

## МОРФОЛОГИЧЕСКАЯ И ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ГЕТЕРОГЕННОСТЬ КЛЕТОК АСЦИТНОЙ ГЕПАТОМЫ ЗАЙДЕЛА КРЫСЫ

© И. И. Тюряева,<sup>1</sup> Н. А. Филатова, Ю. М. Розанов, С. Ю. Демин, Г. И. Блинова, В. А. Иванов

*Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург;*

<sup>1</sup> электронный адрес: [ti@mail.cytspb.rssi.ru](mailto:ti@mail.cytspb.rssi.ru)

Работа посвящена изучению молекулярно-клеточных механизмов дисдифференцировки при неопластической трансформации клеток на примере исследования гетерогенности клеточных популяций, образующих злокачественную опухоль. Выявлены две естественные фракции клеток гепатомы Зайдела крысы, различающиеся по типу роста в первичной культуре. Клетки одной фракции прикрепляются к субстрату и растут в монослое (S-фракция), тогда как клетки другой флотируют в культуральной среде (F-фракция). Методом приживленных наблюдений клеток первичной культуры (1—2-го пассажей) на пределе разрешения DIC-микроскопии установлено, что обе фракции содержат клетки нескольких типов. Одни из них являются специфичными для одной из фракций, другие встречаются в обеих фракциях, но с различными частотами. Тем же методом показано, что при длительном раздельном культивировании фракций *in vitro* (более 50 пассажей), в обеих изменяется как клеточный состав, так и исходное соотношение клеток разного типа. По данным проточной ДНК-цитометрии, клетки обеих фракций гипотетраплоидные и имеют незначительные отличия по содержанию ДНК. После адаптации к условиям культивирования *in vitro* у клеток S-фракции обнаруживается повышенная пролиферативная активность по сравнению с клетками F-фракции, после длительного культивирования фракции уже существенно (в 2.3 раза) различаются по этому критерию. Количество мембранны-связанного ламинина, маркера гепатоцеллюлярных карцином, на клетках F-фракции больше, чем на клетках S-фракции. Межфракционные различия подтверждены иммунологическими оценками резистентности клеток гепатомы к литическому действию естественных киллеров: клетки S-фракции первичной культуры в 2.4 раза чувствительнее клеток F-фракции, а после длительного культивирования клетки F-фракции становятся практически резистентными к цитотоксическому действию естественных киллеров. По полученным данным обсуждаются наиболее вероятные пути дисдифференцировки клеток печени крысы при становлении гепатомы Зайдела и при длительном культивировании клеток этой опухоли *in vitro*.

**Ключевые слова:** субпопуляции клеток опухоли, цитометрия ДНК, гетерогенность опухоли, естественные киллеры, гепатома Зайдела.

Ключевым вопросом биологии опухолей является ее популяционный клеточный состав. Известно, что все опухоли (солидные и лимфомы) гетерогенны по своему клеточному составу. Гетерогенность клеток в опухоли выражается в их морфологии, в генетических различиях и отличиях по антигенам клеточной поверхности, разной пролиферативной активности, способности инициировать опухолевый рост при трансплантации, а также по реакции на терапевтические мероприятия, используемые в онкологии. Наряду с этим индивидуальные клетки опухоли характеризуются общими генетическими нарушениями, отражающими их клональное происхождение (от одной клетки). Причины гетерогенности клеток в опухоли дискутируются (Wang, Dick, 2005; Wicha et al., 2006; Campbell, Polyak, 2007; Dalerba et al., 2007; Adams, Strasser, 2008; Dick, 2008; Maenhaut et al., 2010). В иерархической модели (другое название — cancer stem cells model) опухоль представляется в виде квазиткани, имитирующей развитие нормальной ткани, архитектура которой поддерживается стволовыми клетками. В этой модели опухолевые стволовые клетки являются очень небольшой популяцией биологически различных клеток, способных к са-

мообновлению, реинициации опухолевого роста и к созреванию, давая потомков, которые и составляют основную массу опухоли. Последние утрачивают способность к самообновлению и, находясь на разных этапах аберрантной дифференцировки, отягощенной последствиями генетической и(или) эпигенетической нестабильности, составляют основу гетерогенности клеточного состава опухоли.

В альтернативной стохастической модели большинство клеток опухоли (если не все) способно к самообновлению и поддержанию опухолевой прогрессии, хотя и в разной степени, т. е. опухоль является биологически гомогенной. Поведение же опухолевых клеток в условиях той же нестабильности зависит от внутренних факторов (уровня транскрипционных факторов, особенности сигнальных путей) и внешних факторов (микроокружения, иммунного ответа). Эти влияния оказываются непредсказуемыми и приводят к гетерогенности в экспрессии маркеров клеточной поверхности или других маркеров развития, к различной пролиферативной активности клеток и их способности реиницировать опухолевый рост. Обе модели основываются на существовании в опухоли функ-

ционально стволовых клеток, т.е. клеток, ведущих себя как стволовые. Существенное различие в том, что в стохастической модели клетки с такими функциями получают-  
ся случайно и большинство опухолевых клеток (если не каждая) имеет потенции вести себя подобно стволовой, подвергаясь подходящему воздействию, в то время как в иерархической модели существует только один определенный подтипа клеток, обладающий свойствами стволовых. Однако экспериментальные данные показывают, что большинство опухолей отображают, скорее, смешанную модель роста. Таким образом, клеточные и молекулярные основы гетерогенности опухоли представляют собой фундаментальную проблему.

Наиболее удобными экспериментальными моделями для изучения гетерогенности клеток являются асцитные формы опухолей. В данной работе мы использовали асцитную перевивную гепатому Зайдела крысы, которая характеризуется наличием одиночных клеток и агрегатов из нескольких или десятков клеток. Нами было обнаружено, что клетки опухоли различаются между собой по адгезивности к культуральному пластику и способу существования в первичной культуре: одни из них распластываются по дну флакона, формируя монослои, а вторые продолжают флотировать в жидкости (культуральной среде).

Настоящая работа посвящена исследованию морфологических различий клеток указанных фракций асцитной гепатомы Зайдела первичной культуры и после длительного раздельного культивирования фракций, а также характеристике их пролиферативной активности, оценке содержания ДНК, количества мембрально-ассоциированного ламина и чувствительности к клеткам-эффекторам вырожденного иммунитета — естественным киллерам.

## Материал и методика

Исследование проводили на беспородных крысах-самцах массой 120—150 г (питомник «Рапполово», РАМН). Клетки асцитной гепатомы Зайдела прививали крысам внутрибрюшинным введением 0.5 мл асцита. На 6—7-е сут после инъекции (терминальная стадия развития опухоли) крыс умерщвляли путем декапитации и отбирали из брюшной полости асцит. Клетки опухоли отмывали 3 раза 0.15 М раствором NaCl с помощью низкоскоростного центрифугирования (200 об/мин, 15 мин). Отмытые клетки переносили во флаконы, где их культивировали в течение 1—3 сут в среде DMEM с 10 % эмбриональной телячьей сыворотки. Спустя 1 сут одна часть клеток прикреплялась к культуральному пластику, а другая флотировала в культуральной среде. Эти фракции были обозначены нами как S- и F-фракции соответственно.

Клетки S- и F-фракций гепатомы Зайдела длительное время (более 50 пассажей) культивировали раздельно, соответственно в средах DMEM и RPMI, содержащих 10 % эмбриональной телячьей сыворотки. В одном случае пас-  
сировали только прикрепленные клетки, в другом — только флотирующие комплексы. При этом было отмечено, что в культуре клеток F-фракции всегда вновь появляются клетки, прикрепляющиеся к пластику, а в культуре клеток S-фракции — флотирующие комплексы клеток, т.е. восстанавливается исходный популяционный состав опухоли.

Фотографии клеток интактных культур получали ме-  
тодом светлого поля с помощью инвертированного мик-

роскопа Биолам П-1 (ЛОМО, Россия), оснащенного широкоугольным окуляром Nikon и 8-мегапиксельной цифровой камерой Sony DSC-W90 (Япония). Приживленные наблюдения клеток осуществляли с помощью микроскопа Leica DM2500, используя метод интерференционного контраста (DIC) и камеру-планшет, смонтированную на предметном стекле. Она представляет собой модификацию камеры для приживленных наблюдений клеток, описанную нами ранее (Демин, 2003). Такого типа камеры позволяют наблюдать клетки на пределе разрешения световой микроскопии с помощью неинвертированного микроскопа, т.е. сверху вниз, что особенно важно для изучения апикальных структур клетки и ее ядра. Пастеровской пипеткой вносили 0.5 мл концентрированной клеточной суспензии в камеру-планшет и герметизировали ее открытые края с помощью вазелинового масла. По нашим наблюдениям, в течение 2—3 ч клетки гепатомы, способные к адгезии на поверхности предметного стекла, прикрепляются к нему. Приживленные наблюдения клеток в камере-планшете проводили при комнатной температуре. Изображения клеток получали с помощью штатной 3-мегапиксельной CCD-камеры микроскопа Leica DM2500.

Содержание ДНК определяли методом проточного цитометрии. Клетки обеих фракций гепатомы Зайдела отмывали от среды и помещали на 5 мин в теплый буферный раствор для диссоциации клеточных комплексов, содержащий 0.145 М NaCl, 0.7 мМ KCl, 0.2 мМ NaHCO<sub>3</sub>, 0.027 М цитрата натрия, pH 7.5. В указанном буфере клеточные комплексы легко диссоциировали и уже вновь не агрегировали. Немногочисленные устойчивые к диссоциации клеточные комплексы дополнительно дезагрегировали механически с помощью шприца. Далее клетки в концентрации 1—2 млн/мл обрабатывали 0.1%-ным Tritonом X-100 и окрашивали смесью двух красителей — оливомицина (40 мкг/мл) и бромистого этида (20 мкг/мл) — в присутствии 15 мМ MgCl<sub>2</sub> в течение 24 ч при 5—7 °C. Распределение ДНК регистрировали с помощью лабораторного проточного цитометра, изготовленного на основе микроскопа ЛЮМАМ-И. В качестве источника света использовали газоразрядную ртутную лампу ДРШ-250-2. Возбуждение флуоресценции осуществляли в области 380—450 нм, регистрацию — в области >520 нм. Для определения индекса пloidности исследуемых клеток в параллельных экспериментах регистрировали ДНК-гистограммы смеси опухолевых клеток и спленоцитов крыс. Индекс пloidности вычисляли как отношение номера канала амплитудного анализатора, соответствующего максимуму пика G<sub>1</sub> исследуемых клеток, к номеру канала, соответствующего максимуму пика нормальных диплоидных клеток — спленоцитов. Гетерогенность исследуемых клеток по содержанию ядерной ДНК в фазе G<sub>1</sub> (CV<sub>отн</sub>) оценивали по отношению коэффициента вариации пика G<sub>1</sub> к коэффициенту вариации пика нормальных диплоидных клеток.

Для определения плавучей плотности клеток обеих фракций в градиенте плотности Перколла (Pharmacia, Швеция) из первичной культуры на 1—2-е сут культивирования были раздельно отобраны флотирующие и прикрепившиеся клетки и дезагрегированы в буфере для диссоциации клеточных комплексов. Для приготовления градиента 30%-ный изоосмотический раствор Перколла центрифугировали при 3000 g 40 мин. Клеточную суспензию в объеме 0.5 мл в концентрации 20 · 10<sup>6</sup> кл/мл наслаживали на поверхность градиента вместе с маркерами плот-

ности (Sigma, США) и центрифугировали при 500 g 10 мин.

Чувствительность к естественным киллерным клеткам выявляли в цитотоксическом тесте с использованием  $^{3}\text{H}$ -уридина (Филатова и др., 2008). В качестве клеток-эффекторов использовали спленоциты интактных мышей СЗНА, в качестве клеток-мишеней — фракции клеток гепатомы Зайдела. Уровень естественной киллерной активности оценивали с помощью цитотоксического индекса (ЦИ), отражающего долю погибших клеток в процентах: ЦИ =  $(1 - n_o/n_k) \cdot 100$ , где  $n_o$  и  $n_k$  — число импульсов в опыте и контроле соответственно.

Пролиферативную активность определяли с помощью реагента CellTiter 96 Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega, США). Для этого по 0.1 мл суспензии клеток в культуральной среде (50 000 кл./мл) помещали в ячейки 96-луночных плоскодонных планшетов. Планшеты с клетками содержали в CO<sub>2</sub>-инкубаторе при 37 °C 2 сут, затем добавляли по 20 мкл реагента на лунку и спустя 2 ч инкубации в прежних условиях оценивали оптическую плотность раствора в лунках с помощью Titertek Multiskan (Финляндия) при длине волны 492 нм. Регистрируемая интенсивность окраски пропорциональна числу живых клеток.

Для определения количества связанных с поверхностью клетки ламинина выделяли плазматические мембранные клеток по описанному методу (Haeffner et al., 1980), оценивали концентрацию белка в препаратах мембран (Markwell et al., 1978), выравнивали препараты мембран по концентрации белка перед нанесением в лунки 96-луночного планшета и проводили иммуноферментный анализ с использованием антиламиининовой иммunoисыворотки (Тюряева и др., 2005).

Различия сравниваемых значений оценивали по *t*-критерию Стьюдента.

## Результаты и обсуждение

Асцитная гепатома Зайдела крысы представляет собой клеточные комплексы и отдельные клетки, растущие в сильно геморрагической асцитической жидкости. Число клеток в комплексах прямо пропорционально возрасту опухоли, исчисляемому с момента внутрибрюшинного введения (Gupta et al., 1985), и составляет от нескольких до десятков клеток. Клетки в комплексах соединяются преимущественно латерально-апикальными частями с формированием плотных контактов и десмосом, типичных для однослойных эпителиев (Gupta et al., 1985; Карапанова и др., 1987).

Спустя 1 сут после переноса отмытых от асцитической жидкости клеток гепатомы в среду DMEM мы наблюдали их разделение на две фракции. Клетки первой фракции (80—86 % клеток исходной гепатомы), названной нами F-фракцией (от float), флотируют в толще культуральной среды (рис. 1, *a*). Иногда они опускаются на дно культурального сосуда, но большей частью либо не прикрепляются, либо непрочно прикрепляются к нему. Клетки второй фракции (14—20 % клеток исходной гепатомы), названной нами S-фракцией (от substrate-adherent), прочно прикрепляются к поверхности культурального сосуда и(или) перемещаются по ней (рис. 1, *b*). Обе фракции имеют сложный клеточный состав, поэтому мы рассмотрим их по отдельности.

Клетки F-фракции. В первичной культуре наблюдаются одиночные и спаренные клетки, а также малоклеточные (3—10 клеток) и многоклеточные (десятка клеток) комплексы (рис. 1, *a*). Одиночные клетки, за редким исключением (амебоидные клетки с лобоподией, рис. 1, *a*), не содержат ламеллярных структур. Они могут примыкать к поверхности комплексов клеток и непрочно ассоциировать с ними. По данным DIC-анализа, такие одиночные клетки могут иметь либо округлую форму, либо уплощенную сверху и снизу форму. Скорее всего, как спаренные клетки, так и, по-видимому, основной состав малоклеточных комплексов сформированы дочерними клетками, которые остаются в ассоциации друг с другом после завершения митотического деления. Ассоциация клеток возникает за счет формирования прочных контактов между ними.

Диаметр округлых клеток варьирует от 15 до 19 мкм. Ядро овальное, располагается ближе к центру клетки. Цитоплазма гранулярная, ламеллярные структуры обычно не просматриваются. У небольшой части округлых клеток имеется развитая сеть длинных (6—8 мкм) микроворсинок. Поскольку круглые клетки в комплексах ассоциированы беспорядочно, то, скорее всего, и ветерено деления в них ориентировано случайным образом.

Большая часть малоклеточных комплексов первичной культуры гепатомы состоит из уплощенных клеток. Из-за большой протяженности зон контакта уплощенные клетки в кластерах приобретают полигональную в латеральном сечении форму. Путем аксиальных оптических срезов было установлено, что зона межклеточного контакта прерывается несколько ниже экватора клеток. Отсюда следует, что нижняя половина уплощенной клетки имеет форму перевернутого усеченного конуса. В целом весь кластер можно описать как однослойную плавающую пластинку, состоящую из латерально ассоциированных дочерних клеток. Такая форма кластера указывает на то, что веретено деления в уплощенных клетках всегда имеет латеральную ориентацию. Диаметр уплощенных клеток, по нашим данным, варьирует в пределах 14.5—23.0 мкм, однако у большинства из них он составляет 17.5—22.0 мкм. Цитоплазма всегда содержит многочисленные гранулы разного размера, ламеллярные структуры в ней не просматриваются. Эксцентрично расположеннное клеточное ядро имеет форму овала или бобовидную. У индивидуальных клеток в кластере ядро всегда располагается у наружной поверхности клетки, при этом с внутренней стороны клетки оно чаще всего содержит одну крупную, но не глубокую инвагинацию или несколько мелких инвагинаций. У некоторых уплощенных клеток в кластерах наблюдаются короткие (0.5—1.5 мкм) микроворсинки.

Многоклеточные комплексы клеток чаще всего представляют собой ассоциации мелких кластеров округлых и уплощенных клеток в разных пропорциях (рис. 1, *b*). Округлые клетки и их комплексы ассоциируют только с базальной и латеральной, но не апикальной поверхностью комплексов уплощенных клеток. Вместе с тем изредка встречаются крупные кластеры, которые сформированы только уплощенными клетками (рис. 1, *a*, врезка) и представляют собой скорее комплексы дочерних клеток, чем латеральные ассоциации мелких кластеров уплощенных клеток. Соотношение округлых и уплощенных клеток в F-фракции трудно оценить, но уплощенные клетки преобладают.

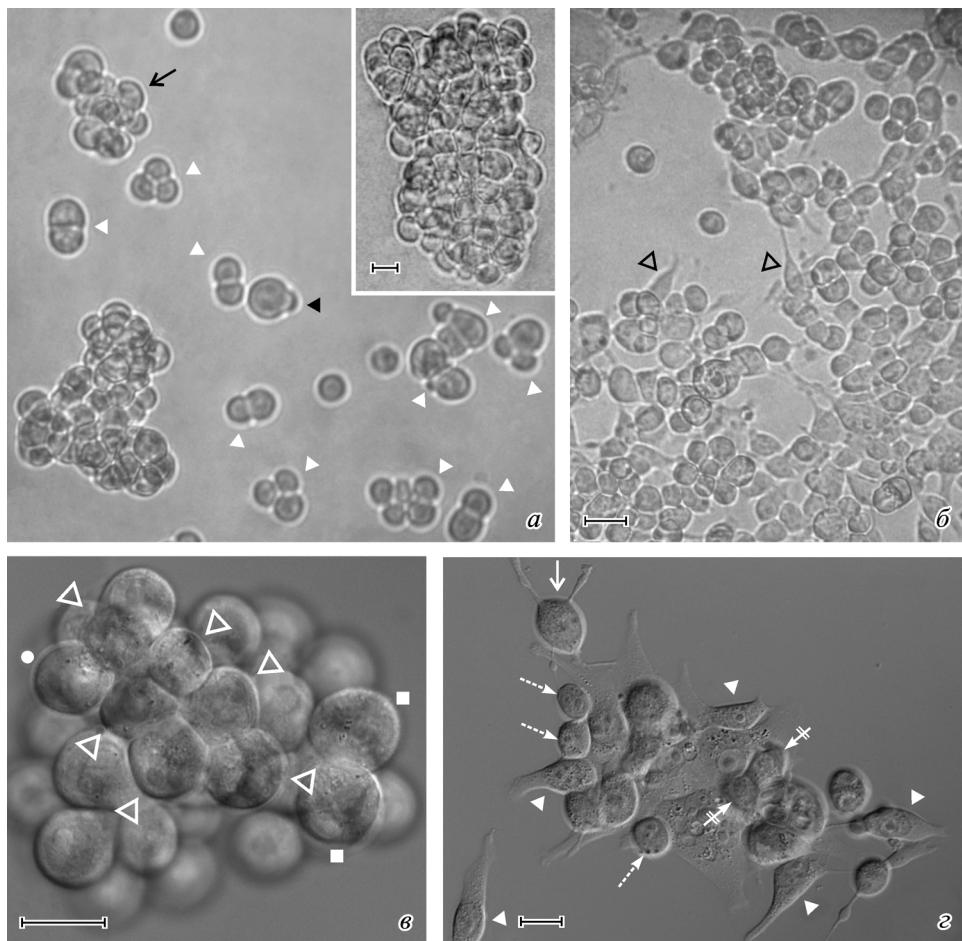


Рис. 1. Клетки гепатомы Зайделя. Первичная культура.

*a* — клетки F-фракции: белые треугольники указывают на комплексы уплощенных клеток, черным треугольником указана клетка с лобоподией, черной стрелкой отмечен комплекс, состоящий из округлых клеток, на врезке — многоклеточный комплекс состоящий из уплощенных клеток. *б* — клетки S-фракции, общий вид, прозрачными треугольниками указаны веретенообразные клетки. *в* — комплекс, состоящий из уплощенных и округлых клеток, треугольниками ограничен комплекс уплощенных клеток, квадратами указаны одиночные уплощенные клетки, круглым — округлая клетка. *г* — клетки S-фракции: уголок указывает на неподвижную сильно распластанную уплощенную клетку, штриховыми стрелками отмечены распластанные округлые клетки, стрелкой показана подвижная крупная округлая клетка с филоподиями, треугольниками отмечены подвижные веретенообразные клетки с филоподиями или ламеллоподиями, перечеркнутыми стрелками ограничена амебоидная клетка с лобоподией. Масштабные отрезки здесь и далее — 20 мкм.

**Клетки S-фракции.** Эта фракция представляет собой монослойный «газон» разных по форме клеток (рис. 1, *б*). Основу «газона» (около 90 % клеток) составляют описанные выше уплощенные клетки, но в распластанном виде. Иногда на периферии монослоя такие клетки могут сильно распластываться. В этом случае у них появляется широкий ламеллярный край, фронтальная часть которого, однако, не содержит ни микровыступов (*microspikes*), ни ламеллоподий (рис. 1, *г*). Судя по этим признакам (Small et al., 2002; Mondofacto, Medical dictionary: <http://www.mondofacto.com/dictionary>), при распластывании уплощенные клетки первичной культуры не приобретают никаких признаков псевдоподиальной активности. К числу неподвижных распластанных клеток можно отнести также встречающиеся на периферии монослоя одиночные округлые клетки, приобретающие при распластывании очертания овала (рис. 1, *б*, *г*). Ни одного случая сильного распластывания или появления ламеллярных структур у таких клеток мы не наблюдали.

Около 10 % прикрепляющихся клеток можно отнести к подвижным клеткам (рис. 1, *г*). Среди них чаще всего встречаются медленно ползущие клетки с филоподией

и (или) ламеллоподиями и клетки с несколькими филоподиями, которые принято считать распластывающимися (Васильев, 1996). Наиболее редко попадаются быстро ползущие амебоидные (по типу движения) клетки с лобоподией. Клетки, способные формировать филоподии, можно разделить на три морфотипа: крупные клетки со слабо распластанным округлым телом и гранулярной цитоплазмой (1), крупные (2) и мелкие (3) клетки с веретеновидным телом и соответственно с гранулярной и слабозернистой цитоплазмой (рис. 1, *г*).

Известно, что направление движения клетки совпадает с направлением филоподии (Mattila, Lappalainen, 2008). Используя этот признак, можно отследить предпочтительные миграции клеток разных типов. По нашим данным, клетки первого и третьего типов склонны примыкать к периферии монослоя и распластываться (рис. 1, *г*), тогда как гранулярные веретеновидные клетки, по-видимому, постоянно мигрируют. На всех полученных нами изображениях они со сходной частотой либо проникают внутрь монослоя, либо выползают из него (рис. 1, *г*). Очевидно, миграция всех типов подвижных клеток не ограничивается латеральными перемещениями, и они способны прони-

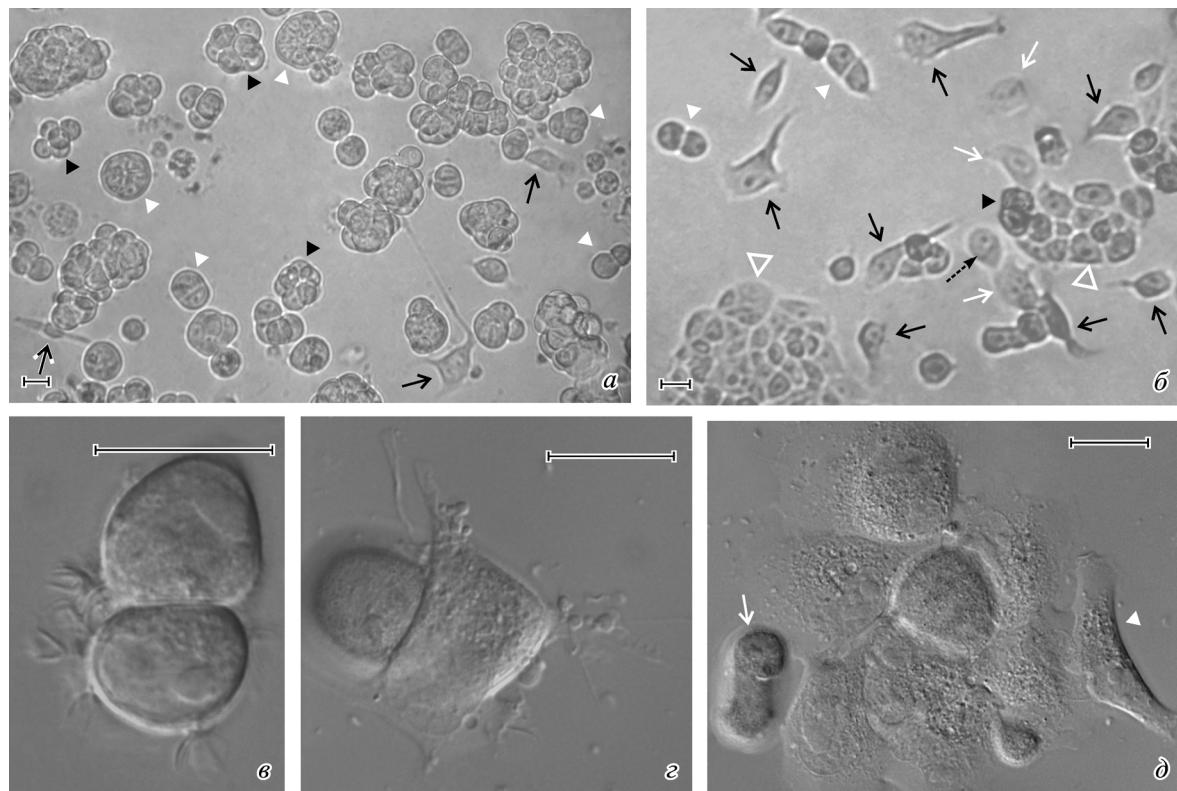


Рис. 2. Длительно культивируемые клетки гепатомы Зайдела.

*a* — клетки F-фракции: черными треугольниками указаны комплексы округлых клеток, белыми треугольниками — комплексы уплощенных клеток, стрелками показаны подвижные клетки. *б* — клетки S-фракции: белыми треугольниками обозначены спаренные уплощенные клетки, прозрачные треугольники указывают на кластеры уплощенных клеток, черными стрелками отмечены подвижные клетки, белыми стрелками — сильно распластанные уплощенные клетки, широкой стрелкой — клетка с лобоподией. *в* — спаренные уплощенные клетки с микровыступами. *г* — круглая клетка и наползающая на нее распластанная клетка. *д* — сильно распластанные уплощенные клетки, стрелкой указана амебоидная клетка, треугольником обозначена вертеноидная клетка.

кать в комплексы флотирующих клеток, временно контактирующих с поверхностью монослоя.

Долговременная селекция клеток F-фракции *in vitro*. Раздельное культивирование субпопуляции флотирующих клеток повлияли как на ее клеточный состав, так и особенно сильно на частоты встречаемости разных клеточных морфотипов, регистрируемых в первичной культуре (рис. 2, *а*). Так, в долговременных культурах исчезли клетки с микроворсинками, обычные для флотирующих клеток первичных культур. Соотношение уплощенных и округлых клеток в плавающих клеточных комплексах долговременных культур меняется в сторону преобладания округлых клеток и составляет  $\sim 1 : 9$ . Несмотря на отбор при культивировании только флотирующих клеток, постоянно наблюдается появление на дне культурального флякона прикрепленных клеток S-фракции. Среди таких клеток встречаются одиночные распластанные и ползающие клетки и (или) их небольшие кластеры.

Долговременная селекция клеток S-фракции *in vitro*. Клеточный состав этой фракции клеток совпадает с таковым у соответствующей фракции первичной культуры (рис. 2, *б*), но различается по пропорциональному соотношению. Так, если в первичной культуре обнаруживается значительное число одиночных округлых клеток, примыкающих к кластерам распластанных клеток или сидящих на их поверхности, то в долговременных культурах таких клеток почти нет. Изредка встречаются только несколько уплощенные округлые

клетки, на апикальную поверхность которых наползли подвижные клетки (рис. 2, *г*). Вместе с тем в долговременной культуре (по сравнению с соответствующей фракцией первичной культуры) минимум вдвое, а то и втрое возрастает встречаемость кластеров сильно распластанных уплощенных полигональных клеток (рис. 2, *д*). У таких клеток имеется широкий ламеллярный край, лишенный микровыступов (*microspikes*), что, как указано выше, говорит об отсутствии у них псевдоподиальной активности. Вместе с тем в рассматриваемых культурах в большом числе выявляются спаренные уплощенные клетки с типичными кластерами центростремительно ориентированных микровыступов, расположенных на периферии клетки (рис. 2, *в*). Это свидетельствует о том, что комплексы из двух дочерних уплощенных клеток в подобных долговременных культурах некоторое время (до последующих делений) могут проявлять псевдоподиальную активность.

Таким образом, в составе обеих фракций гепатомы Зайдела на разных сроках культивирования можно выделить два основных клеточных морфотипа — округлые и уплощенные клетки. Кроме того, среди клеток S-фракции еще обнаружены подвижные клетки. Часть из них может являться нормальными клетками мезенхимного происхождения животного-реципиента, например макрофагами.

Методом проточной цитометрии были оценены различия между клетками обеих фракций. Анализ содержания ДНК (рис. 3) показал, что клетки опухоли являются гипотетраплоидными. По количеству ДНК клетки обеих фракций первичной и долговременной культур раз-

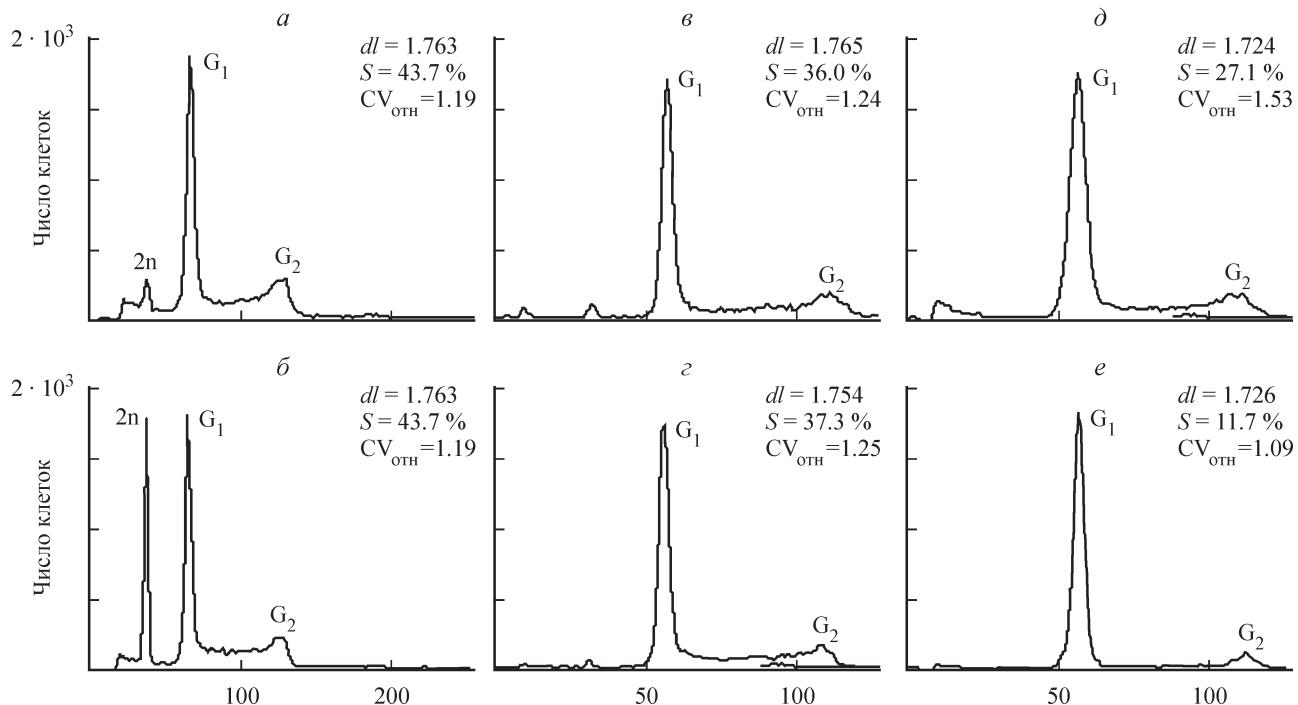


Рис. 3. Распределение клеток по содержанию ДНК. Данные проточной цитометрии.

*a* — клетки исходной не разделенной на фракции опухоли без добавления спленоцитов; *б* — клетки исходной не разделенной на фракции опухоли с добавлением спленоцитов; *в* — клетки S-фракции из первичной культуры опухоли (2 сут культивирования); *г* — клетки F-фракции из первичной культуры опухоли (2 сут культивирования); *д* — длительно культивируемые клетки S-фракции; *е* — длительно культивируемые клетки F-фракции. *dl* — индекс пloidности; *S* — доля клеток в фазе синтеза, %; *CV<sub>отн</sub>* — отношение коэффициента вариации пика G<sub>1</sub> опухолевых клеток к коэффициенту вариации пика G<sub>1</sub> нормальных клеток (спленоцитов) — оценка уровня гетерогенности основной популяции клеток (по относительной ширине пика G<sub>1</sub>).

личаются мало: индекс пloidности 1.763 — у клеток исходной асцитной гепатомы Зайдела, 1.765 — у клеток S-фракции, 1.754 — у клеток F-фракции первичной культуры опухоли и 1.724 — у клеток S-фракции, 1.726 — у клеток F-фракции после длительного культивирования. При этом следует отметить, что после длительного культивирования клетки утрачивают часть ДНК (1.6 % в F-фракции и 2.4 % в S-фракции). Исходя из показателей количества ядерной ДНК в фазе G<sub>1</sub> (размер генома) можно отметить, что длительное культивирование приводит к увеличению гетерогенности S-фракции (CV<sub>отн</sub> = 1.53) и уменьшению гетерогенности (практически к гомогенности) F-фракции (CV<sub>отн</sub> = 1.09). Это подтверждают и морфологические наблюдения, свидетельствующие о преобладании в F-фракции в данной культуре клеток одного типа — округлых.

Пролиферативная активность клеток, оцениваемая по доле клеток в S-фазе, наиболее высока в свежевыделенной не разделенной на фракции гепатоме — 43.7 % клеток. Спустя 1 сут у клеток обеих фракций в первичной культуре наблюдается равное понижение пролиферативной активности до 36—37 %. Длительное раздельное культивирование фракций приводит к замедлению пролиферации и к существенному различию фракций по этому параметру: доля клеток в S-фазе у флотирующих клеток составляет 11.7 %, а у прикрепленных — 27.1 %. Статистически достоверные различия ( $P < 0.001$ ) пролиферативной активности клеток на нескольких этапах культивирования фракций получены при использовании реактива CellTiter 96 Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay. Так, на 3-и сут культивирования показатели ростовой активности клеток S-фракции на 18 % выше, а на 4-и сут — на 23 % выше, чем клеток F-фракции. Показатели пролиферативной активности длительно культиви-

руемых клеток S-фракции в 2.3 выше, чем клеток F-фракции, что соответствует данным, полученным с помощью проточной цитометрии.

Нами было выявлено различие двух фракций клеток гепатомы Зайдела по количеству связанного с плазматической мембраной ламина. Ламинин 411/421 (8/9) был обнаружен и идентифицирован нами ранее (Тюряева и др., 2005) как мембранный гетероорганический антиген, ассоциированный с гепатоцеллюлярными опухолями крыс. При анализе количества мембрально-связанного ламина двух клеточных фракций гепатомы Зайдела было установлено, что и в случае первичной культуры, и после длительного культивирования количество ламина на поверхности клеток F-фракции больше, чем на клетках S-фракции (показатели оптической плотности для обеих фракций различаются на 33—34 %). Эти различия могут объясняться депонированием ламина в базально-латеральных «карманах» уплощенных клеток в комплексах, утратой части адсорбированного на пластике ламина при снятии прикрепленных клеток, а также различным уровнем экспрессии и активирования интегриновых рецепторов или других ламининсвязывающих белков и не отражать реальный уровень экспрессии данного гликопroteина клетками обеих фракций.

Различия клеток двух фракций гепатомы Зайдела были оценены по их чувствительности к лигандам действию естественных киллеров (ЕК). ЕК — это большие гранулярные лимфоциты системы врожденного (неспецифического) иммунитета, играющие важную роль в ранней фазе иммунного ответа против инфицированных вирусом и злокачественных опухолевых клеток сингенного, аллогенного и ксеногенного происхождения, а также контролирующие пролиферацию и дифференци-

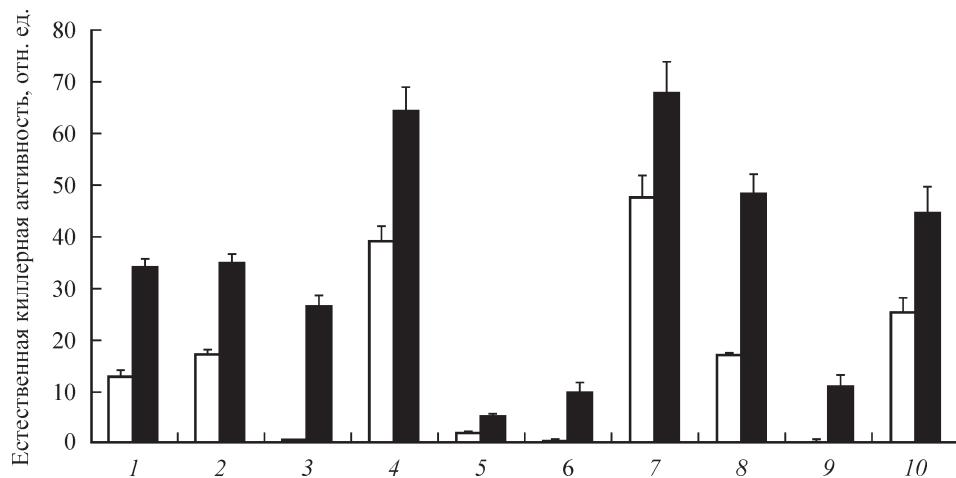


Рис. 4. Естественная киллерная активность по отношению к клеткам разных фракций гепатомы Зайдела при соотношениях эффекторов и мишеней 5 : 1 (белые столбки) и 20 : 1 (темные столбки).

1 — свежевыделенные клетки асцитной гепатомы, 2 — первичная не разделенная на фракции культура гепатомы, 3 — клетки F-фракции первичной культуры, 4 — клетки S-фракции первичной культуры, 5 — раздельно длительно культивируемые клетки F-фракции (все клетки — и флотирующие, и прикрепленные), 6 — раздельно длительно культивируемые клетки F-фракции, только флотирующие, 7 — раздельно длительно культивируемые клетки S-фракции (все клетки — и флотирующие, и прикрепленные), 8 — раздельно длительно культивируемые клетки S-фракции, только флотирующие, 10 — раздельно длительно культивируемые клетки S-фракции, только прикрепленные.

ровку нормальных клеток организма (Gismondi et al., 2004; Smyth et al., 2005; Caligiuri, 2008). В процессе возникновения и роста опухоли происходит, по-видимому, столкновение двух систем — гетерогенной популяции опухолевых клеток и множества субпопуляций естественных киллеров. В итоге, противодействуя росту опухоли, ЕК участвуют в отборе нечувствительных, наиболее злокачественных опухолевых клеток. Способность ЕК осуществлять цитотоксические функции определяется сложным комплексом активирующих и ингибирующих рецепторных сигналов, в том числе при участии адгезионных молекул, таких как интегрины и ламинин (Geberhiwot et al., 2001; Gismondi et al., 2004; Филатова и др., 2008). Тест-система с участием ЕК в качестве эффекторов и опухолевых клеток в качестве мишеней отражает уровень резистентности опухолевых клеток по отношению к ЕК, связанный с количественными и качественными особенностями репертуара поверхностных структур клетки-мишени. Среди спленоцитов ЕК составляют 5—15 % (Grimm, Bonavida, 1979; Mattes et al., 1979; Bowlin et al., 1990), и их наличие определяется в цитотоксическом тесте по функциональной активности.

Нами были выбраны два соотношения эффекторов и мишеней ( $\mathcal{E} : M$ ) — 5 : 1 и 20 : 1, демонстрирующие в экспериментах пропорциональное увеличение функциональной активности ЕК с увеличением их количества (рис. 4). По нашим данным, чувствительность клеток исходной перевивной гепатомы Зайдела и первичной культуры гепатомы *in vitro* к действию ЕК оказалась практически одинаковой: цитотоксический индекс (ЦИ), выражавшийся в доле погибших опухолевых клеток, составлял 34.2 и 34.8 % соответственно (здесь и далее сравниваются значения ЦИ при соотношении  $\mathcal{E} : M = 20 : 1$ ; рис. 4, столбцы 1, 2). Вместе с тем клетки обеих фракций гепатомы Зайдела различались между собой по этому признаку. Клетки F-фракции первичной культуры оказались гораздо менее чувствительными к действию естественных киллеров, чем клетки S-фракции, ЦИ составлял 26.6 и 64.8 % соответственно (рис. 4, столбцы 3, 4). Учитывая пропор-

цию этих клеточных фракций в исходной опухоли, расчетное совокупное значение ЦИ для обеих фракций сопоставимо со значением ЦИ для не разделенной на субпопуляции опухоли (около 32 % против экспериментально полученных 34.8 %).

При тестировании длительно культивируемых клеточных фракций гепатомы Зайдела мы обнаружили те же закономерности проявления активности естественных киллеров, что и в случае первичной культуры. Так, ЦИ для всей совокупности клеток, растущих в культивируемой отдельно нами F-фракции (в момент тестирования 63 % флотирующих клеток и 37 % прикрепляющихся клеток), составляет всего 5 %, при этом ЦИ для флотирующих клеток — 10 %, а для прикрепленного меньшинства — 68 % (рис. 4, столбы 5—7). Т. е. после длительного культивирования клетки F-фракции становятся еще менее уязвимыми к действию ЕК (что, возможно, связано с преобладанием «нечувствительных» округлых клеток), а чувствительность S-клеток меняется незначительно. Однако ЕКА в этой системе в целом оказывается меньше, чем в отношении наименее чувствительной субпопуляции. Такие результаты могут свидетельствовать о возможной секреции флотирующими клетками неких защитных факторов против ЕК, влияющих на резистентность опухоли в целом по отношению кенным эффекторам неспецифического иммунитета. При тестировании всей совокупности селекционируемых клеток S-фракции (в момент тестирования 83 % прикрепляющихся клеток и 17 % флотирующих клеток) ЦИ составляет 48.8 %, что близко к показателям ЦИ в отношении основной популяции — 44.7 % (рис. 4, столбы 8, 9). Чувствительность же клеток F-фракции в этой системе практически такая же, как и у клеток F-фракции в предыдущей системе, — 10.8 % (рис. 4, столбец 10). По-видимому, количество флотирующих клеток в данной культуре слишком мало, чтобы обеспечить какое-либо значимое снижение ЦИ в целом для совокупности всех клеток этой культуры. Таким образом, между клетками F-фракции и S-фракции выявлены различия, выражавшиеся в разной чувствительности к

действию ЕК: флотирующие клетки гораздо менее чувствительны, чем прикрепленные, а округлые клетки, по-видимому, и вовсе резистентны.

**Разделение клеток в градиенте Перколла.** Особенностью раздельного культивирования каждой фракции клеток является постоянное генерирование второй, «отсеиваемой», фракции. Так, через 2 сут после разделения клеток первичной опухоли на две фракции в разные чашки среди клеток F-фракции было обнаружено 14.9 % прикрепленных клеток, а в S-фракции — 31.4 % флотирующих клеток, собранных в комплексы. Такая способность сохраняется и у длительно культивируемых субпопуляций клеток гепатомы Зайдела. Подобное явление описывается в литературе, в том числе и для клеток гепатомы Зайдела крысы (Pande et al., 1986). Обнаруженные авторами две субпопуляции были выявлены разделением клеток асцитной гепатомы в градиенте Перколла и названы соответственно H-клетками (*heavy* — тяжелые, плавучая плотность 1.055—1.062 г/мл) и L-клетками (*light* — легкие, плавучая плотность 1.024 г/мл). L-клетки были охарактеризованы как покоящиеся (около 5 % делящихся клеток), а H-клетки — как пролиферирующие (54 % делящихся клеток), при этом только H-клетки обладали чувствительностью к колхицину. Клетки обеих фракций были тщательно разделены, что исключало взаимную контаминацию субпопуляций, однако индуцированные раздельно обеими субпопуляциями опухоли спустя 11—15 сут после прививки содержали клетки обоих типов, но не всегда. Было отмечено, что опухоли, развившиеся из L-клеток, могли и не восстановить субпопуляцию H-клеток (у 36 % крыс), в этом случае животные выживали, а опухоли со временем регрессировали. Генерирование L-клеток из H-клеток происходило быстрее, чем обратная конверсия.

Данные результаты инициировали сравнительный эксперимент, в котором мы определили плотность исследуемых нами клеток двух фракций. Из первичной культуры на 1—2-е сут культивирования были раздельно отобраны флотирующие и прикрепившиеся клетки, дезагрегированы в буфере для диссоциации и разделены в градиенте плотности Перколла. Клетки F-фракции образовывали видимый слой в области градиента, соответствующей плотности 1.020—1.022 г/мл, а клетки S-фракции — в области 1.057—1.062 г/мл. При этом надо отметить, что часть клеток распределялась по всей длине градиента между этими слоями. Наличие четко выраженных слоев в регистрируемых областях градиента позволяет предполагать, что большинство флотирующих клеток и прикрепляющихся клеток соответствуют описанным ранее L- и H-клеткам соответственно.

Может ли появление второй субпопуляции клеток гепатомы Зайдела (или клеток другой фракции — в нашем случае) быть объяснено взаимной конверсией клеток двух типов? Примером подобной конверсии *in vitro* может служить описываемая в литературе конверсия (трансдифференцировка) клеток двух типов, наблюдаемая в клеточных культурах нейробластом (Ross, 1983; Ciccarone et al., 1989; Foley et al., 1991; Ross et al., 1995; Gaitonde et al., 2001; Kubetzko et al., 2004). В нейробластомах человека и в клеточных культурах этой опухоли обнаруживаются клетки двух типов — нейробласти (N-клетки) и клетки-предшественники меланоцитов и глиальных (шванновских) клеток (S-клетки). N-клетки растут в виде слабо прикрепляющихся к субстрату агрегатов мелких округлых клеток с нейрональными отростками, синтезируют нейромедиаторные энзимы и маркеры нейрональных кле-

ток, они туморогенны, быстро пролиферируют в культуре и могут быть индуцированы к нейрональной дифференцировке. S-клетки — плоские, сильно прикрепляющиеся к субстрату, синтезируют белки, характерные для меланобластов, незрелых шванновских клеток, менингеальных или эктомезенхимальных гладкомышечных клеток. Большинство S-клеток имеет ограниченную продолжительность жизни и менее туморогенны (или нетуморогенны вовсе) в мышах линии *nude*. Разделенные субклонированием N- и S-клетки способны спонтанно преобразовываться друг в друга, являясь при этом генетически идентичными. При исследовании механизмов данного явления была выявлена третья субпопуляция клеток — I-клетки, оказавшиеся злокачественными мультипотентными стволовыми клетками нервного гребня, способными давать начало и N-клеткам, и S-клеткам (Ciccarone et al., 1989; Ross et al., 1995). Однако присутствие и дифференцировочные потенции I-клеток в клеточных культурах нейробластом человека не было связано с трансдифференцировкой субклонированных (отделенных от I-клеток) N- и S-клеток. Было выявлено, что процесс интерконверсии регулируется очень небольшим числом (если не одним) транскрипционных факторов, к числу которых принадлежит *N-myc*. От уровня его экспрессии в амплифицированных и не амплифицированных по *N-myc* линиях зависит клеточная морфология: в N-клетках больше мРНК *N-myc* и его продукта, в S-клетках — меньше (Foley et al., 1991). Кроме того, в этом процессе важную роль играет белок p53: при его инактивации N-клетки переходят в S-, а S-клетки утрачивают способность трансдифференцироваться в N-клетки (Gaitonde et al., 2001). Еще одним транскрипционным регулятором трансдифференцировки может быть онкоген *PAX5*, который экспрессируется только в N-клетках (Kubetzko et al., 2004). Однако некий элемент сомнения относительно конверсии этих двух клеточных типов вносят результаты другой работы (Cohen et al., 2003). На основании кариотипического анализа методами дифференциального окрашивания (G-banding) и спектрального кариотипирования (SKY) в хорошо изученной линии SK-N-SH, в клетках которой ранее не обнаруживали амплификации *N-myc*, было выявлено, что данная клеточная линия содержит клетки с 2 и 3 копиями *N-myc* (Sadée et al., 1987). В субклонированных линиях N-клеток содержалась незначительная примесь клеток с 2 копиями этого онкогена, а в S-клетках — примесь с 3 копиями, из чего был сделан вывод о том, что основой «трансдифференцировки» является клональная экспансия клеток одного типа над другим.

Другим примером конверсии служит клеточная линия XC крысы, происходящая от одиночной клетки, трансформированной вирусом саркомы Рауса (Horio et al., 1991). Эта линия характеризуется наличием клеток двух морфологически различных типов — толстых веретенообразных (L-тип) и плоских полигональных (R-тип). Клетки различаются уровнем экспрессии гена *v-src*. Повышенная экспрессия этого гена в клетках L-типа функционально выражается в их высокой туморогенности по сравнению с R-типом. Описываемые для линии XC морфотипы сходны с наблюдаемыми нами прикрепленными и подвижными клетками S-фракции гепатомы, которые также, вероятно, могут быть способны к взаимопереводам. Возможность же конверсии между округлыми и уплощенными клетками, с нашей точки зрения, очень маловероятна.

Таким образом, взаимное генерирование двух клеточных типов в составе культивируемых клеток опухоли может объясняться несколькими причинами. Наиболее про-

стым и наиболее вероятным способом восстановления опухолевых клеток одного типа из клеток другого типа является клональная экспансия минорной «примеси» в результате неполной селекции. Исходя из вышеизложенного следует признать, что наблюдаемое нами появление «отсевянной» клеточной фракции происходит, по-видимому, за счет наличия таких клеток (или клеток с потенцией к прикрепленному росту) в культивируемой фракции. Скорее всего, латерально-ассоциированные уплощенные флотирующие клетки способны прикрепляться к пластику. Этим объясняется преимущественное наличие округлых клеток F-фракции после длительного культивирования.

Таким образом, двумя основными клеточными типами, составляющими асцитную гепатому Зайделя, являются округлые и уплощенные клетки. Они способны ассоциировать друг с другом и между собой, а также прикрепляться к пластику. Уплощенные клетки создают структуру, подобную однослойному эпителию, и морфологически ближе всего к культивируемым эпителиальным клеткам (распластывающиеся клетки полигональной формы, образующие монослои в виде булыжной мостовой, — cobblestone). Предположительно от уплощенных клеток могут происходить подвижные одиночные клетки S-фракции, в пользу этого свидетельствует наличие спаренных уплощенных клеток с признаками псевдоподиальной активности. Безусловно, что часть одиночных подвижных клеток первичной культуры является нормальными диплоидными клетками животного-реципиента, в перitoneальном пространстве которого росла асцитная гепатома. По данным проточной цитометрии, доля таких диплоидных клеток в S-фракции первичной культуры составляет около 1.5 %, тогда как визуально наблюдаемая доля подвижных клеток в этой фракции — около 10 %. Тот факт, что после длительного культивирования диплоидные клетки в культуре не обнаруживаются, но подвижные одиночные клетки сохраняются, свидетельствует о том, что этот морфотип клеток является частью гепатомы Зайделя. Подвижные клетки с фибробластоподобной морфологией представляют собой завершенный эпителиально-мезенхимный переход (ЭМП). Однако признак реализации программы ЭМП — экспрессия виментина — наблюдается и в клетках гепатомы Зайделя, образующих комплексы (Караванова и др., 1987). Этот белок промежуточных филаментов клеток мезенхимного происхождения свойствен асцитным формам рака (Ramaekers et al., 1983). Экспрессия виментина эпителиальными клетками связана с нарушением нормальных межклеточных контактов и контактов с базальной мембраной, поэтому его появление можно наблюдать и в первичной культуре гепатоцитов (Караванова и др., 1985). ЭМП, как полагают, с одной стороны, способствует метастатическому процессу опухолевых клеток и, с другой стороны, придает им признаки (поверхностные маркеры, сигнальные пути) и свойства стволовых клеток (Christiansen, Rajasekaran, 2006; Mani et al., 2009). Поэтому предполагается, что ЭМП может осуществляться не только на поздних этапах опухолевой прогрессии при диссеминации опухоли, но и на начальном этапе канцерогенеза, в дифференцированной трансформированной клетке, благодаря чему она приобретает свойства, необходимые для осуществления последующих этапов формирования опухоли. Важно отметить, что между эпителиальной и мезенхимной клеточными программами существует обратимая конверсия. Исходя из этого существует также возможность того, что именно подвижные клетки (или один из их морфотипов) являются родо-

начальницами других типов клеток гепатомы (например, округлых и уплощенных клеток). С учетом их доли в данной опухоли (от общего количества клеток в обеих фракциях около 2 %) они могут представлять собой популяцию опухолевых стволовых клеток и поддерживать иерархическую модель опухоли, но при условии, что остальные клеточные типы не способны образовывать колонии. Однако на основании наших и литературных данных мы полагаем, что в гепатоме Зайделя большинство клеток, хотя и с разными потенциями, способно к самообновлению, что соответствует стохастической модели или комбинированной модели (см. обзор: Adams, Strasser, 2008). Для подтверждения выдвинутых предположений в дальнейшем необходимо провести субклонирование клеточных типов данной опухоли, кариотипический анализ, анализ экспрессии специфических маркеров и туморогенности клеток субпопуляций.

Авторы выражают благодарность С. О. Скарлато за техническую поддержку работы.

### Список литературы

- Васильев Ю. В. 1996. Клетка как архитектурное чудо. I. Живые нити. Сорос. общеобразоват. журн. 2 : 36—43.
- Демин С. Ю. 2003. Основные типы и жизненные формы периферических и ФГА-стимулированных лимфоцитов человека, выявляемые *in vitro*. Цитология. 45 (6) : 535—547.
- Караванова И. Д., Банников Г. А., Троянский С. М. 1985. Различия в экспрессии прекератина и виментина в органной и монослойной культурах гепатоцитов крысы. Цитология. 27(9) : 1039—1043.
- Караванова И. Д., Троянский С. М., Банников Г. А. 1987. Экспрессия виментина и прекератинов в солидных и асцитных вариантах гепатомы Зайделя. Бюл. экспер. биол. мед. 103 (4) : 462—466.
- Тюряева И. И., Миргородская О. А., Черепанова О. А., Подольская Е. П., Новиков А. В., Ходорковский М. А., Иванов В. А. 2005. Выявление и идентификация ламина в составе плазматических мембран клеток асцитной гепатомы Зайделя крысы. Цитология. 47 (2) : 150—162.
- Филатова Н. А., Тюряева И. И., Иванов В. А. 2008. Распознавание и лизис естественными киллерами опухолевых клеток при участии ламина. Цитология. 50 (1) : 72—78.
- Adams J. M., Strasser A. 2008. Is tumor growth sustained by rare cancer stem cells or dominant clones? Cancer Res. 68 : 4018—4021.
- Bowlin T. L., Rosenberger A., Stemmerick D., Edwards M. L. 1990. Potentiation of natural killer cell activity and tumor immunity by diacetylputrescine. Cancer Res. 50 : 5460—5463.
- Caligiuri M. A. 2008. Human natural killer cells. Blood. 112 : 461—469.
- Campbell L. L., Polyak K. 2007. Breast tumor heterogeneity: cancer stem cells or clonal evolution? Cell Cycle. 6 : 2332—2338.
- Christiansen J. J., Rajasekaran A. K. 2006. Reassessing epithelial to mesenchymal transition as a prerequisite for carcinoma invasion and metastasis. Cancer Res. 66 : 8319—8326.
- Ciccarone V., Spengler B. A., Meyers M. B., Biedler J. L., Ross R. A. 1989. Phenotypic diversification in human neuroblastoma cells: expression of distinct neural crest lineages. Cancer Res. 49 : 219—225.
- Cohen N., Betts D. R., Rechavi G., Amariglio N., Trakhtenbrot L. 2003. Clonal expansion and not cell interconversion is the basis for the neuroblast and nonneuronal types of the SK-N-SH neuroblastoma cell line. Cancer Genet. Cytogenet. 143 : 80—84.
- Dalerba P., Cho R. W., Clarke M. F. 2007. Cancer stem cells: models and concepts. Annu. Rev. Med. 58 : 267—284.
- Dick J. E. 2008. Stem cell concepts renew cancer research. Blood. 112 : 4793—4807.
- Foley J., Cohn S. L., Salwen H. R., Chagnovich D., Cowan J., Mason K. L., Parysek L. M. 1991. Differential expression of N-myc

- in phenotypically distinct subclones of a human neuroblastoma cell line. *Cancer Res.* 51 : 6338—6345.
- Gaitonde S. V., Qi W., Falsey R. R., Sidell N., Martinez J. D. 2001. Morphologic conversion of a neuroblastoma-derived cell line by E6-mediated p53 degradation. *Cell Growth Differ.* 12 : 19—27.
- Geberhiwot T., Assefa D., Kortesmaa J., Ingerpuu S., Pedraza C., Wondimu Z., Charo J., Kiessling R., Virtanen I., Tryggvason K., Patarroyo M. 2001. Laminin-8 (alpha4beta1gamma1) is synthesized by lymphoid cells, promotes lymphocyte migration and costimulates T cell proliferation. *J. Cell Sci.* 114 : 423—433.
- Gismondi A., Cifaldi L., Mazza C., Giliani S., Parolini S., Morrone S., Jacobelli J., Bandiera E., Notarangelo L., Santoni A. 2004. Impaired natural and CD16-mediated NK cell cytotoxicity in patients with WAS and XLT: ability of IL-2 to correct NK cell functional defect. *Blood.* 104 : 436—443.
- Grimm E., Bonavida B. 1979. Mechanism of cell-mediated cytotoxicity at the single cell level. I. estimation of cytotoxic T lymphocyte frequency and relative lytic efficiency. *J. Immunol.* 123 : 2861—2869.
- Gupta P. D., Kumar G. K., Khar A. 1985. Cell to cell association in Zajdela ascitic hepatoma. An ultrastructural study. *J. Submicr. Cytol.* 17 : 421—427.
- Haeffner E. W., Kolbe K., Schroeter D., Paweletz N. 1980. Isolation of a light and a heavy membrane-fraction of the glucose-free Ehrlich—Lettre substan. *Biochim. biophys. acta.* 603 : 36—51.
- Horio K., Yoshikura H., Kawabata M., Odawara T., Sudo K., Fujitani Y., Lee G., Iwamoto A. 1991. Epigenetic control of tumor cell morphology. *Jpn. J. Cancer Res.* 82 : 676—685.
- Kubetzko F. B. B., Paolo C., Maag Ch., Meier R., Schafer B. W., Betts D. R., Stahel R. A., Himmelman A. 2004. The PAX5 oncogene is expressed in N-type neuroblastoma cells and increases tumorigenicity of a S-type cell line. *Carcinogenesis.* 25 : 1839—1846.
- Maenhaut C., Dumont J. E., Roger P. P., van Staveren W. C. G. 2010. Cancer stem cells: a reality, a myth, a fuzzy concept or a misnomer? An analysis. *Carcinogenesis.* 31 : 149—158.
- Mani S. A., Evans K. W., Hollier B. G., Guo W., Weinberg R. A. 2009. Generation of stem-like cells via EMT: a new twist in cancer initiation and progression. *Amer. Assoc. Cancer Res. Educ. Book.* 173 — 178. doi: 10.1158/AACR.EDB-09-7996.
- Markwell M. A. K., Haas S. V., Bieber L. L., Tolbert N. E. 1978. A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples. *Anal. Biochem.* 87 : 206—210.
- Mattes M. J., Sharroo S. O., Herberman R. B., Holden H. T. 1979. Identification and separation of Thy-1 positive mouse spleen cells active in natural cytotoxicity and antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity. *J. Immunol.* 123 : 2851—2860.
- Mattila P. K., Lappalainen P. 2008. Filopodia: molecular architecture and cellular functions. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 9 : 446—454.
- Pande G., Joshi D. S., Sundaram K., Das M. R. 1986. Isolation and characterization of the two subpopulations of cell with different lethaliites from Zajdela ascitic hepatoma. *Cancer Res.* 46 : 1673—1678.
- Ramaekers F. C. S., Haag D., Kant A., Moesker O., Jap P. H. K., Vooij G. P. 1983. Coexpression of keratin- and vimentin-type intermediate filaments in human metastatic carcinoma cells. *PNAS.* 80 : 2618—2622.
- Ross R. A. 1983. Coordinate morphological and biochemical interconversion of human neuroblastoma cells. *J. Nat. Cancer Inst.* 71 : 741—747.
- Ross R. A., Spengler B. A., Domenech C., Porubcin M., Retting W. J., Biedler J. L. 1995. Human neuroblastoma I-type cells are malignant neural crest stem cells. *Cell Growth Differ.* 6 : 449—456.
- Sadee W., Yu V. C., Richards M. L., Preis P. N., Schwab M. R., Brodsky F. M., Biedler J. L. 1987. Expression of neurotransmitter receptors and myc protooncogenes in subclones of a human neuroblastoma cell line. *Cancer Res.* 47 : 5207—5212.
- Small J. V., Stradal T., Vignal E., Rottner K. 2002. The lamellipodium: where motility begins. *Trends Cell Biol.* 12 : 112—120.
- Smyth M. J., Cretney E., Kelly J. M., Westwood J. A., Strelet S. E., Yagita H., Takeda K., van Dommelen S. L., Degli-Esposti M. A., Hayakawa Y. 2005. Activation of NK cell cytotoxicity. *Mol. Immunol.* 42 : 501—10.
- Wang J. C., Dick J. E. 2005. Cancer stem cells: lessons from leukemia. *Trends Cell. Biol.* 15 : 494—501.
- Wicha M. S., Liu S., Dontu G. 2006. Cancer stem cells: an old idea — a paradigm shift. *Cancer Res.* 66 : 1883—1890.

Поступила 12 III 2010

## MORHOLOGICAL AND FUNCTIONAL HETEROGENEITY OF RAT ASCITIC HEPATOMA ZAJDELA CELLS

I. I. Tiuriaeva,<sup>1</sup> N. A. Filatova, Yu. M. Rozanov, S. Yu. Demin, G. I. Blinova, V. A. Ivanov

Institute of Cytology RAS, St. Petersburg; <sup>1</sup> e-mail: tii@mail.cytspb.rssi.ru

This work is devoted to the study of molecular and cellular mechanisms of disdifferentiation during neoplastic transformation of cells by investigating the malignant tumor cell heterogeneity. We have revealed two cell fractions of hepatoma Zajdela which differ in patterns of growth in primary culture. The cells of one fraction were attached to the culture plastic and grew in a monolayer (S-fraction), whereas cells of another fraction floated in the culture medium (F-fraction). Using method of lifetime supervision of primary culture cells (1—2 passages) at the limit of the resolving power of DIC-microscopy it has been revealed, that both fractions contain cells of several types. Some of them were specific for one of the fractions, and others were found in both fractions, but their frequencies differed. It has been shown by the same method, that long separate cultivation of these fractions *in vitro* (more than 50 passage) change both cellular structure and the initial ratio of different types of cells in both fractions. According to DNA flow cytometry, the cells of both fractions were hypotetraploid and had insignificant differences in DNA contents. After adaptation to *in vitro* conditions, S-fraction cells raised their proliferative activity in comparison with the F-fraction cells, and after long cultivation showed 2.3 times higher DNA content. Greater amount of cell surface laminin, a hepatocellular carcinoma marker, was observed on F-fraction cells than on S-fraction cells. Interfractional distinctions were confirmed also by immunologic assessment of hepatoma cells resistance to natural killer lyses: the sensitivity of S-fraction cells in primary culture was 2.4 times higher than F-fraction cells sensitivity, and, after long cultivation, F-fraction cells became practically resistant to cytotoxic action of natural killers. Based on the data obtained, the most probable paths of cell disdifferentiation during hepatoma Zajdela formation and during long cultivation of this tumor cells *in vitro* are discussed.

**Key words:** tumor cell fractions, DNA flow cytometry, tumor heterogeneity, natural killer, hepatoma Zajdela.