

ПОЛУЧЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА КЛОНАЛЬНЫХ ЛИНИЙ МОНОСЛОЙНОЙ ГЕПАТОМЫ ЗАЙДЕЛА С ПРИЗНАКАМИ ОПУХОЛЕВЫХ СТВОЛОВЫХ И ПРОГЕНИТОРНЫХ КЛЕТОК

© Н. П. Терюкова,¹ Е. И. Сахенберг, В. А. Иванов, С. А. Снопов¹

*Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, 194064;
¹электронный адрес: npter@yandex.ru; snopov@hotmail.com*

Целью нашего исследования является изучение биологии опухолевых стволовых клеток (ОСК) метастатической асцитной гепатомы Зайдела крысы. Настоящая работа выполнена на клетках монослойной линии, выделенной после эксплантации в культуру *in vitro* клеток асцитной формы опухоли. Мы клонировали клетки методом предельных разведений и получили клоны, различающиеся по морфологии колоний, из которых три голоклона и два мероклона дали начало соответствующим клональным сублиниям. Голоклоны и мероклоны происходят от опухолевых стволовых клеток (ОСК) и опухолевых прогениторных клеток (ОПК) ранней стадии соответственно (Locke et al., 2005). После длительного пассирования в культуре только клетки голоклональных сублиний проявляли ключевой признак ОСК — способность инициировать *in vivo* асцитную гепатому; при реклонировании в полной ростовой среде они продуцировали преимущественно голоклоны, а в бессывороточной среде — крупные неприкрепляющиеся гепатосферы. Клетки голо- и мероклональных сублиний различались по морфологии и площади клеток, по размеру ядер и ядерно-цитоплазматическому отношению, по скорости пролиферации. Мы впервые обнаружили, что клетки голоклональных сублиний гепатомы Зайдела имели фибробластоподобную морфологию и при формировании рыхлого монослоя контактировали друг с другом за счет цитоплазматических отростков. Мы предполагаем, что особенности развития голоклонов монослойной гепатомы Зайдела и фибробластоподобная морфология ОСК являются атрибутами метастатической опухоли и свидетельствуют о способности этих клеток к индивидуальной миграции.

Ключевые слова: гепатома, опухолевые стволовые клетки, клонирование, голоклоны, мероклоны, метастазирование.

Принятые сокращения: ОПК — опухолевые прогениторные клетки, ОСК — опухолевые стволовые клетки, СК — стволовые клетки, ЯЦО — ядерно-цитоплазматическое отношение, 1Е, 3Н, 5F, 6Н, 8С, 9С — обозначения клонов.

Иерархическая модель организации опухолей позволяет предполагать существование в опухолях небольшой субпопуляции клеток, обладающих характеристиками стволовых клеток (stem-like cells) и получивших название ОСК или опухолеиницилирующих клеток (Visvader, Lindeman, 2008; Maenhaut et al., 2010). Подобно соматическим стволовым клеткам (СК) опухолевые стволовые клетки характеризуются способностью к асимметричному делению, в результате которого одна дочерняя клетка сохраняется в пуле низкодифференцированных стволовых клеток, тогда как другая дает начало клеткам-предшественникам — опухолевым прогениторным клеткам — переходным умножающимся (transit amplifying) клеткам с разным уровнем дифференцировки. Только ОСК считаются «драйверами» опухолевого роста и опухолевой прогрессии, тогда как ОПК обеспечивают массу опухоли и гетерогенность ее клеточного состава.

Если ключевым свойством соматической СК (согласно многочисленным исследованиям «стволовости») является мультипотентность, т. е. способность давать начало множеству типов нормальных дифференцирующихся

клеток, то ключевым свойством ОСК является их способность инициировать опухоль при обязательном наличии у ОСК всех признаков, характерных для нормальной СК, и при наличии экспрессии маркеров нормальных СК (Oliver et al., 2004; Singh et al., 2004; Fomchenko et al., 2005). Исходя из такого определения термином ОСК предложено называть клетку, способную дать рост опухоли (Al-Hajj et al., 2004; Oliver et al., 2004; Dalerba et al., 2007; Zheng et al., 2007). О стволовости (мультипотентности) соматических СК принято судить не только по способности дифференцироваться в клетки различных тканей, но и по косвенным признакам, в первую очередь по наличию молекулярных маркеров, выявляемых с помощью соответствующих антител. А стволовость ОСК доказывается только прямым способом — по их туморогенности, т. е. способности инициировать образование опухоли *in vivo*.

Тем не менее для обнаружения и выделения клеточных субпопуляций, обогащенных ОСК, наряду с туморогенностью применяются и другие, косвенные признаки стволовости, в числе которых экспрессия поверхностных

маркеров, характерных для стволовых (прогениторных) клеток, эксклюзия липофильных флуоресцентных красителей из цитоплазмы клеток боковой популяции с фенотипическими признаками ОСК, выявляемой проточной цитометрией, формирование туморосфер (неприкрепляющихся клонов) в бессывороточной среде и голоклонов при клонировании клеток в полной питательной среде (Chiba et al., 2006; Uchida et al., 2010; Лупатов и др., 2013).

Термины «голоклон» (holoclone), «мероклон» (meroclone) и «параклон» (paraclone) были предложены для обозначения трех типов колоний, образующихся при клонировании кератиноцитов человека и различающихся по морфологии и пролиферативному потенциалу (Barrandon, Green, 1987). Формирование голо-, меро- и параклонов обнаружено и при клонировании ряда клеточных линий опухолей эпителиального происхождения (Locke et al., 2005; Li et al., 2008; Pfeiffer, Schalken, 2010; Doherty et al., 2011; Kalirai et al., 2011; Tan et al., 2011; Yao et al., 2013). Предполагается, что голоклоны происходят от стволовой клетки, а мероклоны и параклоны — от переходных умножающихся клеток-предшественников ранней и поздней стадий соответственно.

Существует мнение, что популяции голоклонов и мероклонов опухолевых клеток могут различаться между собой лишь долей ОСК, а не их отсутствием и что в опухолях свойства СК могут появляться у клеток более низкого уровня иерархии, т. е. у более дифференцированных клеток, в результате чего переходные умножающиеся клетки могут приобретать свойства ОСК (Beaver et al., 2014).

В наших исследованиях механизмов опухолевой прогрессии и метастазирования, в том числе для выявления субпопуляций метастатических ОСК и их характеристики, мы использовали перевиваемую асцитную гепатому Зайдела. Особенностью данной опухоли является высокая частота метастазирования в паратрахеальные лимфатические узлы; метастазы этой локализации выявляются у 90—100 % животных (Киселева и др., 1972).

Ранее мы получили две клеточные линии гепатомы Зайдела — суспензионную, представленную флотирующими многоклеточными островками, и монослойную (Терюкова и др., 2013). По сравнению с флотирующими островками клетки монослойной линии обладали меньшей туморогенностью и более высоким уровнем цитодифференцировки. При клонировании клеток суспензионной линии методом предельных разведений была выявлена морфологическая гетерогенность полученных клонов, причем вместо классических голоклонов мы впервые наблюдали формирование туморогенных неприкрепляющихся сферических клонов в полной ростовой среде, а также меро- и параклонов.

В настоящей работе мы продолжили изучение гетерогенности клеточного состава и клеточной организации метастатической перевиваемой гепатомы Зайдела — теперь на ее монослойной клеточной линии. Задачи работы заключались в проведении клонального анализа этой линии с помощью метода предельных разведений, получения и сравнительной характеристике клеточных субпопуляций с признаками ОСК и ОПК.

Материал и методика

Монослойная линия клеток крысиной гепатомы Зайдела выделена нами из клеток перевиваемой асцитной гепатомы Зайдела (штамм С) путем длительного отбора

прикрепляющихся клеток от флотирующих многоклеточных островков. Клетки культивировали в среде DMEM (Биолот, Россия), содержащей 10 % сыворотки плодов коровы Sus-Biol (Биолот, Россия) и 80 мкг/мл гентамицина, в атмосфере 5 % CO₂ при 37 °С.

Клонирование клеток монослойной линии проводили методом предельных разведений (Zheng et al., 2007; Li et al., 2008). Готовили клеточную суспензию, содержащую 50—70 клеток в 10 мл полной среды DMEM (Биолот, Россия), и вносили по 0.1 мл в лунки 96-луночного плоскодонного планшета (Orange Scientific, Бельгия). На 2-е сут планшеты просматривали с помощью инвертированного микроскопа ЛОМО Биолам П-1 (Санкт-Петербург, Россия), используя объективы с увеличением 2.5×, 6.3× или 10×, и отмечали лунки, содержащие единичную клетку. Наблюдение за ростом клонов проводили в течение 2—3 нед. Фотографировали клетки в планшетах через окуляр (6.3×) инвертированного микроскопа с помощью цифровой камеры Canon PowerShot A1100 IS с оптическим зумом 4×. По мере разрастания клонов клетки переносили в лунки 24-луночных планшетов и далее в чашки Петри (Orange Scientific, Бельгия).

Туморогенность (опухоленицирующую способность) клеточных линий определяли в экспериментах *in vivo* на беспородных крысах-самцах массой 180—200 г (питомник Рапполово РАМН). Клетки снимали с пластика с помощью 0.02%-ного раствора версена (Биолот, Россия), осаждали путем центрифугирования в течение 5 мин при 1000 об/мин, суспендировали в среде DMEM и вводили животным внутривентриально в количествах, обычно используемых нами в течение многих лет ведения перевиваемой асцитной гепатомы Зайдела, т. е. (12—20) · 10⁶ на 1 крысу.

Тест на сферообразование проводили в бессывороточной среде DMEM/F12 (Sigma-Aldrich, США), содержащей крысиные рекомбинантные факторы роста EGF (20 нг/мл), FGF (10 нг/мл) (BioVision Inc., США) и 2 % добавки B27 без витамина А (Life Technologies, США). Клетки голоклональных (3Н и 6Н) и мероклональных (1Е и 9С) сублиний гепатомы Зайдела сеяли в чашки Петри диаметром 60 мм из расчета 50 клеток на чашку (т. е. с низкой клональной плотностью) и образующиеся из отдельных клеток неприкрепляющиеся клоны (сферы) на 8-е сут фотографировали. Наблюдения продолжали в течение 15 сут.

Реклонирование клеток полученных нами клональных сублиний в полной питательной среде проводили при клональной (низкой) плотности посева. Для этого клетки каждой сублинии сеяли в две чашки Петри диаметром 60 мм из расчета 200 клеток на чашку. На 8-е сут образовавшиеся клоны фиксировали смесью Никифорова (этанол с диэтиловым эфиром в соотношении 1 : 1) в течение 15 мин и окрашивали гематоксилином (20 мин) и 0.3%-ным эозином (15 с), хорошо промывая клетки после каждой процедуры. Фотографировали клоны в чашках Петри, как описано выше.

Пролиферативную активность клеток оценивали с помощью колориметрического MTS-теста (по восстановлению тетразолия). Для этого клетки суспендировали в полной питательной среде и вносили по 0.1 мл суспензии (5 · 10⁴ кл./мл) в лунки трех плоскодонных 96-луночных планшетов; клетки каждого образца сеяли в четырех повторах. Планшеты содержали в 5%-ной атмосфере CO₂-инкубатора при 37 °С. Через 24 ч в лунки первого планшета добавляли по 20 мкл реагента CellTiter 96

aqueous one cell proliferation assay (Promega, США) и через 1.5 ч с помощью фотометра с вертикальным лучом (Titertek Multiskan, Финляндия) определяли оптическую плотность среды каждой лунки (при 492 нм), которая пропорциональна содержанию живых клеток, восстанавливающих тетразолий до растворимого окрашенного формазана. Измерения оптической плотности среды в лунках остальных планшетов проводили последовательно через 48 и 72 ч после посева и на основании полученных данных строили гистограммы роста клеток.

Для морфометрического анализа клетки выращивали на покровных стеклах и окрашивали гематоксилином и эозином, как описано выше. Препараты обезвоживали в 96%-ном спирте в течение 15 с, заключали в глицерин и исследовали с помощью микроскопа LSM 5 Pascal (Carl Zeiss, Германия) при увеличении объектива 10× или 40×. Площадь окрашенных ядер и клеток оценивали в пикселях с помощью программы анализа изображений ImageJ (НИН, США). Ядерно-цитоплазматическое отношение (ЯЦО) для каждой клетки рассчитывали как отношение площади ядра к разнице между площадью клетки и площадью ядра. В каждой клональной линии оценивали не менее 100 клеток.

Статистическую обработку данных проводили с использованием программы Microsoft Excel Started 2010: определяли среднее значение, стандартное отклонение и ошибку среднего. Достоверность различий между линиями рассчитывали с помощью *t*-критерия Стьюдента. Различия считали достоверными при $P < 0.05$.

Результаты

Клонирование клеток монослойной линии гепатомы Зайдела методом предельных разведений. Наблюдение за формированием клонов проводили в тех лунках 96-луночного планшета, в которых на следующие сутки после посева обнаруживали 1 клетку. Из 14 одиночных клеток только 7 клеток оказались клоногенными и индуцировали развитие клонов трех типов — голо-, меро- и параклонов; этим клоном мы присвоили цифро-буквенное обозначение в соответствии с координатами лунки. На 6—8-е сут после посева клоны 3Н (рис. 1, а, б) и 6Н (рис. 1, и, к) имели характерную для голоклонов морфологию компактных округлых образований (подобных бляшкам) с четко очерченной границей, состоящих из однотипных, плотно упакованных мелких клеток. Клон 5F, который на начальных этапах имел сходную морфологию с клонами 3Н и 6Н, постепенно менял форму и плотность расположения клеток (рис. 1, д, е). На 10—13-е сут все три голоклона имели более плотную сердцевину, по периферии которой располагались хаотично расположенные одиночные клетки с цитоплазматическими отростками (рис. 1, в, г, ж, з, л, м). Три других клона — 1Е, 8С, 9С — представляли собой мероклоны и отличались неправильной формой колоний с изрезанной пограничной линией, что связано с неоднородностью их клеточного состава (рис. 2, а—г). Еще один клон 1F состоял из почти не контактировавших между собой клеток с низкой скоростью пролиферации и по всем признакам соответствовал параклонам, клетки которых после ряда пассажей в культуре погибают.

Клетки клонов 1Е, 3Н, 5F, 6Н и 9С (8С погиб по техническим причинам) многократно пассировали и подвергали неоднократному криоамораживанию с последую-

щим культивированием. В результате нами были получены пять клональных монослойных сублиний гепатомы Зайдела, происходящих от клеток-прародительниц клонов с разным уровнем цитодифференцировки: три сублинии, полученные из голоклонов, — 3Н, 5F и 6Н, и две сублинии, ведущие начало от клеток мероклонов, — 1Е и 9С. По данным из литературы, голоклональные сублинии должны содержать ОСК, а мероклональные — представлять собой популяцию ранних переходных умножающихся клеток (Locke et al., 2005; Li et al., 2008; Tan et al., 2011). Подтверждение этому мы получили в наших следующих экспериментах.

Определение туморогенности клональных линий в экспериментах *in vivo*. Туморогенность клеточных линий является основным доказательством присутствия в их составе субпопуляции ОСК. Чаще всего тест на туморогенность проводят на иммунодефицитных бестимусных голых мышах. Туморогенность всех клеточных линий, полученных из клеток асцитной гепатомы Зайдела, мы определяли на беспородных крысах-самцах с нормальной иммунной системой, ответ которых на введение опухолевых клеток гипотетически может варьировать в большей степени, чем у линейных иммунодефицитных животных.

Как следует из данных, представленных в таблице, введение клеток голоклональных сублиний 3Н, 5F и 6Н в брюшную полость крыс приводило к гибели примерно 40—50 % животных вследствие развития геморрагического асцита, содержащего характерные для асцитной гепатомы многоклеточные флотирующие островки (рис. 3). Введение клеток мероклональных сублиний 1Е и 9С не приводило к такому исходу.

Факт инициирования *in vivo* асцитной формы опухоли клетками сублиний 3Н, 5F, 6Н и родительской монослойной линии (Терюкова и др., 2013) указывает на то, что эти линии несомненно содержат ОСК, в то время как в сублиниях 1Е и 9С или совсем нет ОСК, или их количество является недостаточным для опухолеобразования.

Анализ клональных линий на присутствие ОСК: тестирование на стволовость *in vitro*. Длительное поддержание в культуре низкодифференцированных клеток голоклонов и мероклонов может привести либо к их аномальной дифференцировке, либо к другим изменениям клеточного состава, связанным с адаптацией популяции к условиям культивирования. Для подтверждения того, что на данном этапе становления наших клональных сублиний их клеточный состав соответствует характеристикам клеток-прародительниц клонов и того, что голоклональные сублинии обогащены ОСК, мы провели два общепринятых теста — на образование сферических колоний и на образование голоклонов. Тест на образование сферических колоний в бессывороточной среде традиционно используется для выявления СК в составе клеточных популяций (Kukekov et al., 1997). А тест на голоклоны получил распространение в качестве замещающего (surrogate) теста на стволовость в исследованиях на линиях опухолевых клеток (Tan et al., 2011).

При культивировании нами клеток клональных сублиний в бессывороточной среде на 8-е сут после посева во всех чашках присутствовали гепатосферы, т. е. флотирующие колонии клеток, выросшие из одной опухолевой клетки со свойствами СК. Сферы, образованные клетками голоклональных сублиний, варьировали по размеру и в большинстве представляли собой крупные многокле-

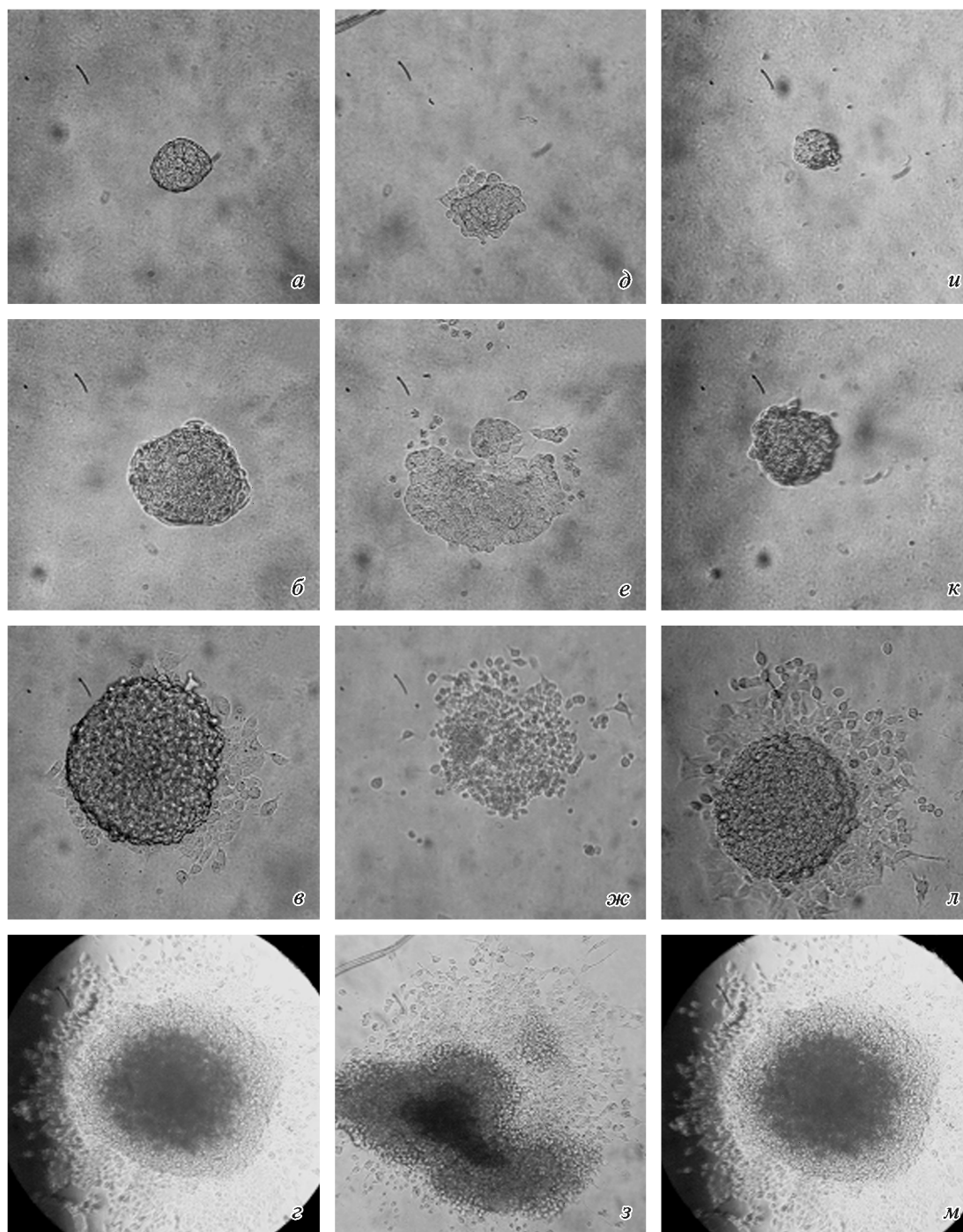


Рис. 1. Формирование голоклонов 3Н (*a—z*), 5F (*d—z*) и 6Н (*u—m*) при клонировании клеток монослойной линии гепатомы Зайдела.

Клетки клонировали с помощью метода предельных разведений в лунках 96-луночного планшета. Показан рост клонов на 6-е (*a, d, u*), 8-е (*b, e, k*), 10-е (*v, zh, l*) и 13-е (*z, z, m*) сут после посева. Увел.: *a—v, d—zh, u—l* — об. 10×; *z, m* — 6.3×; *z* — 2.5×.

точные образования, рост которых продолжался на протяжении всего срока наблюдения (рис. 4, *a, б*). Мероклональные сублинии 1Е и 9С продуцировали сферы в меньшем количестве и небольшого размера (рис. 4, *в, z*), которые в течение 15 сут погибали, что позволяет предполагать отсутствие в их составе ОСК, способных обеспечить самоподдержание клона в бессывороточной среде.

При реклонировании клеток клональных сублиний в полной питательной среде образующиеся клоны значи-

тельно варьировали по форме колоний и размерам, что в ряде случаев затрудняло определение их морфологических типов. На гистограмме (рис. 5) представлены суммарные данные подсчета колоний каждого типа на двух параллельных чашках Петри. Встречавшиеся мелкие колонии с неопределенной формой не учитывали при проведении расчетов. Как видно, каждая клональная сублиния продуцировала все типы клонов, но в неодинаковых пропорциях и преимущественно тот тип колоний, от ко-

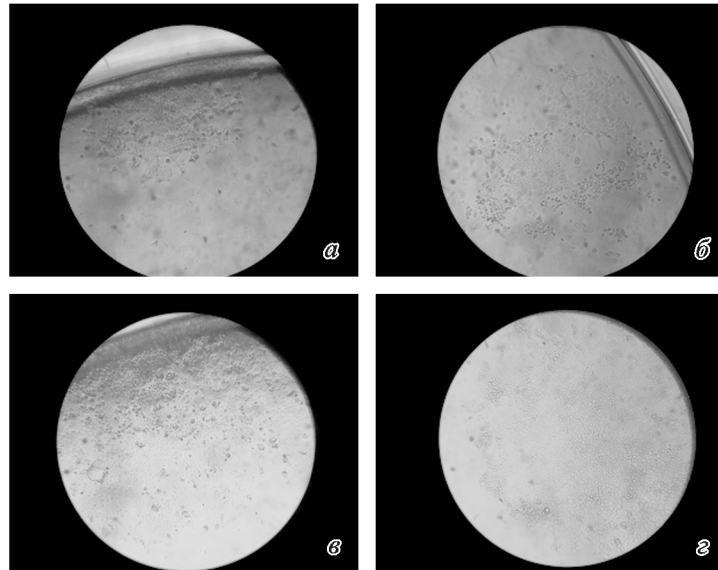


Рис. 2. Формирование мероклонов 1Е (а, б) и 9с (в, г) при клонировании клеток монослойной линии гепатомы Зайдела. Клетки клонировали с помощью метода предельных разведений в лунках 96-луночного планшета. Показан рост клонов на 10-е (а, в) и 13-е (б, г) сут после посева. Об.: 2.5×.

Туморогенность клональных линий гепатомы Зайдела

Клональные линии	Число клеток, введенных в брюшную полость крысы	Число крыс в группе	Число крыс, погибших от асцитной опухоли
1Е, мероклон	$15 \cdot 10^6$	2	0
	$20 \cdot 10^6$	4	0
3Н, голоклон	$12 \cdot 10^6$	1	0
	$20 \cdot 10^6$	9	4
5F, голоклон	$20 \cdot 10^6$	5	3
6Н, голоклон	$13 \cdot 10^6$	2	1
	$20 \cdot 10^6$	3	1
9С, мероклон	$14 \cdot 10^6$	2	0
	$20 \cdot 10^6$	3	0
«Родительская» монослойная суб- линия гепатомы Зайдела	$13 \cdot 10^6$	2	0
	$17 \cdot 10^6$	1	0
	$20 \cdot 10^6$	2	1

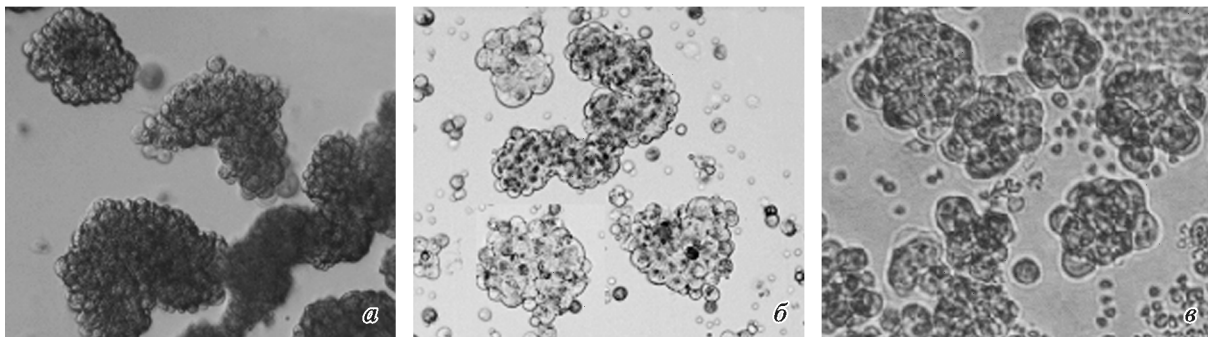


Рис. 3. Характерные многоклеточные островки, выделенные из геморрагических асцитов, которые образовались после внутрибрюшинного введения крысам клеток голоклональных сублиний.

а—в — 3Н, 5F и 6Н соответственно. Об. 6.3×.

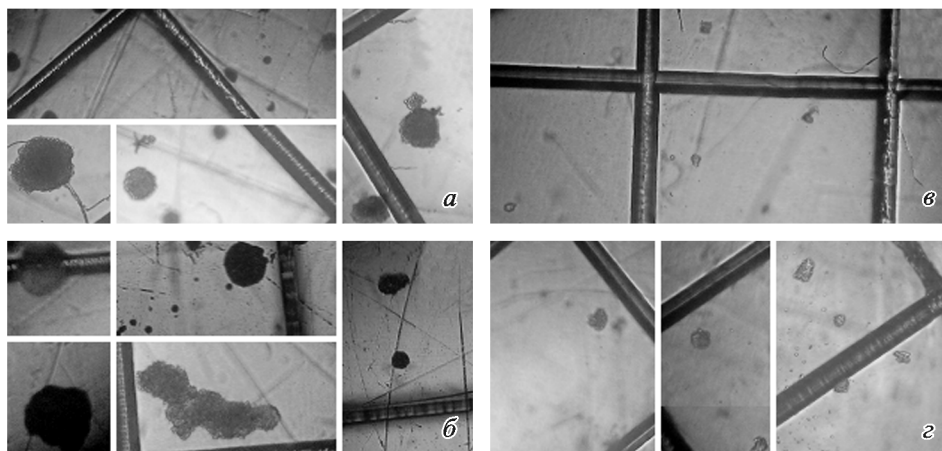


Рис. 4. Гепатосферы клональных сублиний, культивируемых в бессывороточной среде.

Клетки сеяли при низкой плотности (10 кл./мл) на 8-е сут после посева: а, б — клетки голоклональных сублиний 3Н и 6Н соответственно, формирование крупных сферических колоний; в, з — клетки мероклональных сублиний 1Е и 9С соответственно, образование мелких сфер, которые погибли в течение 15 сут. Об. 6.3×.

того она произошла: клетки голоклональных сублиний 3Н, 5F и 6Н образовывали 72, 62 и 70 % голоклонов от общего числа колоний соответственно. В то же время у мероклональных сублиний лишь 5 % колоний имели морфологические признаки голоклонов.

Сравнение клональных линий по скорости роста. При ведении клеточных линий в культуре мы наблюдали высокую скорость образования конфлюэнтного монослоя клетками мероклональных сублиний 1Е и 9С; они не только быстро пролиферировали, но и были весьма устойчивы к увеличивающейся плотности клеток и меняющемуся составу питательной среды (снижению рН и уменьшению питательных веществ). В то же время клетки голоклональных сублиний 3Н, 5F и 6Н в ответ на изменение среды замедляли рост и откреп-

лялись от субстрата с образованием флотирующих агрегатов.

Мы сравнили клетки двух голоклональных (5F и 6Н) и двух мероклональных (1Е и 9С) сублиний по скорости пролиферации с помощью MTS-теста (рис. 6). Содержание клеток в лунках 96-луночных планшетов определяли трижды с интервалом в 24 ч. Выраженная фаза экспоненциального роста клеток голоклональных и мероклональных сублиний наблюдалась в течение 24—48 ч, после чего отмечалось снижение темпов деления клеток голоклонов с переходом в стационарную фазу роста на временном интервале 48—72 ч. При этом клетки мероклонов сохраняли высокую скорость размножения в течение 72 ч культивирования, число клеток в лунках к этому сроку оказывалось выше, чем на сроке 48 ч, что подтверждает

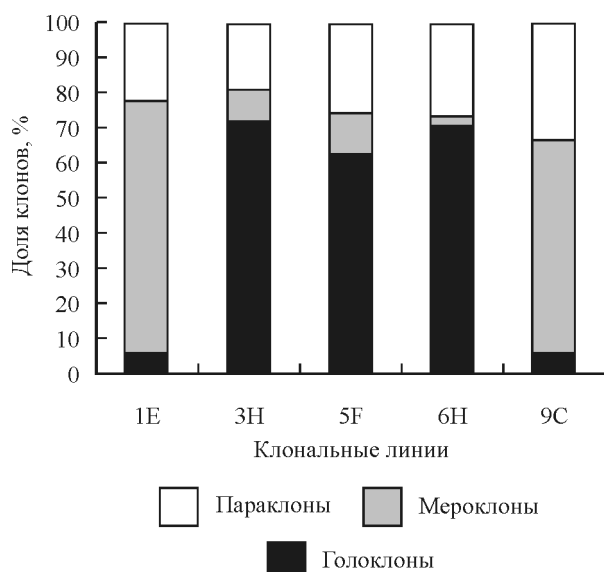


Рис. 5. Доли голоклонов, мероклонов и параклонов от общего числа клонов, образовавшихся при реклонировании клеток клональных сублиний.

Клетки голоклональных (3Н, 5F и 6Н) и мероклональных (1Е и 9С) сублиний сеяли при низкой плотности 40 кл./мл. Через 8 сут клетки фиксировали и окрашивали гематоксилином и эозином; рассчитывали долю образовавшихся голо-, меро- и параклонов в %.

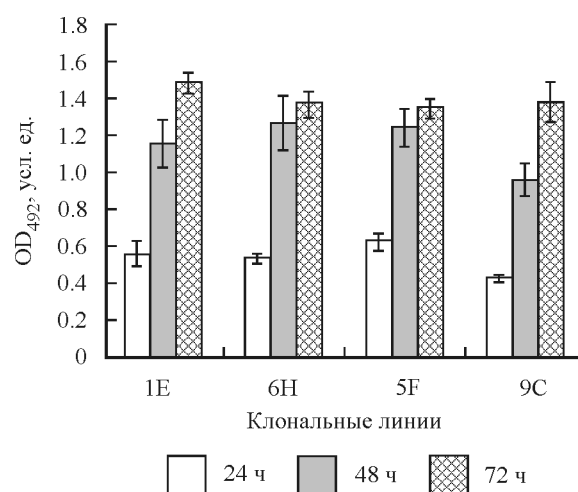


Рис. 6. Пролиферативная активность клеток голоклональных (5F и 6Н) и мероклональных (1Е и 9С) сублиний.

Клетки сеяли в лунки 96-луночных планшетов в одинаковой концентрации. Через 24, 48 и 72 ч содержание клеток в лунках определяли колориметрически с помощью MTS-реagenta: оптическая плотность (OD_{492}) содержимого в лунках пропорциональна численности живых клеток. Вертикальными отрезками показаны ошибки среднего. Увеличение показателя OD_{492} на сроке от 24 до 48 ч достоверно у всех сублиний ($P < 0.05$). Увеличение показателя OD_{492} на сроке от 48 до 72 ч достоверно у мероклональных линий 1Е и 9С ($P < 0.05$) и недостоверно у голоклональных сублиний 5F и 6Н.

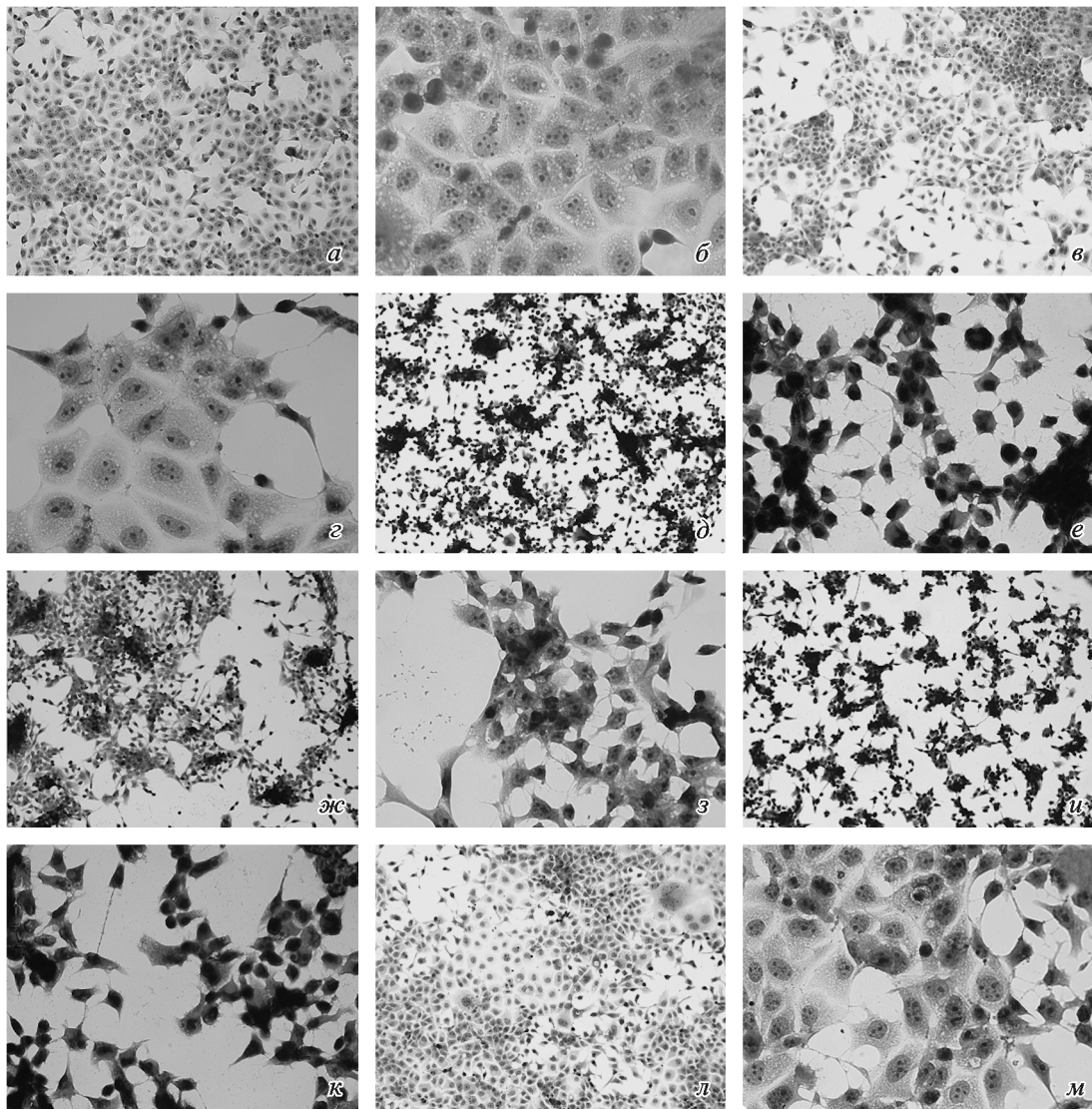


Рис. 7. Образование монослоя клетками родительской линии и клональных сублиний гепатомы Зайдела: голоклональных (3Н, 5F и 6Н) и мероклональных (1Е, 9С).

а, б — клетки исходной монослойной линии; *в, г* — клетки 1Е; *д, е* — клетки 3Н; *ж, з* — клетки 5F; *и, к* — клетки 6Н; *л, м* — клетки 9С. Увел.: *а, в, д, ж, и, л* — об. 10×; *б, г, е, з, к, м* — 40×. Показано, что клетки голоклональных сублиний образуют рыхлый монослой в отличие от плотного монослоя клеток родительской линии и мероклональных сублиний. Клетки выращивали, фиксировали и окрашивали гематоксилином и эозином на покровных стеклах.

наши визуальные наблюдения о более высокой скорости пролиферации клеток мероклональных сублиний.

Морфометрический анализ клеточных препаратов, окрашенных гематоксилином и эозином. После пересева клетки родительской линии гепатомы Зайдела и ее мероклональных сублиний 1Е и 9С росли кластерами, состоящими из плотно контактирующих друг с другом эпителиоподобных клеток; вместе с тем присутствовали отдельные веретенообразные или фибробластоподобные клетки небольшого размера, большую часть которых занимало ядро (рис. 7, *а—г, л, м*). По мере формирования монослоя доля этих клеток сокращалась, и при достижении конфлюэнтности в нем различались зоны из мелких клеток неправильной формы (овальных, округлых или многоугольных) и зоны из эпителиоподобных вакуолизированных крупных клеток полигональной формы; присутствовали и многоядерные клетки-гиганты.

Клональные сублинии 3Н, 5F и 6Н, полученные из голоклонов, формировали монослойные культуры, которые принципиально отличались по своим морфологическим характеристикам от родительской монослойной линии гепатомы Зайдела и от ее мероклональных сублиний 1Е и 9С. На окрашенных препаратах отчетливо видно, что сублинии 3Н, 5F и 6Н росли колониями, в центре которых наблюдалось скопление (или нагромождение) клеток (рис. 7, *д—к*); отделяющиеся клетки образовывали рыхлый монослой из хаотично расположенных фибробластоподобных клеток, контакты между которыми осуществлялись за счет тонких цитоплазматических отростков.

По данным морфометрии, клетки всех дочерних клональных сублиний по площади уступали клеткам родительской линии гепатомы Зайдела (рис. 8). Средняя площадь клеток и ядер голоклонов 3Н, 5F и 6Н была ниже ($P < 0.05$), чем соответствующие показатели для клеток

мероклонов 1Е и 9С. При этом размеры мероклональных клеток очень сильно варьировали, и если клетки меньших размеров были сравнимы по площади с клетками голоклонов, то полигональные вакуолизированные клетки с четко очерченной пограничной линией были в несколько раз крупнее.

Важным морфометрическим показателем опухолевых клеток является ЯЦО. По данным Бгатовой с соавторами (2015), уровень цитодифференцировки в ряду клеток асцитной гепатомы ГК-29 обратно коррелирует с показателем их ЯЦО. Как показали наши расчеты, в клетках голоклональных сублиний 3Н, 5F и 6Н, в которых ядро занимало большую часть клетки, средние значения их ЯЦО составляли 1.65 ± 0.12 , 1.96 ± 0.12 и 1.61 ± 0.10 соответственно. Для клеток мероклональных сублиний 1Е и 9С, в которых большую часть занимала цитоплазма, средние значения ЯЦО были ниже — 0.74 ± 0.05 и 0.79 ± 0.05 соответственно. Монослойная линия гепатомы Зайдела, которая по сравнению с асцитной формой опухоли имеет более высокий уровень цитодифференцировки (Staedel, Beck, 1978), отличалась самым низким ЯЦО (0.30 ± 0.02). Различия между значениями ЯЦО у клеток родительской линии, мероклонов и голоклонов статистически достоверны ($P < 0.05$). На основании рассчитанных нами значений ЯЦО клеточные линии гепатомы Зайдела можно расположить по уровню дифференцировки в следующем порядке: родительская линия > мероклональные линии > голоклональные линии.

Таким образом, клональные сублинии, полученные из голоклонов, были представлены низкодифференцированными фибробластоподобными клетками, большую часть площади которых занимали ядра; эти клетки формировали рыхлый монослой из хаотично расположенных клеток, в то время как эпителиоподобные клетки мероклонов имели характеристики, близкие к клеткам исходной монослойной линии гепатомы Зайдела.

Обсуждение

Асцитная гепатома Зайдела была индуцирована 4-диметиламиноазобензолом у двух крыс более 50 лет назад (Зайдела, 1963). В результате опухолевой прогрессии первичных гепатом в брюшной полости животных образовались геморрагические асциты, содержащие многоклеточные островки опухолевых клеток. Эти асциты дали начало двум штаммам (С и D) перевиваемой асцитной формы гепатомы Зайдела. До настоящего времени асцитные формы гепатом привлекали внимание исследователей в основном в качестве удобного объекта, позволяющего стабильно и быстро получать необходимое количество свободных от стромы опухолевых клеток. При этом природа флотирующих в асцитической жидкости многоклеточных островков оставалась мало изученной. Мы обратились к изучению биологии клеток гепатомы Зайдела в связи с необычайно высоким метастатическим потенциалом опухоли (Киселева и др., 1972), который может быть связан с присутствием в ее составе субпопуляции метастатических ОСК. В предыдущей (Терюкова и др., 2013) и в настоящей работе мы впервые дали характеристики двум линиям гепатомы Зайдела, полученным нами после эксплантации в культуру клеток из асцитической жидкости крыс, — суспензионной линии и монослойной.

Для изучения клеточного состава монослойной линии гепатомы Зайдела мы использовали способность кло-

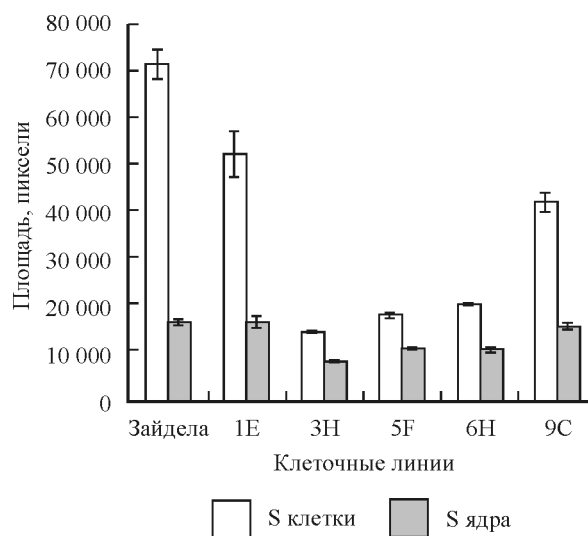


Рис. 8. Средняя площадь (S) клеток и ядер гепатомы Зайдела, голоклональных (3Н, 5F и 6Н) и мероклональных (1Е и 9С) сублиний.

Вертикальные отрезки — ошибка среднего.

ногенных клеток разного уровня дифференцировки продуцировать клоны, различающиеся по форме колоний и пролиферативному потенциалу. Как убедительно показано в нескольких работах (Li et al., 2008; Pfeiffer, Schalken, 2010; Doherty et al., 2011; Tan et al., 2011; Yao et al., 2013), морфологические характеристики клеточных клонов служат информативным маркером уровня дифференцировки клоногенных клеток, а именно: голоклоны формируются из ОСК, мероклоны — из переходных умножающихся клеток ранней стадии, а параклоны — из переходных умножающихся клеток поздней стадии; при этом клетки образующихся голоклонов имеют признаки ОСК, обладают высоким пролиферативным потенциалом и способностью инициировать развитие новой опухоли, тогда как клетки мероклонов имеют признаки ОПК, отличаются ограниченными пролиферативными возможностями и не проявляют туморогенных свойств. С целью углубленного изучения клеток с характеристиками ОСК исследователи получают клеточные линии из голоклонов (Miloszewska et al., 2010; Rao et al., 2013; Yao et al., 2013), но мы не встречали сообщений ни об одной линии клеток, полученной из мероклонов.

Используя отбор клонов по морфологическим признакам, мы впервые сумели получить из популяции клеток монослойной линии гепатомы Зайдела три голоклональные сублинии (3Н, 5F и 6Н), которые, несмотря на долгосрочное пассирование в культуре, сохранили основное свойство голоклонов — стволовость, или способность инициировать развитие асцитной формы опухоли. Наличие ОСК в каждой из этих сублиний мы доказали экспериментально двумя способами. Во-первых, установив способность сублиний 3Н, 5F и 6Н инициировать *in vivo* развитие асцитной формы гепатомы (рис. 3). Во-вторых, подтвердив наличие в этих сублиниях СК с помощью двух тестов *in vitro* на стволовость. В первом тесте (на сферообразование) мы выявили СК по их способности пролиферировать в бессывороточной среде с образованием неприкрепляющихся сферических клонов или сфер (рис. 4). Во втором тесте — на голоклоны — с помощью клонального анализа сублиний выявили ОСК по их свой-

ству формировать голоклоны в полной ростовой среде (рис. 5).

Далее, нам впервые удалось получить клональные сублинии (1Е и 9С) из мероклонов. Можно предположить, что способность этих мероклональных линий к долгосрочному поддержанию в культуре связана с высоким уровнем их митотической активности: скорость пролиферации клеток мероклонов 1Е и 9С при культивировании *in vitro* на временном отрезке 48—72 ч оказывалась более высокой, чем у клеток голоклонов 3Н, 5F и 6Н (рис. 6). Эти две сублинии пережили, так же как и голоклональные, порядка 30 пассажей в культуре *in vitro* и криозамораживание, сохранив при этом свойства клоногенных переходных умножающихся клеток — способность при реклонировании образовывать преимущественно мероклоны (рис. 5). Небольшая доля голоклонов, образующихся при реклонировании мероклональных линий, подтверждает выводы других исследователей (Tan et al., 2011; Beaver et al., 2014) о способности клеток, находящихся на более низкой ступени иерархической лестницы, давать начало клонам более высокого ранга. Как показано на диаграмме (рис. 5), каждая из клональных линий воспроизводила *in vitro* преимущественно тот же тип колоний, от которого она произошла, но кроме того, и другие, минорные, типы клонов. Таким образом, наши данные, полученные в экспериментах *in vitro*, свидетельствуют о возможности перехода ОПК мероклонов на более высокий уровень иерархии — в ОСК. При этом, однако, их содержание в мероклональных линиях 1Е и 9С, по-видимому, было недостаточным для опухолеобразования *in vivo*.

Полученные нами результаты хорошо согласуются с данными других авторов. Так, при реклонировании клеток голоклонов, выделенных путем клонирования культивируемой линии карциномы поджелудочной железы, примерно в одинаковой пропорции образуются голоклоны и мероклоны при незначительном количестве параклонов; через 1 мес ведения в культуре соотношение голоклонов и мероклонов изменяется в пользу последних; а при реклонировании клеток мероклонов главным образом наблюдается формирование мероклонов и параклонов, но в незначительном количестве определяются и голоклоны (Tan et al., 2011). Оба этих типа клонов образуются и при реклонировании клеточной линии карциномы простаты DU145, на основании чего авторы предположили, что голоклоны и мероклоны различаются только пропорцией ОСК (Beaver et al., 2014). В этой работе авторы показали также, что голоклоны и мероклоны экспрессируют маркеры нормальных стволовых клеток CD44, $\alpha 2\beta 1$ интегрин, VMP1 и Oct-4, а также индуцируют рост опухолей у бестимусных мышей; при этом мероклоны отличаются более низким уровнем экспрессии маркеров СК, более длинным латентным периодом до момента обнаружения опухолей *in vivo* и небольшим размером образующихся опухолей.

Мы впервые обнаружили весьма значительные различия между родительской монослойной линией гепатомы Зайдела и ее клональными сублиниями по морфометрическим параметрам: форме, размерам и площади клеток и ядер, показателю ЯЦО и особенностям роста колоний (рис. 7, 8). Наиболее важным представляется то, что клетки голоклональных сублиний 3Н, 5F и 6Н имели фибробластоподобную морфологию, формировали рыхлый монослой без плотных межклеточных контактов и приобрели определенную автономность по мере роста голо-

клонов. Наши наблюдения за ростом голоклонов показали, что на 6—8-е сут от зарождения клонов 3Н и 6Н их колонии состояли из плотно упакованных клеток, похожих на небольшие бляшки с четкой внешней границей (рис. 1, а, б, и, к), а через 10 сут эта пограничная линия нарушалась, индивидуальные клетки отделялись от тела колонии и устремлялись к ее периферии (рис. 1, в, г, л, м). Для голоклона 5F дезинтеграция подобной колонии начиналась еще раньше (рис. 1, д—з). Перечисленные морфологические признаки растущих голоклональных колоний гепатомы Зайдела не вполне согласуются с описаниями голоклонов из других опухолей, у которых подчеркиваются плотное расположение клеток и ровная пограничная линия по периметру колоний (Locke et al., 2005; Li et al., 2008; Tan et al., 2011). Можно предположить, что выявленные нами признаки являются атрибутом ОСК именно метастатической опухоли и свидетельствуют о способности клеток голоклональных сублиний (3Н, 5F и 6Н) гепатомы Зайдела к индивидуальной миграции.

В целом наши результаты указывают на то, что многоклеточные флотирующие островки в асцитической жидкости брюшной полости, спонтанно возникающие у экспериментальных животных в результате эволюции первичных солидных форм опухолей печеночно-клеточного происхождения, являются разновидностью метастатической опухоли или промежуточным этапом на пути диссеминации опухоли в организме, т. е. этапом метастатического каскада. Проведенный нами клональный анализ клеток асцитной гепатомы Зайдела показал, что в составе гетерогенной популяции асцитной формы опухоли присутствуют по крайней мере две разные субпопуляции клеток с опухолеиницирующими свойствами: одна — в суспензионной линии (Терюкова и др., 2013), другая — в монослойной линии, изученной в настоящей работе. Эти субпопуляции ОСК различаются по адгезионным свойствам, характеру экспрессии эпителиальной молекулы клеточной адгезии (EPCAM) и активности секретируемой матриксной металлопротеиназы-9 (Терюкова и др., 2015). Обнаружение в составе асцитной гепатомы Зайдела субпопуляций с признаками ОСК и ОПК позволяет сделать вывод об иерархической организации клеток в этой метастатической опухоли.

Дальнейшее изучение клональных линий гепатомы Зайдела, содержащих ОСК с высокой опухолеиницирующей, миграционной и метастатической активностью, и их сопоставление с линиями, содержащими ОПК, может существенно приблизить нас к пониманию механизмов опухолевой прогрессии и метастазирования. Наряду с этим уже сейчас полученные нами клеточные линии, обогащенные ОСК и ОПК, можно использовать и в прикладных исследованиях, например для экспериментального тестирования таргетных противоопухолевых препаратов.

Список литературы

- Бгатова Н. П., Омелянчук Л. В., Пожидаева А. А., Семешин В. Ф., Лыков А. П., Повещенко О. В., Макарова О. П., Рачковская Л. Н., Бородин Ю. И., Коненков В. И. 2015. Морфологические критерии стадий дифференцировки клеток экспериментальной гепатокарциномы для оценки эффективности противоопухолевых средств. Бюл. эксперим. биол. мед. 160 (7): 126—132. (Bgatova N. P., Omel'yanchuk L. V., Pozhidayeva A. A., Semeshin V. F., Lykov A. P., Poveshchenko O. V., Makarova O. P., Rachkovskaya L. N., Borodin Y. I., Konenkov V. I. 2015. Morphological criteria of cell differentiation stages in experi-

mental hepatocarcinoma and evaluation of antitumor drug efficiency. *Bull. Exp. Biol. Med.* 160 (7) : 126—132.)

Зайдела Ф. 1963. Применение асцитной гепатомы для изучения цитологии рака. *Вопр. онкол.* 9 (5) : 25—33. (Zajdela F. 1963. Application of an ascitic hepatoma for studying of cytology of cancer. *Vopr. Onkol.* 9 (5) : 25—33.)

Киселева Н. С., Павлоцкий А. И., Морозов Ю. Е., Фукс Б. Б. 1972. Сравнительное цитоспектрофотометрическое исследование содержания ДНК в клеточных ядрах асцитной гепатомы Зайдела и метастазов этой опухоли в паратрахеальные лимфатические узлы. *Цитология.* 14 (7) : 896—900. (Kiseleva N. S., Pavlotsky A. I., Morozov Yu. E., Fuchs B. B. 1972. Comparative cytospectrophotometric research of the content of DNA in cellular nucleus of an ascitic Zajdela hepatoma and metastases of this tumor in paratracheal lymph nodes. *Tsitologiya.* 14 (7) : 896—900.)

Лупатов А. Ю., Гусина А. М., Каралкин П. А., Ярыгин К. Н. 2013. Выявление «боковой популяции», ассоциированной с раковыми стволовыми клетками, при цитометрическом анализе с использованием фиолетового лазера. *Биомед. химия.* 59 (3) : 339—348. (Lupatov A. Yu., Gisina A. M., Karalkin P. A., Yarygin K. N. 2013. Identification of «side population» associated with cancer stem cells by flow cytometry with violet laser. *BMC.* 59 (3) : 339—348.)

Терюкова Н. П., Блинова Г. И., Иванов В. А. 2013. Клетки гепатомы Зайдела при культивировании *in vitro*. *Цитология.* 55 (1) : 36—44. (Teryukova N. P., Blinova G. I., Ivanov V. A. 2013. Zajdela hepatoma cells cultured *in vitro*. *Tsitologiya.* 55 (1) : 36—44.)

Терюкова Н. П., Воронкина И. В., Смагина Л. В., Иванов В. А. 2015. Клетки гепатомы Зайдела в культуре: клонирование и характеристика клональных линий. *Клеточные культуры. Информ. бюл.* 31 : 25—37. (Teryukova N. P., Voronkina I. V., Smagina L. V., Ivanov V. A. 2015. Zajdela hepatoma cells in culture: cloning and characterization of clonal lines. *Cell Culture. Inform. Bull.* 31 : 25—37.)

Al-Hajj M., Becker M. W., Wicha M., Weissman I., Clarke M. F. 2004. Therapeutic implications of cancer stem cells. *Curr. Opin. Genet. Develop.* 14 : 43—47.

Barrandon Y., Green H. 1987. Three clonal types of keratinocyte with different capacities for multiplication. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 84 : 2302—2306.

Beaver C. M., Ahmed A., Masters J. R. 2014. Clonogenicity: holoclones and meroclones contain stem cells. *PLoS ONE.* 9 : e89834.

Chiba T., Kita K., Zheng Y. W., Yokosuka O., Saisho H., Iwama A., Nakauchi H., Taniguchi H. 2006. Side population purified from hepatocellular carcinoma cells harbors cancer stem cell-like properties. *Hepatology.* 44 : 240—251.

Dalerba P., Cho R. W., Clarke M. F. 2007. Cancer stem cells: models and concepts. *Annu. Rev. Med.* 58 : 267—284.

Doherty R. E., Haywood-Small S. L., Sisley K., Cross N. A. 2011. Aldehyde dehydrogenase activity selects for the holoclone phenotype in prostate cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 414 : 801—807.

Fomchenko E. I., Holland E. C. 2005. Stem cells and brain cancer. *Exp. Cell Res.* 306 : 323—329.

Kalirai H., Damato B. E., Coupland S. E. 2011. Uveal melanoma cell lines contain stem-like cells that self-renew, produce differentiated progeny and survive chemotherapy. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 52 : 8458—8466.

Kukekov V. G., Laywell E. D., Thomas L. B., Steindler D. A. 1997. A nestin-negative precursor cell from the adult mouse brain gives rise to neurons and glia. *Glia.* 21 : 399—407.

Li H., Chen X., Calhoun-Davis T., Claypool K., Tang D. G. 2008. PC3 human prostate carcinoma cell holoclones contain self-renewing tumor-initiating cells. *Cancer Res.* 68 : 1820—1825.

Locke M., Heywood M., Fawell S., Mackenzie I. C. 2005. Retention of intrinsic stem cell hierarchies in carcinoma-derived cell lines. *Cancer Res.* 65 : 8944—8950.

Maenhaut C., Dumont J. E., Roger P. P., van Staveren W. C. 2010. Cancer stem cells: a reality, a myth, a fuzzy concept or a misnomer? An analysis. *Carcinogenesis.* 31 : 149—158.

Miloszewska J., Gos M., Przybyszewska M., Trembacz H., Koronkiewicz M., Janik P. 2010. Mouse sarcoma L1 cell line holoclones have a stemness signature. *Cell Prolif.* 43 : 229—234.

Oliver T. G., Wechsler-Reya R. J. 2004. Getting at the root and stem of brain tumors. *Neuron.* 42 : 885—888.

Pfeiffer M. J., Schalken J. A. 2010. Stem cell characteristics in prostate cancer cell lines. *Eur. Urol.* 57 : 246—254.

Rao G. H., Liu H. M., Li B. W., Hao J. J., Yang Y. L., Wang M. R., Wang X. H., Wang J., Jin H. J., Du L., Chen Q. 2013. Establishment of a human colorectal cancer cell line P6C with stem cell properties and resistance to chemotherapeutic drugs. *Acta Pharmacol. Sin.* 34 : 793—804.

Singh S. K., Hawkins C., Clarke I. D., Squire J. A., Bayani J., Hide T., Henkelman R. M., Cusimano M. D., Dirks P. B. 2004. Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature.* 432 : 396—401.

Staedel C., Beck J. P. 1978. Resurgence of glycogen synthesis and storage capacity in cultured hepatoma cells. *Cell Differ.* 7 : 61—71.

Tan L., Sui X., Deng H., Ding M. 2011. Holoclone forming cells from pancreatic cancer cells enrich tumor initiating cells and represent a novel model for study of cancer stem cells. *PLoS ONE.* 6 : e23383.

Uchida Y., Tanaka S., Aihara A., Adikrisna R., Yoshitake K., Matsumura S., Mitsunori Y., Murakata A., Noguchi N., Irie T., Kudo A., Nakamura N., Lai P. B., Arii S. 2010. Analogy between sphere forming ability and stemness of human hepatoma cells. *Oncol. Rep.* 24 : 1147—1151.

Visvader J. E., Lindeman G. J. 2008. Cancer stem cells in solid tumours: accumulating evidence and unresolved questions. *Nat. Rev. Cancer.* 8 : 755—768.

Yao J., Xie J., Li J., Wei X., Yang Y., Chen H. 2013. Establishment of subseries cell lines from tongue cancer single cell and detection of cancer stem cell markers. *Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi.* 31 : 86—90.

Zheng X., Shen G., Yang X., Liu W. 2007. Most C6 cells are cancer stem cells: evidence from clonal and population analyses. *Cancer Res.* 67 : 3691—3697.

Поступила 1 VI 2016

ESTABLISHMENT AND CHARACTERIZATION OF MONOLAYER HEPATOMA ZAJDELA CLONAL LINES WITH SIGNS OF CANCER STEM CELLS AND PROGENITOR CELLS

N. P. Teryukova,¹ E. I. Sakhenberg, V. A. Ivanov, S. A. Snopov

Institute of Cytology RAS, St. Petersburg,

¹ e-mail: npter@yandex.ru

The aim of our study is to investigate the biology of cancer stem cells (CSC) from a metastatic tumor. Previously, we explanted the cells of Zajdela ascetic rat hepatoma into *in vitro* culture. Then, via selection of the adhesive cells from multicellular floating islets we created a constant monolayer cell line. In present work, we

cloned the cells of the monolayer line by a limiting dilution method and established five novel clonal sublines of the hepatoma: three holoclonal sublines containing the CSC and two meroclonal sublines containing the transit amplifying cells. After a long culture passaging (approximately 30 passages, freezing and de-freezing), the cells of clonal sublines retain the features of CSC: they have a tumor-initiating potential and produce mainly holoclones at recloning in a full growth medium and large non-adhesive hepatospheres in a serum-free medium. The morphometric analysis showed that the cells of holoclonal and meroclonal sublines differ significantly in cell shape and area, in size of the nuclei and in nuclear-cytoplasmic ratio. We have found for the first time that holoclonal cells of monolayer Zajdela hepatoma line have a fibroblast-like morphology and form contacts with each other due to membrane protrusions. We assume that the fibroblast-like morphology of CSC is an attribute of a metastatic tumor and demonstrates the ability of these cells to the individual migration.

Key words: hepatoma, cancer stem cells, cloning, holoclones, meroclones, metastasis.
