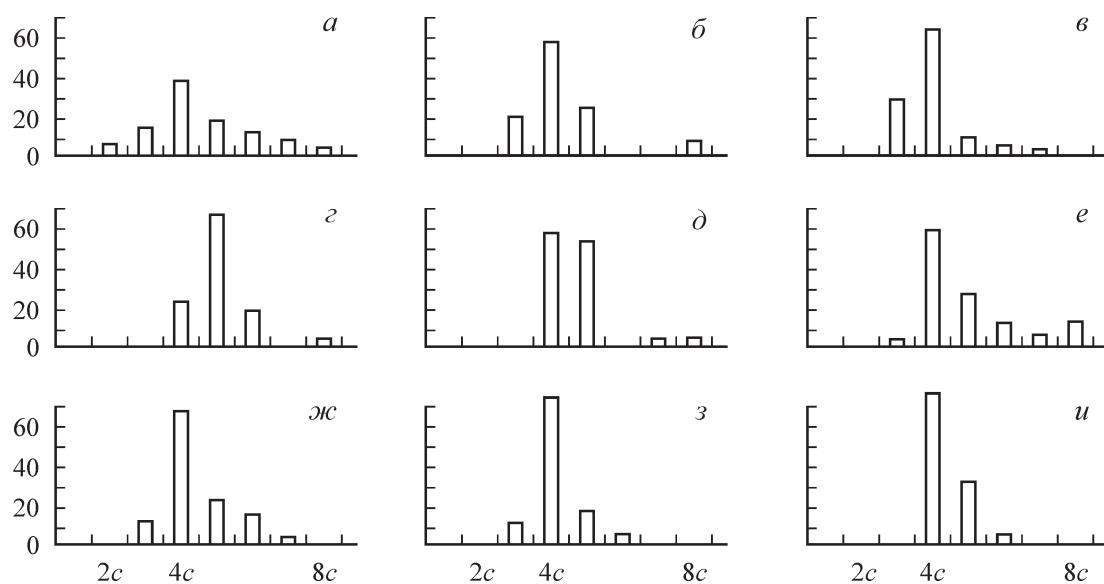


Рис. 2. Распределение клеток CaCo-2 по пloidности на разных сроках роста культуры.

По горизонтали — значения пloidности, c ; по вертикали — доля клеток, %. $a-u$ — 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 и 10-е сут роста культуры соответственно.

ем ядер, и даже на 10-е сут он почти в 2 раза выше, чем на 2-е сут (табл. 2).

Различия в динамике размеров ядер и ядрышек отражаются на значениях ядрышко-ядерных отношений в пользу ядрышек, что также свидетельствует о повышении функциональной активности клеток в процессе роста культуры. Согласно литературным данным, изменения в числе и размерах ядрышек могут быть связаны не только с кинетикой пролиферативной активности клеток, но и с уровнем их дифференцированности (Мамаев, Мамаева, 1990; Турилова и др., 1998) и степенью злокачественности (Hofstadter et al., 1995; Derenzini et al., 2000). Суммарное содержание ДНК в ядрышках (околоядрышковый хроматин) также постепенно нарастает с самого начала культивирования и начиная с 5-х сут вплоть до 8-х сут в 1.5—2.0 раза превышает значения суммарного содержания ДНК на 2-е сут (табл. 2).

Нестабильно и среднее содержание ДНК в ядрах клеток, что связано с изменениями в характере распределения по значениям пloidности в процессе роста культуры, о чем свидетельствует гистограммный анализ (рис. 2). Видно, что 2c-клетки выявляются в небольшом числе лишь в самом начале культивирования на 2-е сут, и в это же время в популяции обнаруживается немало клеток с «промежуточными» (H2c и H4c) значениями содержания ДНК в ядрах, что свидетельствует о прохождении ими фазы синтеза ДНК и процесса формирования 4c- и даже 8c-клеток. Отсутствие 2c-клеток начиная с 3-х сут и вплоть до конца культивирования говорит о том, что H2c-клетки, пройдя фазу G₂, не делятся и выходят из цикла с содержанием ДНК в ядрах, равным 4c (G₂-блок). Большая часть популяции на протяжении всего периода культивирования представлена 4c-клетками. Это согласуется с данными других авторов о том, что модальное число хромосом в клетках CaCo-2 равно 96 и близко к тетраплоидному (Jamarie, Malo, 1991). Вместе с тем некоторая часть 4c-клеток вступает в следующий цикл, вторично проходит фазы S и G₂ и превращается в 8c-клетки, которые затем делятся, пополняя фракцию 4c-клеток. Известно, что при повышении пloidности клеток возрастает их метаболическая активность, и важно отметить, что больше всего 4c-клеток выявляется на 7—8-е сут (рис. 2).

Некоторые исследователи этой культуры (Harrison et al., 1999) считают, что блокирование клеток в фазе G₂ инициирует их дифференцировку. Именно на 7—8-е сут мы наблюдали появление в монослое островков полиморфных клеток с крупными многоядрышковыми ядрами, содержащими 4c ДНК, а другими авторами описано появление в это время «энteroцитоподобных» клеток, проявляющих способности к синтезу специфических белков и ферментов (Marriadason et al., 2000; Heppner et al., 2001; Zhang et al., 2003).

Итак, выявлен ряд не описанных ранее особенностей поведения клеток CaCo-2 в процессе роста культуры. Установлена обратная зависимость между активностью пролиферации и плотностью монослоя, повышение которой ингибирует пролиферацию. 2c-клетки выявляются лишь в начале роста культуры, большая же часть клеток полиплоидизируется путем блока в фазе G₂. 4c-клетки не делятся, о чем свидетельствует отсутствие 2c-клеток в процессе дальнейшего культивирования, но часть их вступает в следующий цикл и накапливает 8c ДНК. Эти клетки делятся, пополняя фракцию 4c-клеток. Накопление 4c-клеток, увеличение количества и суммарного объ-

ема ядрышек в ядрах, массы ДНК в околоядрышковом хроматине и числа клеток с многоядрышковыми ядрами свидетельствует о повышении функциональной активности популяции в целом, а образование в монослое групп энteroцито-подобных клеток — о возможном начале их дифференцировки.

Список литературы

- Карапова Е. М., Камалян Л. А., Аброян Л. О., Акопян Л. А., Гаспарян М. Г., Джагагцян Н. Г., Карабян З. А., Тер-Погосян З. Р., Магакян Ю. А. 2003. Поведение клеток перевиваемой культуры Нер-2 и их ядерно-ядрышкового аппарата в процессе культивирования и под действием Na-дс-РНК. Цитология. 45 (8) : 764—769.
- Карапова Е. М., Камалян Л. А., Аброян Л. О., Акопян Л. А., Гаспарян М. Г., Джагагцян Н. Г., Карабян З. А., Тер-Погосян З. Р., Магакян Ю. А. 2004. Сравнительный анализ воздействия двусpirальных РНК (дс-РНК) различного происхождения на клетки рака горлана человека (Нер-2). Бюлл. эксперим. биол. мед. 137 (6) : 682—686.
- Магакян Ю. А., Карапова Е. М. 1989. Цитофотометрия ДНК. Ереван: Изд-во АН АрмССР. 204 с.
- Турилова В. И., Смирнова Т. Д., Самойлович М. П., Сухих Т. Р. 1998. Функциональная морфология ядрышкообразующих районов хромосом и ядрышек в клетках линий множественной миеломы человека. Цитология. 40 (6) : 536—548.
- Штейн Г. И., Кудрявцева М. В., Кудрявцев Б. Н. 1999. Изменение морфометрических параметров окрашенных серебром ядрышек гепатоцитов крыс при циррозе печени и в процессе ее реабилитации. Цитология. 41 (7) : 574—579.
- Brockhausen I., Romero P. A., Herscovics A. 1991. Glycosyltransferase changes upon differentiation of CaCo-2 human colonic adenocarcinoma cells. Cancer Res. 51 : 3136—3142.
- De Angelis P. M., Stokke T., Clausen O. P. 1997. NO38 expression and nucleolar counts are correlated with cellular DNA content but not with proliferation parameters in colorectal carcinoma. Mol. Pathol. 50 : 201—208.
- Derenzini M., Trere D., Pession A., Govoni M., Sirri V., Chieco P. 2000. Nucleolar size indicates the rapidity of cell proliferation in cancer tissues. J. Pathol. 19 : 181—186.
- Hara A., Hibi T., Yoshioka M., Watanabe N., Hayashi A., Iwao Y., Saito H., Watanabe T., Tsuchiya M. 1993. Changes of proliferative activity and phenotypes in spontaneous differentiation of a colon cancer cell line. Jap. J. Cancer Res. 84 : 625—632.
- Harrison L. E., Wang Q. M., Studzinski G. P. 1999. Butyrate-induced G2/M block in CaCo-2 colon cancer cells is associated with decreased p34cdc2 activity. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 222 : 150—156.
- Heppner F. I., Christ A. D., Klein M. A., Prinz M., Fried M., Kraehenbuhl J.-P., Aguzzi A. 2001. Transepithelial prion transport by M cells. Nature Medicine. 7 : 976—977.
- Hofstadter F., Knuchel R., Ruschoff J. 1995. Cell proliferation assessment in oncology. Virchow's Arch. 427 : 323—341.
- Jamarie C., Malo C. 1991. CaCo-2 cells cultured in serum-free medium as a model for the study of enterocytic differentiation *in vitro*. J. Cell. Physiol. 149 : 24—33.
- Karalyan Z. Z., Djaghatsyan N. G., Gasparyan M. H., Hakobyan L. H., Abroyan L. O., Magakian Yu. A., Ter-Pogossian Z. R., Kamalyan L. A., Karalova E. M. 2004. Morphometry of nuclear and nucleolar structures in a CaCo-2 cell line. Cell Biol. Int. 28 : 249—253.
- Karalyan Z. Z., Djaghatsyan N. G., Gasparyan M. H., Abroyan L. O., Hakobyan L. A., Ter-Pogossian Z. R., Magakian Yu. A., Kamalyan L. A., Avagyan V. Yu., Karalova E. M. 2003. New indices in morphometry of nuclear structure of NIH 3T3 cell line. Cell Biol. Int. 10 : 809—814.
- Mamaev N. N., Mamaeva S. E. 1990. Nucleolar organizer region on activity in human chromosome and interphase nuclei or normal, leukemic, and tumor cells as evaluated by silver staining. Int. Rev. Cytol. 121 : 233—266.

- Mariadasson J. M., Rickard K. L., Barkla D. H., Augenlicht L. H., Gibson P. R. 2000. Divergent phenotypic patterns and commitment to apoptosis of CaCo-2 cells during spontaneous and butirate-induced differentiation. *J. Cell. Physiol.* 183 : 347—354.
- Morais M., Docckery P., White Fh. 1996. A quantitative study of silver-stained NORs in different segments of the normal human colorectal crypt. *J. Anat.* 188 : 521—527.
- Niv Y., Byrd J. C., Ho S. B., Dahya R., Kim Y. S. 1992. Mucin synthesis in relation to spontaneous differentiation of colon cancer cells *in vitro*. *Int. J. Cancer.* 50 : 147—152.
- Ueki T., Nakaayama Y., Sugao Y., Kohno K., Matsuo M., Sagimoto Y., Yamada Y., Kuwano M., Tsaneyoshi M. 1997. Significance of the expression of proliferation-associated nucleolar antigen p120 in human colorectal tumors. *Hum. Pathol.* 28 : 74—79.
- Yonakim A., Romero P. A., Yee K., Carlsson S. R., Fucuda M., Herscovics A. 1989. Decrease in sialoglycans associated with lysosomal membrane glycoproteins during differentiation of CaCo-2 human colonic adenocarcinoma cells. *Cancer Res.* 49 : 6889—6895.
- Zhang X., Cromwell J. W., Kanjummen B. D., Yee D., Garcia-Aguilar J. 2003. The alpha 2 and alpha 3 integrins are required for morphologic differentiation of an intestinal epithelial cell line. *Surgery.* 4 : 429—437.

Поступила 1 XI 2005

HUMAN LARGE INTESTINE ADENOCARCINOMA CELLS (CaCo-2) IN THE PROCESS OF CULTIVATION

*E. M. Karalova,¹ L. O. Abroyan,¹ L. A. Hakobyan,¹ M. H. Gasparyan,¹ Z. A. Karalyan,¹
N. G. Jaghatspanyan,² Z. R. Ter-Pogossyan,² L. A. Kamalyan,² Yu. A. Magakyan¹*

¹ Institute of Molecular Biology NAS of Armenian Republic and

² the Fanarjan Scientific Center of Oncology, Ministry of Health of Armenian Republic, Yerevan

Using cytomorphometry and cytophotometry cells of human large intestine adenocarcinoma (CaCo-2) were studied under condition of a 10 day cultivation. A reverse dependence was established between proliferative activity and monolayer density. The increase of the latter inhibits proliferation and promotes the formation of islets of polymorph cells. 2c-cells could be seen only at the beginning of culture growth; a larger part of cells polyploidized by cell blocking in G₂-phase. These cells do not divide, which is testified by the absence of 2c-cells, but some part of 4c-cells start the next cycle, accumulates 8c-DNA and then divides, replenishing the 4c-cells population. In the process of cultivation, we observed an increase in the number and total volume of nucleoli in the nuclei, and a rise in DNA amount in the peri-nucleolar chromatin. The formation of numerous 4c-cells with multi-nucleolar nuclei may define an increase of functional activity of CaCo-2 culture as the whole, whereas the formation of separated groups of such cells in the monolayer may denote a possible initiation of their differentiation.